



UNIVERSIDAD DE MURCIA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS SOCIO SANITARIAS

**Marcadores Bioquímicos Séricos en la Muerte por
Sumersión: Eficacia Diagnóstica del Estroncio y
otros Elementos Traza**

**D^a. M^a Soledad del Pozo Luengo
2013**

A la memoria de mi abuelo

AGRADECIMIENTOS

A la Profesora M^a Dolores Pérez Cárceles, catedrática de Medicina Legal y Forense de la Universidad de Murcia y directora de esta Tesis, por su paciencia, apoyo y perseverancia, gracias a la cual he podido realizar y sobre todo terminar este trabajo.

Al Dr. José A. Noguera Velasco, Jefe de Sección del Servicio de Análisis Clínicos del Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca y co-director de esta Tesis, por su orientación y sus consejos.

A D. Agustín Sibón Olano, Jefe del Servicio de Patología Forense del Instituto de Medicina Legal de Cádiz por la recogida de las muestras.

A la Dra. M^a Luisa Gil del Castillo, facultativo especialista en Análisis Clínicos del Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca, quiero agradecerle su ayuda incondicional, sus consejos y sobre todo su amistad.

A mis compañeros de residencia por su apoyo en la realización de esta Tesis durante esas guardias interminables.

Al personal Técnico del Laboratorio por su colaboración en la realización técnica de este trabajo.

Agradecer a mi familia y amigos su apoyo incondicional y su cariño. Gracias por animarme en los momentos más difíciles.

A Manuel, por su comprensión, su paciencia y sobre todo su esfuerzo para que pudiera presentar esta Tesis.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	13
1.1. ASFIXIA	15
1.2. MUERTE POR SUMERSIÓN	17
1.2.1. Concepto.....	17
1.2.2. Datos epidemiológicos	19
1.2.3. Etiología médico-legal.....	21
1.2.4. Data de la sumersión	23
1.2.5. Fisiopatología y mecanismos de muerte	24
1.2.6. Pronóstico de supervivencia.....	29
1.2.7. Medidas terapéuticas en las víctimas de sumersión.....	35
1.2.8. Principios generales a seguir en el estudio de los casos de sumersión.....	38
1.2.9. Hallazgos necrópsicos	40
1.2.9.1. Examen externo	40
1.2.9.2. Examen interno.....	43
1.2.9.3. Hallazgos histopatológicos	48
1.2.10. Exámenes biológicos.....	53
1.2.10.1. Diatomeas	54
1.2.10.2. Métodos alternativos a la investigación de las diatomeas	59

1.2.11. Tanatoquimia.....	62
1.2.11.1. Tipo de muestra y momento de la toma	65
1.2.11.2. Marcadores bioquímicos	68
1.2.11.3. Marcadores bioquímicos en el diagnóstico de sumersión.....	74
1.2.11.3.1. Estroncio.....	75
1.2.11.3.2. Otros marcadores.....	79
1.2.12. Componentes alveolares que pueden ser encontrados en la circulación general	82
1.2.13. Otros marcadores	85
2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	87
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	93
3.1. Casos de autopsia forense	95
3.2. Recogida de muestras	97
3.3. Análisis bioquímico.....	98
3.3.1. Estroncio.....	99
3.3.2. Urea.....	102
3.3.3. Creatinina.....	105
3.3.4. Sodio y Cloro	108
3.3.5. Calcio	113
3.3.6. Magnesio	116
3.3.7. Hierro.....	119

3.3.8. Troponina T	122
3.4. Análisis estadístico	125
3.4.1. Análisis descriptivo de los datos	126
3.4.2. Análisis de comparación de medias.....	127
3.4.3. Análisis de correlación	128
3.4.4. Curvas ROC (“Receiver Operating Characteristic”: Curva de característica operativa para el receptor).....	130
3.4.5. Análisis discriminante.....	132
4. RESULTADOS.....	135
4.1. Análisis descriptivo de la muestra y de las diferencias según sexo, edad e intervalo post-mortem	137
4.1.1. Sexo	137
4.1.2. Edad	139
4.1.3. Intervalo post-mortem.....	141
4.2. Análisis de las diferencias en las concentraciones de los elementos traza entre los casos de muerte por sumersión, muerte por otras asfixias y otras causas de muerte.....	143
4.3. Análisis de correlación entre los elementos traza en sangre y las concentraciones en el medio de sumersión y el tiempo estimado aproximadamente de permanencia del cadáver en el agua	149
4.4. Análisis de las diferencias en las concentraciones de los elementos traza entre las muertes por sumersión en agua salada y las de sumersión en agua dulce.....	152

4.5. Análisis de las diferencias en las concentraciones de los elementos traza entre los casos de muerte por sumersión y otras causas de muerte.....	160
4.6. Análisis de las diferencias en las concentraciones de los elementos traza entre los casos de sumersión en agua salada o de sumersión en agua dulce y otras causas de muerte	168
5. DISCUSIÓN.....	179
6. CONCLUSIONES	205
7. BIBLIOGRAFÍA.....	209

ÍNDICE DE TABLAS

<i>Tabla 1.</i> Muertes por sumersión distribuidas por sexo y región (WHO, GBD 2000)..	21
<i>Tabla 2.</i> Ratios entre las concentraciones de los elementos más abundantes en agua marina y sangre humana (Azparren et al., 2000).....	77
<i>Tabla 3.</i> Distribución de los casos por grupo diagnóstico y causa de muerte.	96
<i>Tabla 4.</i> Distribución de los casos por grupo diagnóstico, causa de muerte y sexo.	137
<i>Tabla 5.</i> Valores descriptivos de la edad distribuidos por grupo diagnóstico y causa de muerte.....	139
<i>Tabla 6.</i> Valores descriptivos del intervalo post-mortem distribuidos por grupo diagnóstico y causa de muerte.	142
<i>Tabla 7.</i> Media, desviación estándar (SD) y rango de las concentraciones de los distintos elementos traza y las diferencias estadísticas entre los tres grupos diagnósticos.....	145
<i>Tabla 8.</i> Correlaciones entre las concentraciones de los elementos traza en agua y en sangre y entre las concentraciones de los elementos traza y el tiempo estimado de permanencia en el agua en los casos de sumersión.	150
<i>Tabla 9.</i> Correlaciones estadísticamente significativas entre las concentraciones de estroncio en sangre y otros elementos traza en los casos de sumersión.	151
<i>Tabla 10.</i> Media, desviación estándar (SD) y rango de los valores de los elementos traza y otros marcadores bioquímicos en suero mostrando las diferencias estadísticamente significativas entre los casos de sumersión en agua salada y los casos de sumersión en agua dulce.	153

<i>Tabla 11.</i> Media, desviación estándar (SD), rango y diferencias entre los casos de sumersión en agua salada y en agua dulce en función del tiempo de permanencia en el agua y de las concentraciones de los elementos traza en el medio de sumersión.	159
<i>Tabla 12.</i> Media, desviación estándar (SD) y rango de las concentraciones de los elementos traza en suero mostrando las diferencias estadísticamente significativas entre los casos de sumersión y otras causas de muerte.	161
<i>Tabla 13.</i> Áreas bajo la curva ROC, error estándar y límites inferior y superior del área. Puntos de corte establecidos de acuerdo con el uso de la curva ROC en los casos de sumersión.	167
<i>Tabla 14.</i> Análisis discriminante usando los elementos traza en sumersión.	168
<i>Tabla 15.</i> Media, desviación estándar (SD) y rango de las concentraciones de los elementos traza y otros marcadores bioquímicos en suero mostrando las diferencias estadísticamente significativas entre los casos de sumersión en agua salada y otras causas de muerte.	169
<i>Tabla 16.</i> Media, desviación estándar (SD) y rango de las concentraciones de los elementos traza y otros marcadores bioquímicos en suero mostrando las diferencias estadísticamente significativas entre los casos de sumersión en agua dulce y otras causas de muerte.	170
<i>Tabla 17.</i> Áreas bajo la curva ROC, error estándar y límites inferior y superior del área. Puntos de corte establecidos de acuerdo con el uso de la curva ROC en los casos de sumersión en agua salada y en agua dulce.	175
<i>Tabla 18.</i> Análisis discriminante usando los elementos traza en sumersión en agua dulce.	177
<i>Tabla 19.</i> Análisis discriminante usando los elementos traza en sumersión en agua salada.	177

ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1.</i> Principios generales en el estudio de la sumersión: 1. Hemodilución; 2. Partículas en el agua de sumersión (por ejemplo: diatomeas); 3. Elementos disueltos en el agua de sumersión; 4. Partículas o elementos celulares en los alveolos.....	38
<i>Figura 2.</i> Hongo de espuma.....	41
<i>Figura 3.</i> Aumento de tamaño de los pulmones.....	44
<i>Figura 4.</i> Manchas de Paltauf.	44
<i>Figura 5.</i> Espuma traqueobronquial.	45
<i>Figura 6.</i> Selección de diatomeas marinas.	54
<i>Figura 7.</i> Distintas formas de diatomeas.....	55
<i>Figura 8.</i> Diatomea del género Gomphonema, endémica del lago Baikal, al sur de Siberia.....	55
<i>Figura 9.</i> Tetrahymena thermophila.....	59
<i>Figura 11.</i> Chorophyceae pediatrum	59
<i>Figura 12.</i> Distribución de los casos por grupo diagnóstico.	96
<i>Figura 13.</i> Distribución de los casos por causa de la muerte.	97
<i>Figura 14.</i> Espectrómetro de absorción atómica de Perkin Elmer, modelo AAnalyst 600.....	99
<i>Figura 15.</i> Roche/Hitachi Cobas c 701.	102
<i>Figura 16.</i> Roche/Hitachi Cobas ISE.	109
<i>Figura 17.</i> Espectrómetro de absorción atómica de Perkin Elmer modelo 5100 PC..	116

<i>Figura 18.</i> Roche/Hitachi Cobas e 602.	122
<i>Figura 19.</i> Distribución de los casos por sexo.	138
<i>Figura 20.</i> Distribución de los casos por grupo diagnóstico y sexo.	138
<i>Figura 21.</i> Distribución de los casos por causa de muerte y sexo.	138
<i>Figura 22.</i> Histograma de la distribución de los casos por edad.....	140
<i>Figura 23.</i> Valores descriptivos de la edad distribuidos por grupo diagnóstico.	140
<i>Figura 24.</i> Valores descriptivos de la edad distribuidos por causa de muerte.	141
<i>Figura 25.</i> Valores descriptivos del intervalo post-mortem distribuidos por grupo diagnóstico.	142
<i>Figura 26.</i> Valores descriptivos del intervalo post-mortem distribuidos por la causa de muerte.....	143
<i>Figura 27.</i> Valores medios de las concentraciones de Sr en sangre en las distintas localizaciones según el grupo diagnóstico entre los que existen diferencias estadísticamente significativas.	146
<i>Figura 28.</i> Valores medios de las concentraciones de Mg en suero en las distintas localizaciones según el grupo diagnóstico entre los que existen diferencias estadísticamente significativas.	147
<i>Figura 29.</i> Valores medios de las concentraciones de Cl en suero en las distintas localizaciones según el grupo diagnóstico entre los que existen diferencias estadísticamente significativas.	147
<i>Figura 30.</i> Valores medios de las concentraciones de Na en suero en las distintas localizaciones según el grupo diagnóstico entre los que existen diferencias estadísticamente significativas.	148

<i>Figura 31.</i> Valores medios de las concentraciones de Ca en suero en las distintas localizaciones según el grupo diagnóstico entre los que existen diferencias estadísticamente significativas.	148
<i>Figura 32.</i> Valores medios de las concentraciones de Sr en sangre en las distintas localizaciones según el tipo de sumersión entre los que existen diferencias estadísticamente significativas.	154
<i>Figura 33.</i> Valores medios de las concentraciones de Mg en suero en las distintas localizaciones según el tipo de sumersión entre los que existen diferencias estadísticamente significativas	154
<i>Figura 34.</i> Valores medios de las concentraciones de Na en suero en las distintas localizaciones según el tipo de sumersión entre los que existen diferencias estadísticamente significativas.	155
<i>Figura 35.</i> Valores medios de las concentraciones de Cl en suero en las distintas localizaciones según el tipo de sumersión entre los que existen diferencias estadísticamente significativas.	155
<i>Figura 36.</i> Valores medios de las concentraciones de Ca, Urea y Creatinina en suero en las distintas localizaciones según el tipo de sumersión entre los que existen diferencias estadísticamente significativas.	156
<i>Figura 37.</i> Diagramas de cajas de las concentraciones de Sr y Fe entre VI y VD que mostraron diferencias estadísticamente significativas en los casos de sumersión en agua salada.	157
<i>Figura 38.</i> Diagramas de cajas de las concentraciones de Mg, Ca, Na, Cl y Urea entre VI y VD que mostraron diferencias estadísticamente significativas en los casos de sumersión en agua salada.	157

<i>Figura 39.</i> Diagramas de cajas de las concentraciones de Mg y Creatinina entre VI y VD que mostraron diferencias estadísticamente significativas en los casos de sumersión en agua dulce.....	158
<i>Figura 40.</i> Valores medios de las concentraciones de los elementos traza en las aguas de sumersión entre los que existen diferencias estadísticamente significativas.....	160
<i>Figura 41.</i> Valores medios de las concentraciones de Sr en sangre en las distintas localizaciones según los casos de sumersión y otras causas de muerte entre los que existen diferencias estadísticamente significativas.	162
<i>Figura 42.</i> Valores medios de las concentraciones de Mg en suero en las distintas localizaciones según los casos de sumersión y otras causas de muerte entre los que existen diferencias estadísticamente significativas.	162
<i>Figura 43.</i> Valores medios de las concentraciones de Ca y Na en suero en las distintas localizaciones según los casos de sumersión y otras causas de muerte entre los que existen diferencias estadísticamente significativas.	163
<i>Figura 44.</i> Valores medios de las concentraciones de Cl en suero en las distintas localizaciones según los casos de sumersión y otras causas de muerte entre los que existen diferencias estadísticamente significativas.	163
<i>Figura 45.</i> Diagrama de cajas de las concentraciones de Sr en sangre (VD, VI, periférica y VI-VD) y diferencias estadísticamente significativas entre los casos de sumersión y otras causas de muerte.....	164
<i>Figura 46.</i> Diagrama de cajas de las concentraciones de Mg en suero (VD, VI, periférica y VI-VD) y diferencias estadísticamente significativas entre los casos de sumersión y otras causas de muerte.....	165

<i>Figura 47.</i> Diagrama de cajas de las concentraciones de Cl en suero (VD, VI, periférica y VI-VD) y diferencias estadísticamente significativas entre los casos de sumersión y otras causas de muerte.....	165
<i>Figura 48.</i> Diagrama de cajas de las concentraciones de Ca y Na en suero (VI y VD, respectivamente) y diferencias estadísticamente significativas entre los casos de sumersión y otras causas de muerte.....	166
<i>Figura 49.</i> Curva ROC de los elementos traza en los casos de sumersión.....	167
<i>Figura 50.</i> Valores medios de las concentraciones de Sr en sangre en las distintas localizaciones según los casos de sumersión en agua salada y otras causas de muerte entre los que existen diferencias estadísticamente significativas.....	171
<i>Figura 51.</i> Valores medios de las concentraciones de Mg en suero en las distintas localizaciones según los casos de sumersión en agua salada y otras causas de muerte entre los que existen diferencias estadísticamente significativas.....	171
<i>Figura 52.</i> Valores medios de las concentraciones de Na en suero en las distintas localizaciones según los casos de sumersión en agua salada y otras causas de muerte entre los que existen diferencias estadísticamente significativas.....	172
<i>Figura 53.</i> Valores medios de las concentraciones de Cl en suero en las distintas localizaciones según los casos de sumersión en agua salada y otras causas de muerte entre los que existen diferencias estadísticamente significativas.....	172
<i>Figura 54.</i> Valores medios de las concentraciones de Ca en suero en las distintas localizaciones según los casos de sumersión en agua salada y otras causas de muerte entre los que existen diferencias estadísticamente significativas.....	173
<i>Figura 55.</i> Valores medios de las concentraciones de los distintos elementos traza en las distintas localizaciones según los casos de sumersión en agua dulce y otras causas de muerte entre los que existen diferencias estadísticamente significativas.....	173

Figura 56. Curvas ROC de los elementos traza en los casos de sumersión en agua dulce. **176**

Figura 57. Curvas ROC de los elementos traza en los casos de sumersión en agua salada..... **176**

1. INTRODUCCIÓN

1.1. ASFIXIA

El término asfixia, del griego *asphyxia* o detención del pulso, fue acuñado en la época galénica y se utilizó para designar las muertes repentinas acompañadas de paro cardíaco (DiMaio y DiMaio, 2001; Shkrum y Ramsay, 2007). Posteriormente se ha relacionado con la dificultad o detención de la función respiratoria y con tal significado persiste en la literatura médico-legal y en el lenguaje coloquial (Saukko y Knight, 2004; Spitz, 2006).

La vía que debe seguir el oxígeno hasta la intimidad celular es larga por lo que son varias las posibilidades de que no pueda ser aprovechado adecuadamente y se instaure una situación de hipoxia o anoxia hísticas. Las causas pueden ser múltiples y se pueden describir cuatro tipos de hipoxia o anoxia (Concheiro Carro y Suárez Peñaranda, 2004):

- *Hipoxémica*. Consiste en la disminución de la concentración de oxígeno en la sangre y puede ser debida a la escasez de oxígeno en la atmósfera respirada, obstrucción al flujo de aire o una enfermedad pulmonar.
- *Isquémica o circulatoria*. Aquí el déficit de oxígeno se relaciona con una incapacidad para mantener un flujo circulatorio adecuado, ya sea por fallo cardíaco o por shock.
- *Anémica*. Se debe a una disminución de la capacidad de transporte de oxígeno por la sangre, como ocurre en las anemias, hemoglobinopatías o intoxicaciones por CO.

- *Histotóxica*. En ella las células son incapaces de utilizar adecuadamente el oxígeno que les llega. Las causas son generalmente debidas a alteraciones de los propios tejidos y no a una aportación insuficiente de oxígeno. Un ejemplo típico está en los tóxicos, como el ácido cianhídrico.

Los cuatro grupos descritos son causas de muerte habituales en medicina legal y forense, pero de entre ellas, el primer grupo es sin duda la causa más frecuente.

Existe una gran discrepancia entre autores a la hora de clasificar las asfixias. Sauvageau y Boghossian (2010) proponen una clasificación unificada basada en el contexto forense:

- *Sofocación*: Término amplio asociado con la falta de oxígeno. Puede ser provocada por oclusión de los orificios respiratorios, oclusión intrínseca de las vías respiratorias o por carencia de aire respirable.
- *Estrangulación*: Asfixia por el cierre de los vasos sanguíneos y/o conductos de aire del cuello como resultado de la compresión externa del cuello. Esta presión en el cuello se puede ejercer con las manos o los antebrazos, mediante una banda de constricción apretada por una fuerza que no sea el peso corporal, o mediante una banda de constricción apretada por el peso gravitacional del cuerpo o parte del cuerpo (ahorcadura).
- *Asfixia mecánica*: Asfixia por la restricción de los movimientos respiratorios, ya sea por la posición del cuerpo o por la compresión externa del pecho. Este tipo de asfixia puede ser postural, donde la posición de un individuo compromete la capacidad respiratoria, o traumática, causada por la compresión externa del pecho por un objeto pesado.

- *Sumersión*: Asfixia producida por la introducción de un medio líquido, habitualmente agua, en las vías respiratorias.

1.2. MUERTE POR SUMERSIÓN

1.2.1. Concepto

Son muchas las definiciones de muerte por sumersión que podemos encontrar en la literatura que pueden ser confusas o ser interpretadas de forma diferente en el ámbito de la medicina legal (Roll, 1918; Modell 1981; Van Dorp, 2002; Idris et al., 2003; Concheiro y Suárez, 2004; Papa et al., 2005).

Una de las más clásicas es la realizada por Roll (1918) quien la definía como *“el resultado de obstaculizar la respiración por obstrucción de la boca y la nariz por un medio fluido, generalmente agua”*.

Tras el Primer Congreso Mundial sobre asfixia por sumersión celebrado en Amsterdam en el 2002, se elaboró una guía de recomendaciones y definiciones de sumersión, lo que se conoce como el *“estilo Utstein”*, con el objetivo de mejorar la claridad de la comunicación científica. Aquí se definió la sumersión como *“el proceso de experimentar insuficiencia respiratoria por la sumersión o inmersión en un medio líquido, de modo que el fluido que rodea a la víctima llega a bloquear las vías respiratorias e inhibir la respiración. La víctima puede vivir o morir después de este proceso”* (Idris et al., 2003).

Concheiro y Suárez (2004) definen la sumersión, en sentido médico-legal, como *“la muerte o el trastorno patológico producidos por la introducción de un medio líquido, habitualmente agua, en las vías respiratorias”*.

Es conveniente no incluir bajo el concepto de sumersión los cuadros resultantes de la penetración de material semilíquido o pastoso en las vías aéreas, ya que los trastornos fisiopatológicos resultantes no vienen a coincidir con los producidos por el agua y son mucho más parecidos a los que se producen en los casos de sofocación por obstrucción intrínseca de las vías respiratorias.

Podemos distinguir varios tipos de sumersiones según:

- El curso evolutivo de la sumersión:

- *Sumersión primaria*, cuando la muerte sigue inmediatamente a la sumersión.

- *Sumersión secundaria*, cuando la penetración líquida ocasiona tan sólo un trastorno patológico que, eventualmente, puede ocasionar también la muerte en un momento posterior.

- La superficie corporal cubierta por el agua:

- *Sumersión completa*, cuando la totalidad del cuerpo está inmerso en el agua.

- *Sumersión incompleta* si tan sólo la cabeza, o en los casos más extremos, únicamente los orificios respiratorios, se encuentran cubiertos por el agua.

- La naturaleza del agua en la que se produce la sumersión:

- *Sumersiones en agua dulce*.

- *Sumersiones en agua salada*, con diferencias fisiopatológicas entre ambas.

- La cantidad de agua encontrada en los pulmones:
 - *Asfixia por sumersión*, cuando se encuentran grandes cantidades de agua en las vías respiratorias.
 - *Muerte en el agua con pulmones secos*, cuando se encuentra un cuerpo en el agua sin presentar líquido en los pulmones.

- La presencia de testigos:
 - *Con testigos*, cuando se observa a la víctima desde el inicio de la sumersión/inmersión.
 - *Sin testigos*, cuando la víctima se encuentra en el agua y nadie vio lo que le pasó.

El diagnóstico de muerte por sumersión es uno de los grandes problemas que se plantean en medicina legal y forense debido a la dificultad, por un lado, para llegar a un diagnóstico definitivo de la causa de la muerte y, por otro, para determinar las circunstancias en las que se ha producido. Por ello se necesita la colaboración de especialistas de diferentes disciplinas para conseguir establecer un diagnóstico certero: se requiere de una autopsia meticulosa y lo más completa posible, de hallazgos histológicos, de análisis toxicológicos, de la realización del mayor número posible de pruebas complementarias y también de los datos facilitados por la investigación policial (Esiyok et al., 2006).

1.2.2. Datos epidemiológicos

Aproximadamente medio millón de personas mueren al año en todo el mundo a causa de asfixia por sumersión (Salomez y Vincent., 2004) y se estima que dicha cifra está muy por debajo de las cifras reales, ya que muchos casos no son informados o registrados (De Nicola et al., 1997).

Datos disponibles de la Organización Mundial de la Salud vienen a poner de manifiesto una tasa de mortalidad de 7 casos por 100.000 habitantes (World Health Organization, 2010). Estas cifras colocan a la asfixia por sumersión como la segunda causa de muerte no intencional, tras las producidas por accidentes de tráfico (Beeck et al., 2005).

En un gran número de países desarrollados, la asfixia por sumersión tiene una alta incidencia en niños menores de 5 años y en jóvenes con edades comprendidas entre 14 y 24 años (Blum y Shield, 2000; Mulligan-Smith et al., 2002; Browne et al., 2003), constituyendo la primera o segunda causa de muerte en estos grupos de edad.

En 2007, el Instituto el Instituto Nacional de Estadística recogió que el número de víctimas por sumersión en España fue de 482, con una tasa de mortalidad por causas externas de 10,5 por millón de habitantes (Fundación Mapfre, 2009).

De Nicola et al. (1997) establecen factores de riesgo muy claros entre los que destacan:

- La edad: menores de 20 años y en especial, menores de 4 años (Canturk et al, 2007).
- Enfermedades preexistentes: epilepsia (aumenta el riesgo 13 veces), enfermedad coronaria, accidentes cerebrovasculares, hipoglucemia aguda (Diekema et al., 1993, Bradley et al., 1999; Quan y Cummings, 2003; Choi et al., 2004).
- El consumo de alcohol y drogas, con especial incidencia en los jóvenes (Plueckhahn, 1984; Driscoll et al., 2004; Gorniak et al., 2005).

- El sexo, con predominio en sujetos varones (Gulliver y Begg, 2005).
- La falta de precauciones en el caso de los niños con una supervisión adulta inadecuada (Blum y Shield, 2000, Schyllander et al., 2013).
- Traumatismos de cabeza y cuello (Watson et al., 2001; Hwang et al., 2003).

En la *Tabla 1* se muestran las tasas de mortalidad para esta variedad de asfixia.

	Total	AFR	AMR	EMR	EUR	SEAR	WPR
Hombres	281.717	67.654	20.181	20.712	30.322	55.258	87.600
Mujeres	127.555	23.311	4.408	6.904	7.196	36.520	49.216
Total	409.272	90.965	24.589	27.616	37.518	91.778	136.816
Ratio por sexo	2,2:1	2,9:1	4,6:1	3:1	4,2:1	1,5:1	1,8:1
%	100	22,3	6	6,8	9,1	22,4	33,4
Ratio por 100.000	6,8	14,2	3	5,7	4,3	6	8,1

**AFR: Africa; AMR: América; EMR: Región del este Mediterráneo; EUR: Europa;
SEAR: Sureste asiático; WPR: Región del Pacífico oeste**

Tabla 1. Muertes por sumersión distribuidas por sexo y región (WHO, GBD 2000).

1.2.3. Etiología médico-legal

Se conocen 3 formas etiológicas de asfixia por sumersión, aunque son las dos primeras las únicas que tienen una incidencia real.

- *Sumersión accidental:* es la más frecuente de todas y se produce por caída accidental. Presenta un pico de máxima incidencia en los meses de verano (Gabbe et al., 2005; Schwebel et al., 2007), en niños menores de 5 años

(Orlowski et al., 2001) y en jóvenes con edades comprendidas entre 15 y 24 años (Runyan et al., 2005), así como en ancianos (Kido et al., 2005). Se evidencia un predominio de hombres sobre mujeres y cada vez más una relación con el consumo de alcohol u otros tóxicos (Gorniak et al., 2005; Gulliver y Begg, 2005). Se incluyen en este apartado todas las muertes derivadas de accidentes colectivos (naufragios, inundaciones, accidentes aéreos, de automóvil con caída secundaria al mar) y deportivos (Romero et al., 1997, Winskog, 2012).

- **Sumersión suicida:** presenta una incidencia significativamente menor que la etiología accidental (Avis, 1993; Byard et al., 2001). De todos los procedimientos suicidas, la asfixia por sumersión no constituye un procedimiento de elección en nuestro medio, siendo ampliamente sobrepasada por la precipitación, la ahorcadura, el empleo de tóxicos y, en algunos países, por el uso de armas de fuego. Algunas publicaciones señalan una mayor incidencia en determinadas áreas geográficas en las que existe cierta cercanía de la costa, grandes lagos o ríos (Gamero et al., 1997; Lucas et al., 2002). Las estadísticas evidencian un predominio en el sexo femenino y en grupos de edad mayores que en los casos de etiología accidental además de su predominio en épocas frías del año. Hoy en día la mayoría de los autores coinciden en señalar que esta forma suicida supone del 10 al 20% del total de las sumersiones (Giersten, 1970) y que representan el 1% de las formas de suicidio (Wirthwein et al., 2002).
- **Sumersión homicida:** Es muy poco frecuente, requiriendo una gran desproporción de fuerzas entre el agresor y la víctima o bien que ésta última se encuentre indefensa por traumatismos previos o por la administración de alcohol y/o tóxicos (Copeland, 1985a, 1986). Por su difícil demostración, obliga

a extremar la precaución en la búsqueda de lesiones previas de diverso tipo y restos de tóxicos depresores del SNC, planteando la duda en el diagnóstico diferencial con formas suicidas. Presenta mayor incidencia en niños, mujeres, disminuidos psíquicos y en sujetos que presentan especial vulnerabilidad.

1.2.4. Data de la sumersión

La determinación de la data de la sumersión se basa en la valoración del estado evolutivo en el que se encuentren los fenómenos cadavéricos y en los cambios inducidos por las fases más tempranas de la putrefacción cadavérica, siendo preciso puntualizar que, en algunos casos, podrá no coincidir la data de la sumersión con la data de la muerte. Además, estos cambios están fuertemente condicionados por la temperatura del medio de sumersión en el que se encuentre el cadáver (Romero, 2007).

El diagnóstico del tiempo de permanencia del cadáver en el agua sigue constituyendo hoy en día un complicado problema, por lo que se han elaborado una serie de tablas haciendo una valoración global de la data a partir de las diferentes manifestaciones o signos que puedan apreciarse en el cadáver.

De todas las tablas publicadas al respecto, la de Reh (1975) es la más precisa. En esta tabla se valoran distintos parámetros de forma diferenciada en cada uno de los meses del año, haciendo especial mención a la temperatura media del agua en cada uno de ellos. Estos parámetros son los cambios cromáticos de la piel, el desarrollo de gases de la putrefacción, manifestaciones de la maceración de la piel, desprendimiento de la epidermis, cabellos y uñas, etc.

Como complemento de esta tabla, pueden citarse las investigaciones de Bray (1985) en casos de sumersión en agua dulce, de las que se deduce una fórmula en la que incluye las concentraciones de potasio y cloruro en humor vítreo, pero sólo para las sumersiones en agua fría y para un periodo post-mortem entre 2 y 10 días.

Finalmente, también se ha intentado aplicar la saponificación de los cadáveres, siempre que ésta sea evidente, a la determinación de la data de la sumersión, aunque dada la gran variabilidad de plazos en el inicio y desarrollo de este proceso conservador que depende de múltiples factores y circunstancias, el pronunciamiento sólo puede establecerse dentro de unos amplios márgenes.

1.2.5. Fisiopatología y mecanismos de muerte

Las circunstancias previas en las que se produce la asfixia por sumersión pueden ser muy variadas (Modell, 1993) y esto explica los variados hallazgos necrósicos y los diferentes mecanismos por los que se produce la muerte (Noble y Sharpe, 1963; Hasibeder, 2003).

Zangani et al. (1985) describen en cinco fases el mecanismo de muerte de los casos de asfixia por sumersión:

- **1ª fase** de sorpresa, en que se realiza una profunda inspiración fuera del agua.
- **2ª fase** de apnea (paro respiratorio), para evitar la penetración del agua. Se produce un laringoespasma involuntario por la presencia de agua en la vía aérea. La respiración no es posible durante esta fase y se produce la hipoxia, la hipercapnia y la acidosis.

- **3ª fase** de disnea, en la que se realiza la inhalación de agua, que va seguida de una disnea respiratoria por estimulación del agua sobre la mucosa laríngea.
- **4ª fase** de convulsiones asfícticas, en la que el líquido continúa penetrando de forma discontinua en las vías respiratorias.
- **5ª fase** o fase terminal, en la que no hay intercambio gaseoso. Al caer la tensión arterial de oxígeno, cede el laringoespasma y la víctima realiza una o más inspiraciones profundas, que van precedidas de una pausa respiratoria preterminal. Finalmente se produce insuficiencia respiratoria y anoxia por la obstrucción de la vía respiratoria y puede producirse la muerte.

La penetración de la columna líquida en las vías respiratorias, llegando a inundar los alvéolos pulmonares, conlleva unos efectos mecánicos de carácter inmediato:

- De una parte, se va a mezclar el aire residual pulmonar con el agua y con sustancias y secreciones pulmonares, dando lugar a la formación de una materia espumosa que ocupará las vías respiratorias, pudiendo exteriorizarse a través de la boca y de los orificios nasales, dando lugar al denominado "hongo de espuma".
- De otra parte, la presión ejercida por la columna líquida sobre el propio aire residual existente en los pulmones, provocará lesiones en el tejido pulmonar, que constituyen parte de los hallazgos anatomopatológicos, tales como zonas de dilatación alveolar, adelgazamiento y rotura de las paredes alveolares, rotura de capilares perialveolares, así como el denominado enfisema hidroaéreo.

Pero también hay que dar una gran importancia a las alteraciones electrolíticas que el agua puede producir al ingresar en el torrente circulatorio (Swann et al., 1947; Swann y Spallford, 1951; Modell et al., 1966), estimándose que las concentraciones de electrolitos en suero pueden ser muy variadas, dependiendo de la cantidad y el tipo de líquido aspirado (Fleetham y Munt, 1978). Dichas alteraciones van a estar condicionadas por la osmolaridad del líquido inspirado:

- En los casos de *sumersión en agua dulce*, la cual es hipotónica con respecto al plasma, cuando el agua llega a los alvéolos es rápidamente absorbida, pasando a la circulación pulmonar. Ello provoca una marcada hemodilución y una hipervolemia, que en algunos casos puede significar un incremento del 30 al 50% (Lawler, 1992). Esta dilución extrema podría producir una situación de hiponatremia, con sobrecarga circulatoria, facilitando la aparición de insuficiencia cardíaca. Asimismo, se va a producir hemólisis por la entrada del líquido de sumersión en el torrente circulatorio, lo que provoca una hiperkaliemia y las consiguientes arritmias, que pueden llevar a la muerte del sujeto en muy pocos minutos. Además, esta hemólisis puede provocar serios trastornos en la coagulación ya que se puede producir una coagulación intravascular diseminada. De otra parte, la aspiración del agua dulce afecta de manera fundamental a los fosfolípidos del surfactante pulmonar (Giammona y Modell, 1967), lo que hace inestables a los alvéolos, favoreciendo la aparición de zonas de atelectasia (Modell et al., 1976).

- En los casos de *sumersión en agua salada*, la cual es hipertónica respecto al plasma, ocurre todo de forma distinta. El líquido de sumersión que ocupa la luz intraalveolar, que puede sobrepasar en tres o cuatro veces la osmolaridad de la sangre (Orlowski, 1987), atrae agua a las vías respiratorias desde la circulación pulmonar, causando, consiguientemente, hipovolemia,

hemoconcentración y edema pulmonar grave. Se produce un incremento de la viscosidad de la sangre e hipernatremia aguda. Por su parte, el edema pulmonar incrementa aún más la situación de hipoxia e hipercapnia, llevando por último al corazón a una situación de bradicardia y asistolia (Lawler, 1992).

Según Layon y Modell (2009), se requiere la aspiración de un gran volumen de fluido para que se pueda producir un cambio significativo en el volumen de la sangre del paciente. Si se aspira más de 11 mL/kg de líquido hipotónico, el volumen de sangre aumentará en proporción directa a la cantidad aspirada (Modell y Moya, 1966b, Layon y Modell, 1992). Si el paciente es resucitado con éxito, este fluido absorbido se redistribuirá rápidamente y la hipovolemia puede ocurrir al cabo de 1 h (Tabeling y Modell, 1983). Sin embargo, cuando se aspira una cantidad significativa de agua de mar hipertónica, la hipovolemia puede sobrevenir rápidamente (Modell et al., 1967). Pero hay que tener en cuenta que la mayoría de las víctimas de sumersión no aspiran líquido suficiente para causar cambios potencialmente mortales en el volumen de la sangre: la muerte por sumersión en humanos supone una aspiración de sólo 2-4 mL/kg (Oehmichen et al., 2008).

Del mismo modo, las concentraciones séricas de los electrolitos pueden cambiar después de la sumersión y esto va a depender de la cantidad y el tipo de líquido aspirado. Un trabajo experimental con perros ha demostrado que no se producían importantes cambios persistentes en las concentraciones de los electrolitos séricos con la aspiración de 22 mL/kg o menos, ya sea de agua dulce o salada (Modell y Moya, 1966b; Modell et al., 1967). Sin embargo, la aspiración de esta gran cantidad de agua es muy poco probable en los seres humanos que sobreviven al proceso de sumersión, encontrándose sólo en el 15% de las personas que mueren por esta causa (Modell y Davis, 1969).

Así, a pesar de que se había pensado que la parada cardiovascular en los ahogados se debía a las graves alteraciones electrolíticas asociadas a grandes volúmenes de líquido inspirado, hoy en día se piensa que la mayor parte de los efectos cardiovasculares de la asfixia por sumersión son fundamentalmente secundarios a la prolongada hipoxia (Bierens et al., 2002; Oehmichen et al., 2008). Los efectos añadidos de la acidosis y la hipercapnia pueden contribuir secundariamente al desencadenamiento final, aunque es la hipoxemia el factor principal (Layon y Modell, 2009). Así, la hipoxemia inicial sufrida por las víctimas de asfixia por sumersión es debida a la apnea, aunque después se ha relacionado más con la lesión pulmonar aguda que se desarrolla como resultado de las alteraciones del surfactante pulmonar, con el colapso alveolar y la atelectasia (Ibsen y Koch, 2002). De otra parte, la grave disfunción pulmonar sufrida por muchas víctimas de sumersión conduce a una insuficiencia respiratoria e hipoxia, que pueden ser suficientes para provocar una parada cardíaca (Olshaker, 1992; Modell, 1993).

A la hora de explicar los mecanismos de la muerte por sumersión, tenemos que diferenciar aquellas muertes que se producen en el agua con los *pulmones secos*, ya que presentan un mecanismo de muerte diferente.

Este tipo de muerte representa entre un 10-15% de los casos de sumersión (Concheiro y Suárez, 1998) y supone el hallazgo de un cuerpo en el agua sin presentar líquido en los pulmones. No se trata, por consiguiente, de una asfixia por sumersión propiamente dicha, ya que el agua no va a penetrar en las vías respiratorias.

Este tipo de muerte puede tener varias explicaciones. Se ha sugerido por diferentes autores que un espasmo de glotis podría ser el mecanismo que impidiese la entrada del agua en las vías respiratorias (Moar, 1983; Shaw y Briede, 1989; Modell et al., 1999). La apnea inicial podría estimular los quimiorreceptores carotídeos,

contribuyendo al desencadenamiento de una parada cardíaca de origen vagal (Shkrum y Ramsay, 2007).

Para otros autores (Lunetta y Modell, 2005), pueden existir varias explicaciones además del laringoespasma, como puede ser la inhibición cardíaca vagal desencadenada por diferentes mecanismos: intenso dolor abdominal ocasionado por el impacto del cuerpo con el agua, shock anafiláctico de origen digestivo en el estado postprandial o el reflejo inhibidor cardiorrespiratorio y apoplejía central por acción del frío. La aparición de estos tipos de muerte puede verse favorecida cuando la víctima se encuentra bajo la influencia del alcohol u otras sustancias tóxicas y, en todo caso, cuando la temperatura del agua es muy baja (Gardner, 1942).

Algunos autores indican que la hipotermia suele estar asociada a los cuadros de asfixia por sumersión, sobre todo en el caso de los niños (Salomez y Vincent, 2004). Cuando la temperatura corporal disminuye, el temblor aumenta el consumo de oxígeno y la actividad metabólica, en un intento de aumentar la producción de calor. Por debajo de 30°C, el temblor cesa, el ritmo cardíaco se enlentece, disminuye la presión sanguínea, y el consumo de oxígeno y la velocidad metabólica también disminuyen. Los pacientes se encuentran de este modo en una situación de riesgo de bradicardia extrema, asistolia o fibrilación ventricular (Steinman, 1986). De forma paradójica, la sumersión en agua fría se asocia, en los casos de supervivencia, con un mejor pronóstico que en agua caliente, sobre todo en niños (Wollenek et al., 2002).

1.2.6. Pronóstico de supervivencia

Los efectos de la sumersión podrían ser resumidos en asfixia, hipoxia cerebral y, a menudo, hipotermia. De todos, la hipoxia cerebral es el factor limitante a la hora de conocer el pronóstico de la víctima. Como existe una amplia variedad de factores que

influyen en el desarrollo de la hipoxia cerebral, es muy difícil estimar durante una primera evaluación de la víctima la extensión del daño cerebral. Las respuestas a varias preguntas pueden servir como valor pronóstico (Schilling and Bortolin, 2012):

- *¿Hubo testigos del accidente de sumersión?* Esta información nos permite estimar la duración de la hipoxia. Se asume que las víctimas de los accidentes de sumersión en los que no hay testigos presenciales han estado sumergidas durante un largo periodo de tiempo y han sufrido hipoxia severa.

- *¿En qué tipo de fluido se ha sumergido la víctima? ¿A qué temperatura estaba ese fluido?* Los distintos tipos de microorganismos presentes en ciertos fluidos podrían causar infecciones con posterioridad.

- *¿Estaba la víctima inconsciente cuando fue rescatada?* La víctima presenta un mejor pronóstico si no estaba inconsciente o recuperó pronto la consciencia.

- *¿La víctima presentaba cianosis?* Este factor puede ser difícil de evaluar ya que la cianosis indica que la reserva de oxígeno de la víctima se ha agotado y que la víctima ha estado sumergida durante un largo periodo de tiempo, dando lugar a una prolongada hipoxia. Sin embargo, la vasoconstricción periférica puede dar lugar a una cianosis periférica en nadadores en agua fría, lo cual limita el valor de esta información.

- *¿La víctima presentaba algún signo de vida durante el rescate?* El tener conocimiento, respiración espontánea y una circulación estable indica un mejor pronóstico que la inconsciencia y el fallo respiratorio y circulatorio.

- ¿Fue llevada a cabo la RCP antes de la llegada de los servicios sanitarios? Una pronta y efectiva RCP reduce el tiempo de hipoxia y puede mantener la oxigenación cerebral. La pulsioximetría no es exacta en el tratamiento de pacientes hipotérmicos.

Así, el pronóstico de las víctimas de sumersión es muy variable y va desde la completa recuperación hasta una discapacidad neurológica grave o la muerte. Un fatal desenlace se relaciona con la hipoxia cerebral, síndrome de distrés respiratorio agudo, fallo multiorgánico secundario a la hipoxia y la sepsis causada por aspiración o infección nosocomial (Idris et al., 2003).

Se han descubierto varios algoritmos para proporcionar una adecuada estimación del resultado final tan pronto como el paciente llega al hospital. Los casos más difíciles de estimar son aquellos en los que la víctima de sumersión llega inconsciente. Pero aunque proporcionan cierto valor pronóstico, estos algoritmos no son precisos 100%. Aunque de la evaluación de estos pacientes se pueda llegar a distinguir entre un pronóstico favorable y uno pesimista, cierta proporción de pacientes juzgados con un mal pronóstico en una primera evaluación, pueden llegar a recuperarse sin secuelas si son tratados con tratamientos agresivos, y estos pacientes no han podido ser detectados en una fase inicial (Salomez y Vincent, 2004; Modell et al., 2004; Barbieri et al., 2008; Longhi y Paterno, 2009).

En 2003, el Comité Internacional de Coordinación de la Reanimación (ILCOR) publicó *“el estilo Utstein para asfixias por sumersión”* (USFD), una guía de recomendaciones y definiciones de sumersión con el objetivo de mejorar la claridad de la comunicación científica de los informes presentados en los casos de sumersión, tanto en términos de nomenclatura como en las directrices a seguir al comunicar los datos de la sumersión. Así, mejoradas la claridad y la comparabilidad de los futuros

informes científicos se podrá avanzar en la base de los conocimientos clínicos y epidemiológicos. A su vez, estos estudios podrán ayudar a identificar las estrategias de prevención adecuadas así como el mejor tratamiento para las víctimas de sumersión y en última instancia, poder salvar vidas (Idris et al., 2003).

En este consenso se ha desarrollado un modelo de informe para ayudar a los investigadores a informar los métodos y resultados obtenidos. En este modelo de informe se deben incluir:

- *Datos básicos*: deben ser recogidos en todos los estudios. Son datos que se consideran importantes y factibles de ser informados por cualquier investigador.

- *Datos complementarios*: se consideran datos importantes pero no esenciales. Suponen una información valiosa que es difícil de recoger de forma fiable.

Los datos básicos y complementarios del modelo de informe publicado en el USFD son los siguientes:

A.- Información de la víctima

Datos básicos:

- Identificación de la víctima.
- Sexo (hombre/mujer).
- Edad (meses o años).
- Fecha y hora de la sumersión.
- Causa de la sumersión.

Datos complementarios:

- La raza o categoría étnica.
- Lugar de residencia.
- Enfermedad previa.

B.- Información de la escena

Datos básicos:

- ¿Hubo testigos de la sumersión?
- ¿Dónde ocurrió la sumersión? (piscina, océano, lago, río, etc).
- ¿La víctima estaba inconsciente cuando fue rescatada del agua?
- ¿La víctima fue reanimada antes de llegar los servicios de emergencia?
- ¿Fue necesario llamar a los servicios de emergencia?
- Evaluación de los signos vitales (respiración, pulso).
- Tiempo del primer intento de resucitación por los servicios de emergencia.
- Estado neurológico (Escala de coma de Glasgow).

Datos complementarios:

- Tipo de agua (agua dulce, agua salada, agua con componentes químicos, etc).
- Aprox. temperatura del agua (°C).
- Tiempo de sumersión, si se conoce.
- Tiempo de recuperación de la víctima del agua.
- Cianosis (sí/no).
- Método de reanimación cardiopulmonar (RCP).
- ¿Quién hizo la RCP?
- ¿Fue enviado un vehículo de los servicios de emergencia?

- Tiempo de la primera evaluación por los servicios de emergencia.
- Saturación de oxígeno, temperatura, presión arterial, reacción de las pupilas.

C. Evaluación y tratamiento por el servicio de urgencias

Datos básicos:

- Signos vitales (temperatura, presión sanguínea, ritmo cardíaco, frecuencia respiratoria).
- Saturación de oxígeno de hemoglobina.
- Gasometría arterial (pH, pO₂, pCO₂).
- Estado neurológico inicial (Escala de coma de Glasgow).
- Necesidad de ventilación.

Datos complementarios:

- Reacción de las pupilas.
- Examen toxicológico.

D. Evolución en el hospital

Datos básicos:

- Necesidad de ventilación.

Datos complementarios:

- Evaluación seriada de la función neurológica.
- Desarrollo de enfermedad debido a una complicación de la sumersión.

C. Resultado

Datos básicos:

- Vivo o muerto.
- Fecha de alta del hospital.
- Resultado neurológico al alta hospitalaria.

Datos complementarios:

- Calidad de vida.
- Causa de la muerte.
- Otras lesiones y morbilidad.

Posteriormente, Eich et al. (2007) realizaron un estudio basado en el análisis de estas variables y propusieron otras variables adicionales que podían predecir también el resultado de la sumersión:

- Concentración de potasio sérico.
- Velocidad de recuperación de la temperatura corporal de la víctima.
- Ritmo cardíaco inicial.

1.2.7. Medidas terapéuticas en las víctimas de sumersión

Lo primero de lo que tiene que darse cuenta el rescatador cuando encuentra una víctima de sumersión es de si la víctima respira, si tiene pulso y si tiene lesiones cervicales. Una vez rescatada del agua, las primeras y más importantes medidas a llevar a cabo son la restauración de la circulación y la oxigenación del paciente (Schilling y Bortolin, 2012). El pronóstico final va a estar directamente relacionado con una terapia temprana y RCP, según se requiera (Eich et al., 2005).

En pacientes inconscientes, este tratamiento se consigue mediante el aseguramiento de una vía respiratoria y aplicando los principios de la RCP, similar a los pasos empleados en un fallo cardíaco. Sin embargo, como las víctimas de sumersión a menudo ingieren grandes cantidades de líquido, el riesgo de vomitar y, consecuentemente, aspirar el contenido gástrico aumenta. Para evitar esto, se puede colocar un tubo gástrico después de la intubación.

Hay que tener en cuenta que las operaciones de rescate deben llevarse a cabo con mucha precaución en pacientes hipotérmicos: por un lado, después de producirse una respuesta inicial al frío con una gran pérdida de energía e hipermetabolismo, en la hipotermia se reduce el metabolismo y la demanda de oxígeno. Por lo tanto, los tejidos sobreviven con menos cantidad de oxígeno de lo habitual, de manera que una circulación centralizada residual y una reducción de la respiración pueden ser suficientes para preservar los órganos vitales durante un tiempo limitado, mientras que en los vasos periféricos se produce hipoxia, acidosis e hiperpotasemia. Al llevarse a cabo el calentamiento del paciente, se produce una descentralización de la circulación y los vasos periféricos se abren, pudiéndose producir una redistribución repentina de la sangre fría, acidótica e hiperpotasémica hacia la circulación central, provocando así una fibrilación ventricular.

Hay que tener en cuenta que después de llevar a cabo una primera terapia con éxito, en el 5% de las víctimas de sumersión ocurre un deterioro secundario en las siguientes horas y días. Este deterioro se atribuye al daño pulmonar causado por la anoxia y la aspiración de líquido, lo cual causa lesiones epiteliales y pérdida del surfactante, provocando colapso alveolar, atelectasia, shunt pulmonar y un aumento de infecciones. El resultado final de estos síntomas es el ARDS (Síndrome de distrés respiratorio agudo) (Milne y Cohen, 2006, Clesson et al., 2008). Por lo tanto, las víctimas de sumersión deben ser trasladadas a un hospital para ser reconocidas,

independientemente de lo bien que aparenten estar. El traslado se debe llevar a cabo monitorizando el pulso, la presión sanguínea, la frecuencia respiratoria, el electrocardiograma y la pulsoximetría.

Ya en el hospital, se debe hacer hincapié en el soporte pulmonar, llevando a cabo un tratamiento personalizado, según el estado de cada paciente. Se debe realizar una gasometría arterial para evaluar la adecuación de la ventilación, el estado ácido-base y el intercambio pulmonar de gases del paciente. La terapia debería comenzar por la aplicación de técnicas no invasivas para garantizar la asistencia respiratoria. En los casos severos se debe recurrir a técnicas invasivas como la intubación y la respiración artificial. La terapia antibiótica debe ser empírica y basada en signos de infección o de contaminación severa (Szpilman, 1997).

Así, se deben controlar los niveles de CO₂ para mantener la normocapnia, ya que con hipercapnia se produce vasodilatación cerebral con el consiguiente aumento de la presión intracraneal y con hipocapnia se produce vasoconstricción cerebral que lleva a una hipoxia cerebral.

También es necesario controlar los niveles de glucosa tratando adecuadamente la hiperglucemia pero sin provocar hipoglucemia, ya que ambas situaciones pueden deteriorar el estado crítico del paciente.

La isquemia en los órganos provoca una respuesta inflamatoria sistémica (SIRS) que tiene como resultado el aumento de la circulación sanguínea hacia los capilares. Por lo tanto, en las víctimas de sumersión se produce hipovolemia provocada por los cambios en la distribución del volumen plasmático. En estos casos puede ser necesario el tratamiento con soluciones acuosas de sales minerales (suero salino) u

otras moléculas solubles en agua (lactato, acetato, dextrosa) para aumentar el volumen sanguíneo.

En pacientes que sufren comas prolongados, la muerte cerebral podría estar declarada después de 24-72 horas. Se pueden utilizar distintas técnicas para valorar la extensión del daño cerebral, siendo útiles en el laboratorio la monitorización de la proteína S-100 o la enolasa específica de neuronas (NSE) (Schilling y Bortolin, 2012).

1.2.8. Principios generales a seguir en el estudio de los casos de sumersión

Piette y De Letter (2006) establecen que a la hora de valorar un caso de sumersión se deben tener en cuenta los siguientes principios generales (*Figura 1*):

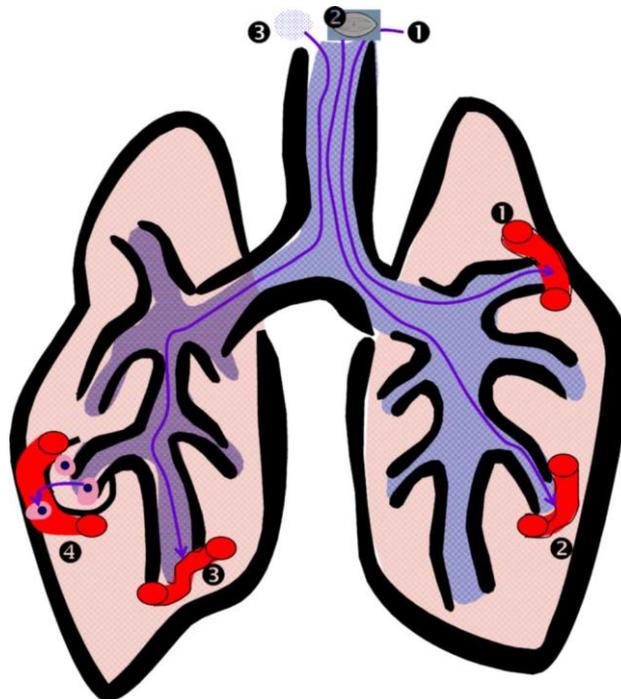


Figura 1. Principios generales en el estudio de la sumersión: 1. Hemodilución; 2. Partículas en el agua de sumersión (por ejemplo: diatomeas); 3. Elementos disueltos en el agua de sumersión; 4. Partículas o elementos celulares en los alveolos.

1. *El agua entra en la circulación sanguínea por difusión y ósmosis (hemodilución).* Esto ha sido demostrado por los experimentos con animales realizados por Brouardel y Vibert (1880) a finales del siglo XIX. Varios métodos químicos y físicos han sido presentados con el fin de demostrar esta hemodilución (Schwär, 1972). Sin embargo, estos métodos sólo se pueden aplicar cuando la autólisis y la putrefacción no han tenido lugar. Además, en ellos interfiere la reanimación cardiopulmonar (Jeanmonod et al., 1992). Por ello, algunos investigadores consideran que estos métodos son obsoletos (Wetli et al., 1988).
2. *Las partículas en suspensión del agua de sumersión entran en la circulación sanguínea.* Esto implica que, durante el proceso de sumersión, además de los procesos de difusión y ósmosis, se producen pequeñas lesiones en las membranas alveolares y como resultado, las partículas presentes en el agua de sumersión pueden entrar en la circulación sanguínea. Corin y Stockis demostraron que elementos cristalinos suspendidos en el agua de sumersión se pueden encontrar en las cavidades izquierdas del corazón (Stockis, 1909, Corin, 1909; Corin y Stockis, 1909; Stockis, 1921). Pero los métodos de Corin y Stockis pasaron a desuso y unas décadas más tarde se introdujo la investigación de la presencia de diatomeas en sangre y órganos (Peabody, 1980). Sin embargo, poco después de establecer este método, surgieron críticas desfavorables y, en la actualidad, no existe todavía acuerdo entre los defensores y los opositores. Otra posibilidad es la prospección de protozoos ciliados en sangre en los casos de sumersión en agua dulce (Chardez y Lambert, 1985).
3. *Las sustancias químicas disueltas en el agua de sumersión que se encuentran en muy bajas concentraciones en el cuerpo humano (elementos traza), pueden entrar en la circulación sanguínea.* Teóricamente, el método perfecto debe cumplir las

siguientes premisas: el marcador debe tener la posibilidad de atravesar la membrana alveolo-capilar para entrar en la circulación, debe estar presente en grandes cantidades en el agua de sumersión y en cantidades muy pequeñas en la sangre de personas sanas y no debe haber entrado en la circulación por otros medios, como a través del tracto gastrointestinal o debido a procesos de difusión post-mortem. El mérito de este enfoque teórico se debe a Icard (1932), lo cual fue posteriormente demostrado gracias a los experimentos en animales realizados por Abdallah et al. (1985).

4. *Elementos celulares o corpusculares presentes en los alveolos pulmonares pueden aparecer en la circulación sanguínea después de la sumersión.* El estudio de estos elementos se ha llevado a cabo desde hace unas décadas (Möttönen et al., 1971; Karkola y Neittaanmäki, 1981; Reiter, 1984), sin embargo, son pocos los casos publicados. Además, estos métodos no son aplicables a todos los casos de sumersión, por ejemplo, las células de fumadores sólo pueden ser detectadas en personas fumadoras. Otras sustancias estudiadas son los cuerpos de asbestos y el surfactante pulmonar.

1.2.9. Hallazgos necrópsicos

1.2.9.1. Examen externo

En el examen externo del cadáver recuperado del agua, con independencia de su mecanismo de muerte, se pueden encontrar una serie de alteraciones de diverso origen (Sibón Olano et al., 2005; Romero, 2007):

- Signos propios de la reacción vital:

- *Hongo de espuma*: Se trata de una espuma de finas burbujas de color blanquecino o rosáceo que aflora por los orificios nasales y la boca. Constituye un elemento indicativo de asfixia por sumersión aunque puede aparecer en otras variedades de asfixia así como en otro tipo de muertes en las que se produce edema de pulmón (*Figura 2*).



Figura 2. Hongo de espuma.

- *Espasmo cadavérico*: En algunas ocasiones puede apreciarse un espasmo localizado a nivel de las manos, cuyos dedos, fuertemente flexionados, suelen retener arena o briznas de vegetación o algas del fondo del río, lago o mar donde se produjo la sumersión. Tiene un claro significado de reacción vital (Lawler, 1992; Concheiro Carro y Suárez Peñaranda, 2004).

- *Livideces cadavéricas*: Suelen tener una tonalidad mucho más clara que en el resto de las asfixias mecánicas, hecho que puede ser explicado en parte por la hemodilución y también por la permanencia del cadáver a una temperatura en general bastante más baja que la ambiental. En los casos en los que el cadáver se encuentra en aguas vivas, su continua movilización y rotación hacen que las livideces no aparezcan de un modo definido.

- Signos debidos a la permanencia prolongada del cadáver en el agua:
 - *Piel con aspecto anserino* (cutis anserina): consecuencia del proceso de rigidez que sufren los músculos erectores del pelo, la cual se ve favorecida, en su caso, por la baja temperatura del medio de sumersión.
 - *Enfriamiento corporal precoz*: El íntimo contacto entre el agua y la superficie corporal provoca una rápida nivelación de la temperatura.
 - *Maceración cutánea*: En los momentos iniciales aparece como blanqueamiento, engrosamiento y arrugamiento de la epidermis, especialmente a nivel de las palmas de las manos y las plantas de los pies, pero cuando la permanencia en el agua se prolonga, acaba desprendiéndose en forma de guante o calcetín; también los pelos y las uñas pueden desprenderse con facilidad.
 - *Evolución de la putrefacción cadavérica*: Está influenciada por la temperatura del medio en que el cadáver está sumergido. Mientras que el cadáver permanece sumergido, la putrefacción parece seguir un ritmo más lento que si se encontrase al aire libre. Una vez recuperado el cadáver del agua, la putrefacción se acelera considerablemente.
 - *Saponificación*: Aparece cuando la permanencia prolongada del cadáver tiene lugar en agua estancada o con poca corriente.
 - *Lesiones externas*: Pueden dar lugar a problemas de interpretación. En algunos casos, las lesiones tienen un marcado carácter vital (lesiones de etiología homicida); en otros casos, las lesiones obedecen a un mecanismo contusivo grave al caer sobre un fondo rocoso o sólido. En la mayoría de los

casos pueden encontrarse también lesiones post-mortem que se producen por el arrastre del cadáver sobre las irregularidades del fondo bajo la acción de las corrientes de agua.

1.2.9.2. Examen interno

Los hallazgos necróticos que podemos encontrar en el examen interno van a depender del mecanismo de la muerte (Sibón Olano et al., 2005):

- Cuando el mecanismo de la muerte es el denominado sumersión-inhibición, en el que el individuo queda en muerte aparente dentro del agua debido al reflejo inhibitorio vagal que produce una parada brusca de las funciones cardio-respiratorias, los hallazgos que podemos encontrar son escasos, salvo una congestión inespecífica generalizada.
- Cuando el mecanismo de la muerte es el denominado sumersión-asfixia simple, sin paso de agua a los pulmones por probable laringoespasmó, hallaremos agua en el aparato digestivo y signos inespecíficos de los cuadros de asfixia.
- Cuando el mecanismo de la muerte es el denominado sumersión-ahogamiento propiamente dicho, con penetración de agua en las vías respiratorias, vamos a encontrar la mayor riqueza en el estudio macroscópico.

Así, los hallazgos necróticos más característicos de la asfixia por sumersión se van a localizar en el aparato respiratorio y están directamente relacionados con la penetración del líquido de sumersión en las vías respiratorias (Romero, 2007).

- *Hemorragias intramusculares*: Se han descrito hemorragias localizadas a nivel del cuello, tronco y extremidades superiores (Carter et al., 1998; Püschel et al., 1999), cuyo mecanismo se ha atribuido a las convulsiones agónicas y al sobreesfuerzo realizado por los diferentes grupos musculares durante la anoxia.

- *Pulmones*: Ambos pulmones aparecen extraordinariamente aumentados de volumen, hasta el punto de que llegan a solaparse los bordes anteriores de las lengüetas pulmonares, ocultando el saco pericárdico (*Figura 3*).



Figura 3. Aumento de tamaño de los pulmones.

Diseminadas por la superficie pulmonar aparecen las *equimosis o manchas de Paltauf*, de localización subpleural, de coloración más clara y de mayor tamaño que las equimosis de Tardieu (aparecen en otras modalidades de asfixia), las cuales están relacionadas con el proceso asfíctico, a la vez que con el componente traumático ejercido por la penetración del agua (*Figura 4*).

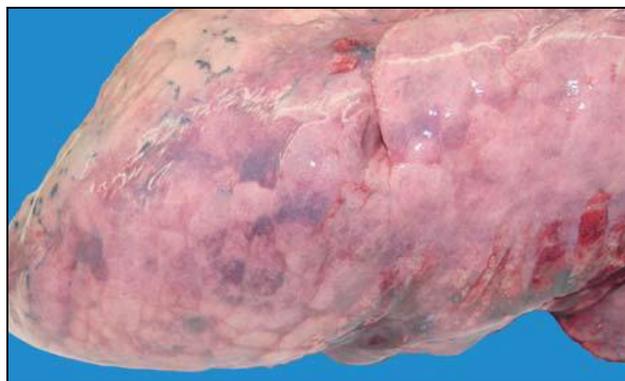


Figura 4. Manchas de Paltauf.

Cuando se realiza forcipresión se aprecia una crepitación característica debido a la existencia de enfisema y de edema, con una elasticidad manifiestamente disminuida, persistiendo la huella dejada por la presión (**fóvea**).

Al corte crepitan, dejando escapar gran cantidad de aire, apreciándose una gran congestión pulmonar, fluyendo por las superficies de sección abundante sangre, de aspecto espumoso, mezclada con el líquido de sumersión. Así mismo, pueden apreciarse focos hemorrágicos intrapulmonares.

La tráquea y los bronquios se encuentran ocupados por espuma blanquecina o sonrosada que se continúa hacia el exterior dando lugar al hongo de espuma. En ocasiones, puede apreciarse también restos de productos del vómito y de la vegetación existente en el medio de sumersión (*Figura 5*).

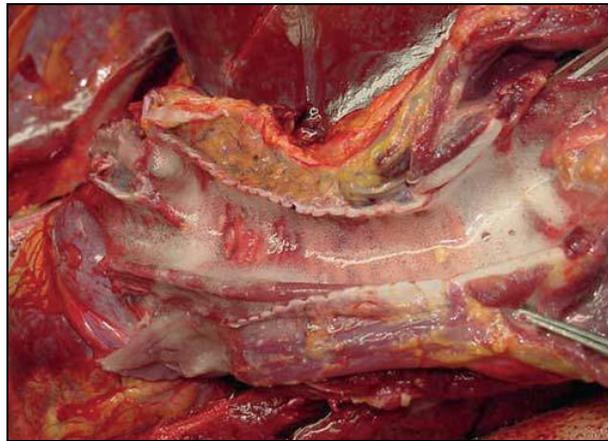


Figura 5. Espuma traqueobronquial.

Se ha estudiado el peso de los pulmones, pudiendo afirmarse, en términos generales, que en la asfixia por sumersión suele ser elevado respecto a otros tipos de muerte (Copeland, 1985b; De La Grandmaison et al., 2001; Hadley y Fowler, 2003), aunque no se ha encontrado ninguna diferencia significativa entre el peso de los pulmones de ahogados en agua dulce o agua salada (Kringholm et al., 1991).

Pero hay que tener en cuenta que no siempre se encuentran estos hallazgos patológicos en los casos de sumersión. Lunetta et al. (2002), después de estudiar 1590 casos de cuerpos encontrados muertos en el agua, llegaron a la conclusión de que sólo el 11% de todos los casos mostraban una combinación de hallazgos patológicos exclusivos de los casos de sumersión (hongo de espuma y solapamiento de los bordes anteriores de los pulmones), quedando el 60% de los casos sin encontrar hallazgos patológicos concluyentes para poder realizar un diagnóstico definitivo de muerte por sumersión. Posteriormente, un estudio realizado por Somers et al. (2006), en el que hacen una revisión de los casos de sumersión ocurridos durante 20 años en niños entre 9 meses y 17 años, demuestran que, incluso con períodos cortos de reanimación, se alteran significativamente los hallazgos patológicos en la autopsia, disminuyendo la incidencia de hallazgos como la espuma blanquecina en tráquea y bronquios, aumento de líquido en la cavidad pleural y aumento de peso de los pulmones. Por ello es necesario conocer el historial de reanimación para poder interpretar con precisión los hallazgos patológicos.

- *Cavidades pleurales*: Con frecuencia aparecen ocupadas por líquido seroso o serohemático. Se estima que, en los cuerpos recuperados del agua, dicho derrame pleural es la consecuencia de la difusión post-mortem de los líquidos pulmonares (Terazawa y Haga, 1996). Así, varios autores afirman que existe una relación evidente entre el intervalo post-mortem y el volumen del derrame pleural (Morild, 1995; Yorulmaz et al., 2003; Zhu et al., 2003a). Este signo carece de valor en los casos en los que la putrefacción está avanzada.

- *Corazón*: Se ha visto que la dilatación del ventrículo derecho que puede apreciarse en algunos casos, es consecuencia de la situación de hipervolemia y de la resistencia vascular pulmonar (Gordon et al., 1988). El ventrículo izquierdo suele ser normal y estar exangüe.

- **Aparato digestivo:** Durante la autopsia se puede encontrar medio de sumersión y cuerpos extraños que pudieran acompañarle a nivel del estómago e incluso del intestino delgado, los cuales podrían haber sido deglutidos durante la primera fase de la sumersión (Chiodi et al., 1978), aunque habría que descartar que este medio hubiera podido penetrar en el cuerpo post-mortem de forma pasiva y en pequeñas cantidades (Knigh, 1996). Se puede admitir que si la cantidad de líquido es superior a 500 mL en un sujeto adulto, se trata de una sumersión intravital, por cuanto que no es posible admitir una penetración post-mortem tan abundante (Concheiro y Suárez, 2004). Además, la presencia de agua en el duodeno, cuando la putrefacción aún no es evidente, tendría la misma significación. De forma ocasional pueden apreciarse desgarros de la mucosa gástrica, a la altura del cardias, consecuencia quizás de los vómitos producidos por la deglución de grandes cantidades de agua.

- **Bazo:** Se ha observado que en los casos de sumersión, el bazo puede aparecer pequeño y anémico debido a la estimulación simpática con vasoconstricción y contracción de la cápsula esplénica y de las trabéculas (Reh, 1970; Haffner et al., 1994), aunque hay quien piensa que es un fenómeno post-mortem en los casos de sumersión prolongada (Hadley y Fowler, 2003).

- **Oído medio:** En el oído medio y en la región mastoidea pueden aparecer focos de infiltración hemorrágica que se transparentan a través del techo del peñasco con una coloración azulada muy característica. Generalmente se acompañan de edema submucoso y congestión vascular.

- **Sangre. Hemodilución:** La sangre contenida en las cavidades izquierdas del corazón, proveniente de la circulación pulmonar, está más diluida que la contenida en las cavidades derechas (De Bernardi et al., 1981; Byard et al., 2006). No obstante, los resultados pueden influirse por las transformaciones inducidas por la autólisis y la

putrefacción, e incluso por las maniobras de reanimación que hubieran sido aplicadas.

- *Senos paranasales*: Se ha descrito la presencia de agua en los senos paranasales, considerándola como una consecuencia más de la simple permanencia de los cadáveres en el agua, teniendo en cuenta que podía penetrar post-mortem (Reh, 1970; Hotmar, 1996; Bohnert et al., 2002). Un estudio realizado por Zivković et al. (2013) demuestra que el líquido libre encontrado en los senos esfenoidales (signo Svechnikov) puede considerarse como una reacción vital en los casos de sumersión sin muestras de putrefacción. En los cuerpos putrefactos recuperados del agua, una cantidad de 0,55 ml de líquido libre en los senos esfenoidales puede sugerir que la víctima estaba viva antes del contacto con el agua, aunque no demuestra que la sumersión sea la causa de muerte.

- *Tinción del tronco aórtico*: La tinción hemoglobínica de la porción proximal de la aorta ha sido citada como un posible marcador de la sumersión en agua dulce (Gresham, 1977; Polson et al., 1985, Zivković et al., 2013), consecutiva a la importante hemólisis que se produciría en estos casos.

1.2.9.3. Hallazgos histopatológicos

- **Pulmones**: Son el principal órgano afectado por el líquido de sumersión cuando éste fluye a través del sistema respiratorio en una sumersión. Shkrum y Ramsay (2007) sistematizan los hallazgos microscópicos en los siguientes:

- “**Enfisema acuoso**”, entendido como edema intra-alveolar e intersticial con expansión de los espacios alveolares, adelgazamiento de la pared alveolar y

compresión de los capilares alveolares. Ciertas circunstancias pueden afectar a la progresión de la expansión alveolar (Betz et al., 1993, 1994, 1995):

- El contacto con el aire cada vez que el cuerpo sale a la superficie del agua.
 - La relación entre la edad y la capacidad pulmonar.
 - Una patología pulmonar previa de las víctimas de enfisema asociada con la edad o el hábito tabáquico.
 - El estado de putrefacción, el cual puede difuminar rápidamente los hallazgos de la autopsia.
-
- **Congestión pulmonar**, edema, hemorragia alveolar, ruptura de paredes alveolares.
-
- Los **macrófagos alveolares** pueden estar disminuidos en ahogados sin signos de putrefacción, al ser arrastrados o lavados por el líquido de sumersión. En cadáveres en avanzado estado de putrefacción, el número de macrófagos pulmonares puede ser muy variable. Un estudio llevado a cabo con ratas establece que la cantidad de macrófagos es mayor en los casos de sumersión en agua salada que en los casos de sumersión en agua dulce (Locali et al., 2006).
-
- **Hemorragia alveolar**, la cual es significativa en los casos de sumersión sin putrefacción y en muertes asfícticas comparadas con sujetos fallecidos por otras causas.

El estudio microscópico muestra diferencias entre los casos de sumersión en agua dulce y los casos de sumersión en agua salada relacionadas con la reacción

inflamatoria aguda inducida después del daño pulmonar producido por el líquido de sumersión. En estos casos, la infiltración masiva de las células inflamatorias es más severa en los casos de sumersión en agua salada que en los de agua dulce. Además, utilizando la microscopía electrónica de barrido, se puede observar en los casos de sumersión en agua salada un cambio característico en el epitelio alveolar que se muestra con muchas proyecciones, compactación y cambios morfológicos en la membrana basal y en los eritrocitos (Morte Tamayo et al., 2012).

Recientemente se ha utilizado como procedimiento complementario la tomografía computerizada post-mortem en el estudio de la fisiopatología pulmonar en el proceso de la muerte, implicando enfisema, congestión y edema (Michiue et al., 2012).

- **Piel:** El efecto de "*piel de lavandera*", considerado como la maceración de la punta de los dedos y la separación de las uñas, se observa a menudo como una decoloración blanquizca y un desprendimiento arrugado de la epidermis como consecuencia de la contracción de las fibras elásticas del corion epitelial. De hecho, estos cambios han sido utilizados para determinar la data de la sumersión, debido a la resistencia de las fibras a la putrefacción, a la acción de los ácidos y a los cambios de temperatura.

- **Corazón:** Los marcadores morfológicos de sumersión son:

- Hipereosinofilia focal de los miocitos ventriculares.
- Contracción en bandas de los miocitos ventriculares.

En los casos de sumersión y de lesión cerebral aguda, usando lugol azul rápido como método de tinción, se ha observado una degeneración miofibrilar obteniendo una tinción citoplasmática difusa (Oehmichen et al., 1990). También han sido descritas

alteraciones de la media de las principales arterias coronarias. Estas lesiones sugieren que la sumersión está asociada con una rápida e importante alteración simpática, la cual produce un espasmo de la arteria coronaria y lesión focal de los miocitos (Lunt y Rode, 1987).

- **Hígado, bazo y riñón:** En el hígado se puede observar la extensión de los sinusoides hepáticos o hasta necrosis. El análisis microscópico del bazo muestra una reducción en el número de eritrocitos característico de un órgano pequeño y anémico. Este efecto parece estar relacionado con algunos mecanismos fisiopatológicos de la muerte (Janssen, 1984). Algunos riñones muestran necrosis tubular aguda. Sakurada et al. (2012) demuestran que en las muertes relacionadas con la exposición al frío (hipotermia y sumersión en agua fría) se observa un aumento de la expresión HSP70 en el núcleo de los podocitos glomerulares con un patrón específico.

- **Hueso temporal:** Se han observado resultados anómalos en la submucosa y el lumen del espacio timpanomastoideo:

- Hemorragia timpanomastoidea y edema severo de la submucosa.
- Petequias con moderada congestión vascular sin inflamación en la submucosa y hemorragia en el espacio de aire timpanomastoideo (Babin et al., 1982).

Se deduce que el esfuerzo respiratorio contra el cierre de la glotis no es el único responsable de la hemorragia timpanomastoidea que tiene lugar en los casos de muerte por sumersión. Se propone que es necesaria una membrana timpánica intacta para crear suficiente presión negativa en la cavidad del oído medio para causar una ruptura de los vasos sanguíneos y hemorragia. Por lo tanto, una hemorragia timpanomastoidea en ausencia de otitis media, traumatismo craneal, accidente

cerebrovascular o diátesis hemorrágica parece ser una fuerte evidencia de apoyo a la muerte por sumersión. Microscópicamente, los cambios observados son un engrosamiento del epitelio perióstico, especialmente en la bóveda quirúrgica de la cápsula ótica (Kelemen, 1983).

- **Cuello:** Es frecuente la aparición en los cuerpos recuperados del agua de una extensa hemorragia intramuscular en el cuello, en la zona de la cintura escapular y en la parte alta de los brazos. En los casos vitales, las hemorragias están localizadas en la parte anterior y posterior del cuello, principalmente en los músculos cricoaritenoides y están relacionadas con la elevada presión venosa central que llega a la cabeza a través de las venas que pasan por el cuello. Sin embargo, hay que tener en cuenta que, a menudo, las lesiones del cuello resultan de una inadecuada recuperación y transporte de los cuerpos (Sigrist y Germann, 1989; Sigrist et al., 1994). Si el análisis ultraestructural muestra cualquier signo de reacción vital y la estriación transversal está intacta, significa que las lesiones se han desarrollado post-mortem, mientras que una alteración muscular de causa "vital" se caracteriza por:

- Fragmentación segmentaria o en forma de disco de las fibras musculares.
- Pérdida de la estriación transversal del sarcoplásmico.
- Aparición de estructuras fibrilares longitudinales patológicas.

- **Epitelio corneal:** El agua de sumersión que rodea a los ojos antes de la recuperación de la víctima tiene características osmóticas, químicas y pH diferentes a las del humor acuoso, sin embargo se mantiene la función de las células endoteliales corneales y la ultraestructura (Hull et al., 1985; Chen et al., 2005).

- **Dientes de color rosa:** A veces se puede observar una coloración rosada de los dientes y es debida a la hemólisis producida después de la exudación de los derivados de hemoglobina a través de los túbulos de dentina.

- **Raíz aórtica:** Al menos el 5% de los casos de sumersión en agua dulce muestran una tinción diferencial del tronco aórtico, observándose una decoloración hemolítica de la íntima de la aorta. Esto podría ser debido a la hiponatremia y a la hemólisis producidas por la hemodilución que tiene lugar en el ventrículo izquierdo en los casos de sumersión en agua dulce (Byard et al., 2006; Tsokos et al., 2008).

- **Mucosa gástrica:** Durante la fase de la sumersión en la que se produce la inspiración bajo el agua, la víctima puede vomitar y el contenido del estómago puede pasar a las vías respiratorias. Si el vómito es enérgico puede conducir a la ruptura del del esófago (Síndrome de Boerhaave), al desgarro de la mucosa lineal en la región de la unión cardio-esofágica (Síndrome de Mallory-Weiss) o incluso en otras partes del estómago (Blanco Pampín et al., 2005).

1.2.10. Exámenes biológicos

Durante el proceso de la sumersión y tras la penetración del agua se van a producir lesiones en las membranas alveolares a través de las cuales van a pasar a la circulación sanguínea tanto el medio de sumersión como las pequeñas partículas que se encuentran en suspensión en el mismo.

Los primeros trabajos se basaron en el estudio de los elementos cristalinos presentes en el líquido de sumersión (Corin y Stockis, 1909; Corin, 1909; Stockis, 1921), pero las dificultades en la identificación de los mismos supusieron el abandono de estos procedimientos.

1.2.10.1. Diatomeas

A pesar de existir una gran controversia sobre su validez, la prueba más importante para el diagnóstico de sumersión es la identificación de diatomeas. Su elección es preferente al de otros organismos acuáticos como pudieran ser los protozoos, dinoflagelados o invertebrados, gracias a la gran estabilidad post-mortem que presentan las diatomeas en los tejidos humanos.

Las diatomeas son algas unicelulares eucariotas de la clase *Bacillariophyceae* que se encuentran presentes tanto en el agua dulce como en el agua salada, así como en la tierra y en el aire. El tamaño de las mismas varía desde 2 μm a más de 500 μm , midiendo la mayoría de las especies entre 10 y 80 μm de longitud o de diámetro. La pared celular contiene una alta cantidad de sílice, denominándose “frústula” a la parte silíceosa entera de la diatomea o exoesqueleto, el cual es duro y resistente al calor, a los ácidos y a la putrefacción. Existe una extraordinaria variabilidad de las mismas, lo que hace que su análisis no resulte especialmente fácil (*Figuras 6, 7 y 8*).

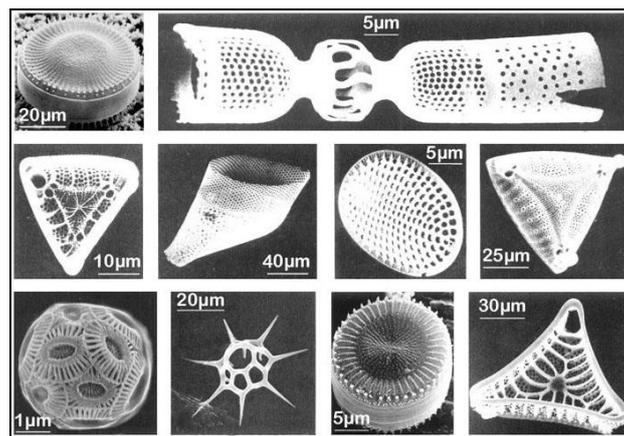


Figura 6. Selección de diatomeas marinas.



Figura 7. Distintas formas de diatomeas.

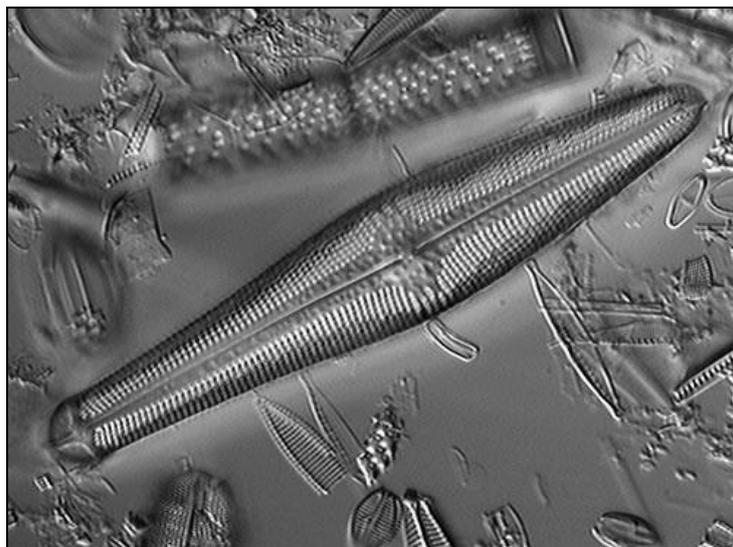


Figura 8. Diatomea del género Gomphonema, endémica del lago Baikal, al sur de Siberia.

La aplicación de las diatomeas para el diagnóstico de la asfixia por sumersión se basa en el hecho de que penetrarían en los pulmones conjuntamente con el líquido de la sumersión, y si el sujeto se encuentra vivo, con actividad cardiocirculatoria eficaz, atravesarían el filtro pulmonar y se diseminarían por todo el organismo a través del torrente circulatorio, pudiendo identificarlas en médula ósea, hígado, cerebro o riñones, con la particularidad de que las diatomeas capaces de alcanzar las últimas ramificaciones de los capilares sanguíneos tienen entre 10-100 μm de tamaño, y el

hallazgo de las mismas supondría un signo claro de vitalidad (Lunetta et al., 1998). Si se tratara de un cadáver arrojado o caído al agua, las diatomeas podrían penetrar de forma pasiva en el aparato respiratorio, pero no podrían llegar a otros órganos al no existir actividad circulatoria. Este planteamiento tan simple no ha estado exento de debate, existiendo argumentos a favor y en contra de la utilidad de estos marcadores para el diagnóstico de la asfixia por sumersión (Hendey, 1973; Peabody, 1980; Foged, 1983).

Las principales causas de error de este test diagnóstico son, según Lunetta y Modell (2005):

Falsos resultados positivos: La principal crítica que puede hacerse al estudio de las diatomeas es el hallazgo de éstas en pulmones y otros órganos de personas fallecidas por causas distintas a la sumersión, lo cual puede reconocer muy diversos orígenes:

- *Contaminación ante-mortem*: Ingestión de alimentos con alto contenido en diatomeas (vegetales, mariscos, bebidas) o por inhalación de diatomeas en fábricas de materiales de construcción y aislantes o al fumar cigarrillos.
- *Penetración post-mortem*: Sumersión prolongada en el agua a alta presión hidrostática, penetración en cadáveres sumergidos a través de heridas producidas en vida, penetración durante la aplicación de maniobras de reanimación con ventilación artificial en cadáveres recuperados del agua.
- *Contaminación durante la preparación de las muestras*: Contaminación por las ropas del cadáver o durante la ejecución de la autopsia a través de instrumental y los materiales utilizados.

- *Otras fuentes:* Inhalación de agua por buceadores o nadadores, paso transplacentario de las diatomeas, contaminación del páncreas y vesícula biliar por el paso retrógrado del contenido del duodeno o en casos de exhumación, contaminación post-mortem por el serrín que eventualmente pueda existir en el ataúd.

Falsos resultados negativos: Las diatomeas no han podido ser identificadas en todos los casos de muerte por sumersión, pudiéndose explicar por:

- La existencia de una baja concentración de diatomeas en el medio de sumersión (Funayama et al., 2001). Es necesario tener en cuenta las variaciones estacionales, siendo más abundantes las diatomeas en primavera y en otoño.

- Una escasa cantidad de líquido inhalado.

- La pérdida de diatomeas durante el proceso de preparación de las muestras. Las técnicas de extracción requieren la destrucción previa de la materia orgánica, para lo cual se ha empleado la digestión química con ácido nítrico o sulfúrico (Ludes y Coste, 1996; Auer, 1991), solubilizantes con Solueno-350 (Fukui et al., 1980; Sidari et al., 1999), el cual no es recomendable para las diatomeas en agua salada, o enzimas como la proteinasa k con el dodecilsulfato sódico (Kobayashi et al., 1993). El método de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) constituye un método alternativo pero su alta sensibilidad (Abe et al., 2003) conlleva también a un alto riesgo de contaminación. Recientemente se ha descrito un nuevo método cualitativo y cuantitativo mucho más sensible y específico que el método tradicional basado en la digestión química (Zhao et al., 2013). Este método se basa en la técnica de

digestión por microondas, filtración a vacío, y detección mediante Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) automatizado.

Es necesario tomar en consideración que cualquier investigación que se pretenda llevar a cabo requiere no sólo el análisis cualitativo y cuantitativo de las diatomeas en los diferentes órganos y tejidos, sino también el obligado estudio comparativo con el análisis de las diatomeas en el medio en el que se ha producido la sumersión (Auer, 1991; Knight, 1996; Pollanen, 1997, 1998; Sánchez de León et al., 2011; Kakizaki et al., 2011).

La toma de muestras de agua debe llevarse a cabo al mismo tiempo que se produce la recuperación del cadáver, registrando la temperatura del agua. Deben tomarse muestras de agua de la superficie y a diferentes profundidades, utilizando para ello recipientes estériles de un litro de capacidad. Las muestras recogidas se mantendrán a 41°C hasta el momento de su manipulación (Romero, 2007).

Lunetta y Modell (2005) consideran que para que los resultados sean aceptables se deben cumplir las siguientes premisas:

- a. Concordancia taxonómica, cualitativa y cuantitativa, entre las diatomeas encontradas en el cuerpo y en el medio de sumersión.
- b. Adopción de un estricto protocolo para evitar la contaminación durante todo el proceso de preparación de las muestras.
- c. Exclusión de los resultados de cualquier diatomea que potencialmente pueda ser “contaminante”.

1.2.10.2. Métodos alternativos a la investigación de las diatomeas

- Identificación de *protozoos ciliados* del género *Tetrahymena* en sangre para los cadáveres de sujetos ahogados en agua dulce (Chardez y Lambert, 1985), a través del cultivo de muestras de sangre (*Figuras 9 y 10*).

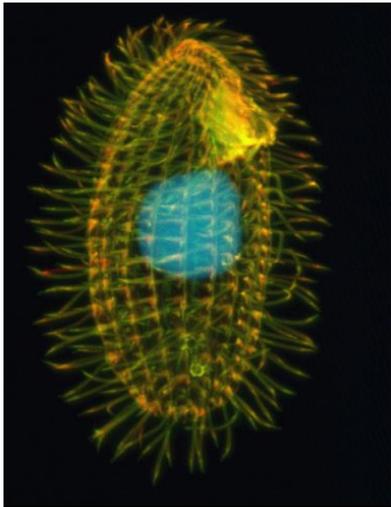


Figura 9. Tetrahymena thermophila.



Figura 10. Tetrahymena pyriformis.

- Estudio de las *algas verdes*, *Chlorophyceae*, sobre todo cuando se trata de aguas dulces pobres en diatomeas (Yoshimura et al., 1995). Se emplea el Solueno-350 para solubilizar los tejidos lo cual permite la detección tanto de las algas verdes como de las diatomeas (*Figura 11*).



Figura 11. Chlorophyceae pedicellum.

- *Análisis bacteriológico* de la sangre de cadáveres recuperados del agua, pudiendo comprobar la presencia de ciertas bacterias en los sujetos ahogados comparándolo con los fallecidos por otras causas.

- Mishul'skii (1990) comprobó que la *Ps. putida* y la *Ps. fluorescens* no estaban presentes en la sangre de los sujetos control y sí en sujetos ahogados.

- Lucci y Cirnelli (2007) demostraron que, bacterias típicas de contaminación fecal de las aguas, como *Streptococos* y *Coliformes fecales*, se encontraban en la sangre del ventrículo izquierdo en el 100% de los ahogados, tanto en agua dulce como en agua salada.

- Kakizaki et al. (2008, 2009a, 2009b) estudiaron el crecimiento de bacterias bioluminiscentes valorando su utilidad como marcador de asfixia por sumersión. Sus resultados sugieren que la presencia de numerosas especies de bacterioplancton en cadáveres rescatados del agua podrían ayudar al diagnóstico de la asfixia por sumersión.

- Aoyagi et al. (2009) obtuvieron buenos resultados al detectar fragmentos de ADN de la bacteria acuática más común, *Aeromonas sobria*, mediante técnicas de PCR en la sangre de ahogados. De la misma forma, Suto et al. (2009) detectaron ADN de diferentes bacterias, como *Streptococcus salivarius* y *Streptococcus sanguinis* (especies comunes en garganta y tráquea) y *Aeromonas hydrophila* (presente en numerosas aguas).

- Uchiyama et al. (2012) detectaron simultáneamente ocho especies de bacterioplancton de agua dulce o salada (*Aeromonas hydrophila*, *A. salmonicida*; *Vibrio fischeri*, *V. harveyi*, *V. parahaemolyticus*; *Photobacterium damsela*, *P.*

leiognathi, *P. phosphoreum*) utilizando ensayos de PCR a tiempo real con sondas TaqMan marcadas con fluoróforos. Estos ensayos fueron rápidos, menos laboriosos y de alto rendimiento, además de sensibles y específicos.

- Estudio de la expresión de los genes reguladores de la homeostasis del agua (**Aquaporin**) para el diagnóstico diferencial de sumersión entre los casos en agua dulce y en agua salada: **Aquaporin-5** tiene expresión intrapulmonar, **Aquaporin-2** expresión intrarrenal y **Aquoporina-1 y 4** expresión intracerebral. Hayashi et al. (2009) y An et al. (2010, 2011) demostraron el aumento de la expresión de estos genes en ahogados en agua salada.

- Identificación genética de las **algas del fitoplancton** mediante técnicas de PCR como novedosa alternativa a la investigación microscópica de las diatomeas, pudiendo detectar nanoplancton, microplancton o incluso picoplancton, algas que morfológicamente no se discriminarían por técnicas microscópicas.

- Kane et al. (1996) realizaron uno de los primeros trabajos sobre la detección de plancton consistente en la amplificación mediante PCR del gen de la subunidad 16S del ARN ribosómico mediante *primers* universales de fitoplancton y posterior análisis mediante secuenciación.

- Suto et al. (2003) publicaron un trabajo experimental utilizando técnicas de PCR con *primers* específicos para detectar genes de la clorofila *Euglena gracilis* y de *Skeletonema costatum*.

- En 2008, He et al. publicaron un estudio realizado en modelo experimental sobre la amplificación mediante PCR del gen de la subunidad 16S del ARN

ribosómico del plancton y su análisis mediante DGGE (electroforesis en gradiente desnaturalizante).

- En 2010, Tie et al. desarrollaron un prometedor método directo, sensible y rápido para la detección de fitoplancton utilizando técnicas de PCR del gen de la subunidad 16S del ADN ribosómico mediante *primers* específicos de *Euglena gracilis* (*Cyanobacterium*) en tejidos de hígado, riñón y pulmón de víctimas de sumersión en agua de mar y agua dulce.

1.2.11. Tanatoquimia

Uno de los aspectos que destacan en la Medicina Legal actual, comparándola con sus inicios, es la aplicación de medios diagnósticos complementarios en la realización de las autopsias ampliando en gran medida las posibilidades diagnósticas de éstas. La utilización de estos métodos permite confirmar o descartar una determinada causa de muerte así como obtener información complementaria para poder reconstruir la secuencia completa de los hechos (Gisbert y Verdú, 1998).

El término de “*bioquímica cadavérica*” o tanatoquimia implica una nueva metodología en la forma de investigación del cadáver y de sacar conclusiones. Ya en 1963, Evans, en su tratado titulado “*The chemistry of death*”, propone este término para explicar los procesos que tienen lugar en el cadáver a escala molecular. Luna, en 2009, define la tanatoquimia como “*el estudio de los parámetros bioquímicos en el cadáver para resolver los problemas que surgen en el diagnóstico de la causa y las circunstancias de la muerte*”. Hay que tener en cuenta que esta bioquímica cadavérica va a ser diferente de la del sujeto vivo, porque aunque en el cadáver se dan procesos enzimáticos, éstos presentan unas particularidades distintas a los procesos intracelulares de los tejidos vivos (Gisbert y Villanueva, 2004).

El problema que surge es que no siempre se pueden establecer unos patrones de normalidad cadavérica ya que muchos factores, exógenos y endógenos, intervienen en su evolución. Así, como consecuencia de la fase de agonía, de los tratamientos y de los fenómenos de autólisis y putrefacción, muchos compuestos sufren procesos de transformación importantes, tanto cualitativos como cuantitativos. Sólo cuando se demuestra que un parámetro no sufre modificación post-mortem, se podrá emplear con garantía diagnóstica. Si se realiza la autopsia de manera precoz, se podrán valorar la mayoría de los parámetros bioquímicos, pero sobre todo, los que contengan mayor valor diagnóstico: glucosa, urea, creatinina, electrolitos, enzimas, antígenos y anticuerpos, hormonas, etc. (Gisbert y Villanueva, 2004).

La tanatoquímica presenta un interés específico en los siguientes campos (Luna, 2009):

- Diagnóstico de procesos patológicos que provocan alteraciones funcionales con escasa evidencia estructural (estado de coma, crisis hipertensivas, arritmias, intoxicaciones, crisis anafilácticas, etc).
- Resolución de algunas de las preguntas complementarias con datos adicionales (sufrimiento agónico, el tiempo de supervivencia, el intervalo post-mortem, etc).
- Diagnóstico de los procesos patológicos previos a la muerte (alcoholismo, diabetes, insuficiencia renal, insuficiencia hepática, infarto de miocardio, etc).
- Diagnóstico de intoxicaciones (con determinadas alteraciones bioquímicas).
- Diagnóstico de procesos cuya alteración anatomopatológica requiere un tiempo mínimo de evolución para que su expresión sea objetivable.

Hay que tener en cuenta que los procesos de necrosis celular que tienen lugar en la autólisis producen una serie de modificaciones en los tejidos, en los órganos y en los diversos fluidos corporales (sangre, líquido cefalorraquídeo, humor acuoso y vítreo, líquido pericárdico, sinovial, endolinfático, etc). Dentro de estas modificaciones, la citólisis es la primera en producirse y la más importante: los lisosomas, organelas impermeables en la célula viva pero que con la muerte pierden esta propiedad, liberan enzimas que digieren la célula. Estos fenómenos carecen de significado patológico y son únicamente la expresión de fenómenos post-mortem.

El patólogo forense debe establecer la "*fisiología post-mortem*", lo normal en la evolución post-mortem (Gisbert y Verdu, 1998), ya que sólo a partir de estos datos se podrá establecer un diagnóstico o valorar correctamente un parámetro y así saber discriminar los hallazgos bioquímicos que pueden deberse a la lesión de los que pueden ser resultado de los fenómenos autolíticos. Así, el desarrollo de estos fenómenos autolíticos puede interferir en el estudio bioquímico del cadáver, tanto en los fluidos utilizados en la toma de muestras como para los marcadores bioquímicos determinados con fines diagnósticos, produciendo ciertas limitaciones (Coe, 1993).

Teniendo en cuenta que los procesos de autólisis no ocurren al mismo tiempo y que, por tanto, puede haber un periodo post-mortem variable en el que los resultados obtenidos en el análisis bioquímico puedan corresponderse con el estado bioquímico y funcional del sujeto en el periodo inmediatamente anterior al fallecimiento, se debe conocer la posible existencia de hallazgos bioquímicos que puedan ser el resultado de alteraciones patológicas que han podido estar implicadas en la muerte, pudiendo así establecer la etiología de la muerte (Coe, 1993).

1.2.11.1. Tipo de muestra y momento de la toma

Antes de recoger las muestras para su análisis bioquímico tenemos que tener las respuestas a las siguientes preguntas (Luna, 2009):

- ¿Qué parámetros bioquímicos queremos analizar?
- ¿Para qué y por qué recogemos las muestras?
- ¿Cuándo debemos recoger las muestras?
- ¿Qué muestras?
- ¿Cómo hacerlo?
- ¿Cómo almacenarlas y enviarlas?

El fluido ideal para las determinaciones post-mortem debe ser un fluido que esté perfectamente conservado de los procesos post-mortem, sin elementos celulares en suspensión y de fácil accesibilidad. Los criterios de selección de los fluidos en tanatoquímica deben tener en consideración los siguientes aspectos:

- Accesibilidad.
- Precaución durante el muestreo.
- Técnicas de muestreo necesarias.
- Volumen.
- Posibilidad de interferencias post-mortem de los tejidos vecinos.
- Posibilidad de interferencias post-mortem de elementos celulares en suspensión.
- Información general adquirida por los elementos presentes en el fluido (glucosa, creatinina, etc).
- Información de los tejidos vecinos (tejido cardíaco, tejido nervioso central, etc).

El principio de la bioquímica clínica implica una adecuada selección de las muestras y los sitios de muestreo, así como de los procedimientos de muestreo utilizados. En medicina forense, se deben tomar muestras que incluyan sangre de los dos ventrículos del corazón, sangre periférica, y fluidos corporales como pueden ser humor vítreo, líquido pericárdico, pleural, cefalorraquídeo y orina (Coe, 1977; Madea y Musshoff, 2007; Maeda et al., 2009a; Matoba et al., 2012). Estas muestras deben ser recogidas usando jeringuillas estériles, identificando el sitio de muestreo, evitando o minimizando la contaminación y evitando la hemólisis de la sangre. A pesar de las posibles interferencias post-mortem, el uso de la sangre de los dos ventrículos debe ser considerado positivamente, ya que la sangre periférica no siempre está disponible en cantidades suficientes y los resultados de estas muestras reflejan la fisiopatología sistémica en el proceso de muerte (Maeda et al., 2011).

En el análisis post-mortem ha sido habitual partir de la sangre del ventrículo derecho pero la sangre en general, y la del ventrículo derecho en particular, plantean graves problemas para el análisis bioquímico. Por un lado los problemas derivados de la hemólisis y por otro, los derivados de la anatomía del órgano: el ventrículo derecho recibe la sangre de las venas cavas, se contamina de los procesos generados en la agonía y en la autólisis en el páncreas y por difusión del contenido gástrico (Gisbert y Villanueva, 2004). Así, la adrenalina y noradrenalina liberadas secundariamente a la hipoxia en el proceso de agonía, producen una modificación del metabolismo de los hidratos de carbono y de los fosfolípidos. De igual forma, la concentración de distintos elementos y moléculas no es igual en sangre periférica que en sangre del ventrículo derecho.

Debido a este inconveniente se han investigado otros fluidos corporales además del suero de procedencia periférica (obtenido mediante punción percutánea de vena femoral o subclavia), como son el líquido cefalorraquídeo, humor acuoso, humor

vítreo, líquido sinovial, líquido pericárdico, y perilinfático. Estos fluidos se encuentran en lugares cerrados y, por tanto, aislados de la circulación general y la contaminación.

Así, la muestra debe reunir una serie de características para poder ser útil:

- Debe ser un material biológico anatómicamente bien protegido.
- Debe carecer o tener escasos elementos celulares en suspensión para reducir los efectos de la lisis celular.
- Debería presentar fácil accesibilidad para una obtención rápida y sencilla durante la autopsia (Luna et al., 1980a, 1980b, 1982, 1983; Lachica et al., 1988; Osuna et al., 1998).

El momento para la toma de la muestra es fundamental para una correcta evaluación bioquímica del cadáver. Para Forrest (1993), la decisión de extraer muestras para el análisis toxicológico o bioquímico sería ideal antes de empezar la autopsia, empleando un tiempo para analizar el caso concreto antes de tomar la decisión.

En cualquier caso, la toma de las muestras debe realizarse lo más pronto posible con el fin de evitar los artefactos derivados de los procesos de autolisis. Según Coe (1993), deben extraerse durante el periodo post-mortem precoz: tiempo que transcurre desde que se produce la muerte hasta que empiezan a instaurarse los fenómenos de putrefacción, oscilando entre pocas horas en medios calurosos hasta una semana en un medio refrigerado.

1.2.11.2. Marcadores bioquímicos

El propósito principal del uso de la bioquímica post-mortem y de la biología molecular es investigar los cambios del sistema fisiopatológico involucrados en el proceso de muerte que, por lo general, no pueden ser detectados por métodos morfológicos; éstos se conocen como "*reacciones vitales fisiopatológicas*". Por lo tanto, es importante la inclusión de un amplio análisis de los hallazgos patológicos y bioquímicos como parte de la investigación llevada a cabo en el laboratorio, incluyendo la morfología, toxicología, microbiología, bioquímica y la biología molecular, junto con los procedimientos de diagnóstico de imagen. De entre todos, la bioquímica post-mortem se ha convertido en un importante procedimiento para la determinación de la causa y el momento de la muerte: presenta ventajas de estandarización, control de calidad, análisis cuantitativo, evaluación estadística y disponibilidad de múltiples marcadores, aunque tienen problemas relacionados con la selección y recolección de muestras y la aplicabilidad de los procedimientos analíticos. Además, hay que tener en cuenta que la utilización de estos procedimientos está limitado para los casos con un corto periodo post-mortem (normalmente menos de 48 horas) y que los criterios clínicos no son válidos en la investigación post-mortem, no sólo debido a la interferencias producidas por la agonía y el periodo post-mortem, sino también debido a las diferencias en la causa y el desarrollo de la muerte (Maeda et al., 2009a, 2010, 2011).

Así, el uso de la bioquímica post-mortem para la investigación de la causa y el proceso de muerte implica el análisis de (Maeda et al., 2011):

- Marcadores bioquímicos de las condiciones generales del fallecido, las reacciones sistémicas vitales y los trastornos metabólicos producidos para demostrar el deterioro de las funciones vitales (circulación, respiración,

homeostasis metabólica y Sistema Nervioso Central) durante el proceso de muerte. Estos marcadores incluyen:

- *Marcadores de la pérdida de sangre o anemia*: las concentraciones séricas de **proteínas** y **colesterol** disminuyen gradualmente en los casos con un tiempo de supervivencia largo después de una hemorragia masiva y/o daño tisular (Quan et al., 2009a), mientras que la **eritropoyetina** sérica aumenta debido a la rápida pérdida de sangre (dependiendo del tiempo de supervivencia) (Quan et al., 2008, 2010). Además, este aumento es debido a una prolongada hipoxemia en la muerte prolongada.

- *Marcadores de inflamación*: las concentraciones séricas de **proteína C reactiva**, **neopterina** y **citoquinas** aumentan, dependiendo de la severidad de daño tisular y el tiempo de supervivencia, cuando se producen lesiones y quemaduras, y son útiles para evaluar la gravedad de la infección secundaria, el Síndrome de Respuesta Inflamatoria Sistémica (SIRS) y las enfermedades infecciosas agudas o las enfermedades inflamatorias crónicas en la muerte natural (Fujita et al., 2002; Mimasaka et al., 2006; Ishikawa et al., 2008a).

- *Marcadores de deshidratación y alteraciones electrolíticas*: las concentraciones de **urea** y **creatinina** en suero y otros líquidos corporales se utilizan en el diagnóstico de la deshidratación (Coe, 1993; Zhu et al., 2002a). Concentraciones de **sodio** y **cloro**, junto con las de **calcio** y **magnesio** son útiles en la investigación de la dilución de la sangre circulante y los trastornos electrolíticos sufridos en la muerte por sumersión (Maeda, 2004; Zhu et al., 2005, Maeda et al., 2009a).

- *Marcadores de hipoxemia e hipoxia sistémica del tejido*: es inevitable que en la fase terminal de la mayoría de las muertes se produzca una profunda hipoxemia, la cual provoca una hipoxia tisular sistémica. Las concentraciones séricas de *ácido úrico* y *creatinina* aumentan debido a la hipoxia sistémica aguda (Zhu et al., 2002a, 2007a). Los *marcadores cardiacos* también son útiles para investigar la influencia de la hipoxia sistémica en el corazón (Zhu et al., 2006a, 2006b, 2007b; Maeda et al., 2009a).

- *Marcadores de respuesta al estrés sistémico*: los niveles de *catecolaminas* (adrenalina, noradrenalina y dopamina) aumentan con respecto al rango clínico debido al enorme estrés físico experimentado durante el período de agonía. Otros marcadores como la *serotonina* y la *cromogranina A* en sangre, líquido pericárdico y líquido cefalorraquídeo son útiles para investigar esta respuesta de estrés producida en la hipotermia y la hipertermia así como en la muerte por intoxicación (Zhu et al., 2007d, Quan et al., 2011; Yoshida et al., 2011). La *hormona adrenocorticotropa (ACTH)*, las *hormonas esteroideas* y las *hormonas tiroideas* han sido estudiadas también para una mayor evaluación de la respuesta de estrés en el proceso de la muerte (Ishikawa et al., 2008b, 2009).

- *Marcadores de daño musculo-esquelético*: las concentraciones de *ácido úrico* y *creatinina* en sangre se elevan en el daño músculo esquelético debido a la hipoxia (Zhu et al., 2002a), aunque este aumento es más evidente en las muertes con avanzado daño musculo-esquelético. También se ve alterada la concentración sérica de *calcio* y más específicamente, la concentración de *mioglobina* como marcador

específico de tejido (Zhu et al., 2001; Ishikawa et al., 2007; Li et al., 2009b).

- Marcadores bioquímicos específicos de tejidos para detectar el daño letal en órganos vitales como el corazón, los pulmones y el cerebro. Sus niveles dependen inicialmente del daño tisular primario pero se ven modificados por el daño tisular secundario provocado por la hipoxia en el período de agonía. Así, estas determinaciones son indicadores de la gravedad combinada del daño tisular primario y secundario implicados en el deterioro funcional durante el proceso de la muerte.

- *Marcadores de daño cardíaco y disfunción cardíaca*: las concentraciones séricas y en líquido pericárdico de las **troponinas cardíacas** y la **isoenzima MB de la creatin kinasa (CK-MB)** son utilizadas en el diagnóstico clínico del infarto de miocardio, aunque un aumento de estos marcadores también va a depender de la gravedad del daño miocárdico en el momento de la muerte provocado por diversas causas, incluyendo la hipertermia, el abuso de drogas y la intoxicación por monóxido de carbono (Pérez-Cárceles et al., 2004; Davies et al., 2005; Zhu et al., 2006a, 2006b, 2007b; Maeda et al., 2009b). También pueden utilizarse los niveles en líquido pericárdico del **péptido natriurético atrial y cerebral (ANP y BNP)** para investigar la sobrecarga auricular aguda y el fracaso cardíaco crónico, respectivamente. (Lorente et al., 1990c; Zhu et al., 2007c; Michaud et al., 2008).

- *Marcadores de daño pulmonar y fallo respiratorio*: las **proteínas A y D del surfactante pulmonar (SP-A y SP-D)** pueden ser detectadas en sangre y en tejido mediante análisis bioquímico, inmunohistoquímico y técnicas

de biología molecular (Ishida et al., 2000, 2002; Zhu et al., 2000, 2002b; Pérez-Cárceles et al., 2008a). Sus niveles séricos aumentan inmediatamente después del daño pulmonar y son útiles cuando se evalúan conjuntamente con los hallazgos inmunohistoquímicos y moleculares.

- *Marcadores de daño y disfunción cerebral:* la **proteína S100** es un polifacético marcador específico de tejido, de tal forma que combinando su análisis bioquímico e inmunohistoquímico nos permite sacar diferentes conclusiones respecto a la causa de muerte y nos es útil a la hora de investigar la gravedad y la causa del daño cerebral y los posteriores trastornos del Sistema Nervioso Central (Li et al., 2006a, 2006b, 2009a). Otros marcadores son la **enolasa específica de neuronas (NSE)**, la **isoenzima BB de la creatin quinasa (CK-BB)** y la **proteína básica de mielina (MBP)** (Osuna et al., 1992; Vázquez et al., 1995).

- *Otros marcadores bioquímicos específicos de células y tejido:* La **mioglobina** en orina se puede utilizar para investigar la causa de la muerte que implica daño del músculo esquelético o rhabdomiolisis (Zhu et al., 2001) y sus niveles en líquido cefalorraquídeo también van a depender de la causa de muerte y del tiempo de supervivencia. La **triptasa** de los mastocitos es un buen marcador sérico de shock anafiláctico (Schwartz et al., 1987, Edston et al., 2007). La **tiroglobulina** en sangre se utiliza para investigar la muerte de asfixia por compresión del cuello, aunque también puede elevarse debido a una lesión cerebral traumática (Tamaki et al., 1987; Dressler y Mueller, 2006). Las **isoenzimas de la amilasa** (salival y pancreática) son marcadores del daño en los respectivos tejidos resultante de un traumatismo o enfermedad, sin

embargo, la concentración sérica de amilasa aumenta en la mayoría de los casos debido posiblemente a la insuficiencia circulatoria y a la hipoxia en el proceso de la muerte, sobre todo en la muerte por traumatismo craneoencefálico agudo y la intoxicación (Coe, 1993). *La enzima gamma glutamil transpeptidasa (GGT)* se eleva en la mayoría de los casos durante la agonía y hay que utilizarla con cautela como marcador post-mortem de alcoholismo (Rainio et al., 2008). También se pueden utilizar los marcadores tumorales en suero como la *alfafetoproteína (AFP)* y el *antígeno prostático específico (PSA)* en la investigación post-mortem de los tumores malignos con relevancia en el diagnóstico clínico.

La elección del fluido y del marcador a utilizar va a depender de la lesión que se quiera evaluar. Con respecto al fluido, es importante el análisis de más de uno para poder conocer la distribución relativa, el patrón de liberación y los cocientes entre diferentes fluidos para este parámetro (Osuna et al., 1998). En cuanto al marcador bioquímico, sus concentraciones pueden verse interferidas por el intervalo post-mortem y, por otro lado, debe tratarse de un marcador específico que refleje lo más exactamente posible la lesión que causó el fallecimiento del sujeto o que permita establecer las circunstancias que nos acerquen a la reconstrucción de los hechos. Las características de este marcador ideal son las siguientes (Hans et al., 1989):

- Ser específico y presentar una distribución uniforme en el fluido a estudiar.

- Liberarse sólo como respuesta a una lesión celular en la que se produce una alteración de la permeabilidad de la membrana celular.

- Su cinética de liberación debe estar condicionada por la naturaleza del mecanismo responsable del daño en la membrana celular.
- Proporcionar una estimación real de la lesión orgánica.
- Proporcionar una base real para la valoración diagnóstica y cuantitativa de la lesión.

Según Maeda et al. (2009a), los requisitos para estos marcadores son: respuesta rápida, estabilidad post-mortem, poder de discriminación (especificidad y sensibilidad), de bajo coste y fácil acceso, y de fácil y rápido análisis para la detección, estandarización y aseguramiento de la calidad. Estos marcadores los podemos clasificar en: marcadores bioquímicos en sangre y fluidos corporales, marcadores inmunohistoquímicos en tejidos y marcadores de biología molecular que experimentan regulaciones debidas al deterioro de la homeostasis.

1.2.11.3. Marcadores bioquímicos en el diagnóstico de sumersión

Para poder diagnosticar en medicina forense la causa de la muerte en cuerpos sumergidos en un medio acuoso se ha usado la determinación de varios elementos en sangre, especialmente la comparación de las concentraciones de ciertos elementos en la sangre del ventrículo derecho y ventrículo izquierdo. Cuando se aspira agua durante el periodo vital, las concentraciones de ciertos elementos en la sangre no sólo varían como consecuencia de la hemodilución o la hemoconcentración, según se aspire agua dulce o salada, respectivamente, sino que además, tanto en agua de mar como en agua dulce, se puede producir una transferencia de elementos desde el agua que llena el pulmón hacia la sangre del ventrículo izquierdo en el caso de que estos sean más abundantes en el medio acuoso que en la sangre.

No obstante, habría que señalar que la utilización de la concentración de ciertos elementos puede provocar frecuentes errores en el diagnóstico de sumersión. El estancamiento y sedimentación de la sangre y el posterior proceso de putrefacción, generan variaciones importantes en la distribución de los elementos en sangre, unas variaciones que pueden enmascarar fácilmente aquellas otras alteraciones en las concentraciones de los elementos que habían sido anteriormente provocadas por la aspiración de agua durante el periodo vital.

Para evitar errores en el diagnóstico por sumersión habría que utilizar muestras de sangre de casos con un periodo post-mortem corto (<48 horas) que permitan la utilización de una amplia gama de marcadores bioquímicos, o si sólo se dispone de muestras de sangre de cadáveres con cierto grado de descomposición, utilizar marcadores bioquímicos que no sufran modificaciones como consecuencia de los procesos asociados a la aspiración de agua y que no sean enmascarados por las variaciones debidas a la sedimentación y putrefacción de la sangre.

1.2.11.3.1. Estroncio

El estroncio es uno de los elementos que se encuentra en cantidades relativamente elevadas en la corteza de la tierra, por lo que no es sorprendente que se encuentre estroncio en aguas de mar y en algunas aguas minerales, de tal manera que aguas extraídas de las minas podrían contener concentraciones de estroncio de hasta más de 1.000.000 µg/L (Meinck et al., 1977). En aguas de infiltración profundas podemos encontrar concentraciones de estroncio de hasta 31.000 µg/L mientras que en océanos y mares se encuentran concentraciones de aproximadamente 8000 µg/L, aunque dependiendo de la salinidad pueden llegar a alcanzar los 13000 µg/L (Piette et al., 1989).

En los ríos la concentración de estroncio varía enormemente ya que en algunos su concentración llega a ser similar a la encontrada en sangre, pero en otros, su concentración puede ser diez veces superior (Azparren et al., 2003). Por eso, en los casos de sumersiones en ríos es muy importante analizar el agua en el que ha sido hallado el cadáver.

La concentración de estroncio en sangre de personas sanas varía de 16-43 $\mu\text{g/L}$ (Azparren et al., 1994) aunque hay que tener en cuenta que estas concentraciones pueden variar según el tipo de agua y los alimentos consumidos (algunos tipos de agua mineral y alimentos de origen marino poseen elevadas concentraciones de estroncio) y probablemente debido también al uso de ciertos fármacos con estroncio para el tratamiento de la osteoporosis (Piette et al., 1994; Piette, 1996; Tournis et al., 2006). Así, según Piette et al. (1989), los valores de estroncio en sangre pueden alcanzar los 95 $\mu\text{g/L}$.

En la *Tabla 2* se muestran los ratios entre las concentraciones de los elementos más abundantes en agua salada y en sangre humana, observándose que el ratio de estroncio es el más alto. Por tanto, a priori, el estroncio en sangre total podría ser un buen indicador de los casos de sumersión en agua salada (Abdallah et al., 1985; Piette et al., 1989; Azparren et al., 2000, 2007b).

<i>Elemento</i>	<i>Agua marina</i> ($\mu\text{g/L}$)	<i>Sangre total</i> ($\mu\text{g/L}$)	
		<i>Suero</i> ($\mu\text{g/L}$)*	<i>Plasma</i> ($\mu\text{g/L}$)**
		<i>Agua marina/sangre total</i>	
		<i>Agua marina /suero*</i>	<i>Agua marina /plasma**</i>
Cloro	19.353.000	3.651.350**	5,3**
Sodio	10.770.000	(3,5-2,9)x10 ⁶ *	3,7-3,0*
Magnesio	1.290.000	18.500±25.800*	29,3*
		~ 135.760	9,5
Calcio	412.000	100.000*	4,1*
Potasio	399.000	(215.000-140.000)*	(2,8-1,8)*
Bromo	67.300	3.900*	17,2*
Estroncio	8.000	~ 30	~ 267
Boro	4.450	365-39	114,1-12,2
Silicio	4.000	3.040-880	4,5-1,3
Flúor	1.300	190**	6,8**
Litio	185	5	37
Rubidio	120	2.700	0,04
Iodo	64	63**	1**

Tabla 2. Ratios entre las concentraciones de los elementos más abundantes en agua marina y sangre humana (Azparren et al., 2000).

El estroncio cumple con todos los requisitos para considerarlo como un buen marcador del diagnóstico de muerte por sumersión (Icard, 1932; Piette y De Letter, 2006):

- El marcador debe tener la posibilidad de atravesar la membrana alveolo-capilar y penetrar en la circulación.
- El marcador debe estar presente en grandes cantidades en el medio de sumersión y en muy pequeñas cantidades en la sangre de personas sanas. El elevado ratio del estroncio en agua de mar y sangre total (puede variar desde 270:1 hasta 650:1, según la zona geográfica) hace de él un potencial marcador

para el diagnóstico de la asfixia por sumersión, y ello a pesar de las diferentes concentraciones que pueden observarse entre distintos puntos geográficos (Lunetta y Modell, 2005; Vallejo et al., 2012).

- El marcador no debe penetrar en la circulación a través de otras vías (aparato digestivo) o por fenómenos de difusión post-mortem.

Estudios llevados a cabo en animales por Abdallah et al. (1985) concluyen que la determinación del estroncio en sangre es útil para determinar el carácter vital de una sumersión, así como para diferenciar si la sumersión se ha producido en agua dulce o agua salada. Señalaron también que los niveles de estroncio no se ven afectados por maniobras de reanimación, ni por la hemólisis, ni por los cambios inducidos precozmente por la putrefacción.

Azparren et al. (1994, 1998, 2000) estudiaron la diferencia de las concentraciones de estroncio en sangre entre el ventrículo izquierdo y el derecho siendo muy útil en el diagnóstico de las muertes por sumersión: demostraron que, en los casos “típicos” de asfixia por sumersión en agua salada, estas diferencias eran superiores a 70 $\mu\text{g/L}$, y que valores inferiores a 30 $\mu\text{g/L}$ eran indicativos de sumersión “atípica”, sin aspiración de agua durante el periodo vital (por laringoespasma, inhibición vagal o inmersión post-mortem de la víctima). Además, estas diferencias entre los niveles de estroncio entre el ventrículo izquierdo y derecho podían ser indicativas de la duración de la agonía. Azparren et al. (2000) también estudiaron la concentración de estroncio en sangre de ventrículo izquierdo, encontrando que valores superiores a 172 $\mu\text{g/L}$ eran indicativos de muerte por sumersión, siendo además un marcador menos propenso a experimentar errores analíticos.

También se comprobó que los valores medios de estroncio en sangre eran mucho más altos en sujetos fallecidos por sumersión que en los fallecidos por otras causas o en sujetos vivos sanos, no apreciando solapamiento alguno entre ambos (Fornes et al., 1998). Así, Pérez-Cárceles et al. (2008b), tras estudiar los niveles de estroncio en cadáveres fallecidos por sumersión y por otras causas de muerte, demostraron que el estroncio era un buen marcador para el diagnóstico de muertes por sumersión y para la diferenciación de las muertes en agua salada de las de agua dulce.

En los casos de sumersión en agua dulce encontramos una gran disparidad de resultados en cuanto a las concentraciones de estroncio: Piette et al. (1989) observaron solapamiento en las concentraciones de estroncio entre los sujetos fallecidos por sumersión y los fallecidos por otras causas, mientras que Fornes et al. (1998) encuentran que no existe tal solapamiento. Ya en 2003, Azparren et al. comprueban que en el 32% de los cuerpos encontrados en agua dulce, la determinación de estroncio podía permitir el diagnóstico de asfixia por sumersión con un razonable grado de confianza.

Por otra parte, es necesario tener en cuenta otros factores que pueden modificar la concentración de estroncio en sangre, como es el tiempo estimado de permanencia del cuerpo en el agua. Se ha demostrado que en los casos en los que no se superan los 3 días desde la muerte, existen muy pocas evidencias que sugieran la difusión post-mortem del estroncio del agua a la sangre (Azparren et al., 2003; Pérez-Cárceles et al., 2008b).

1.2.11.3.2. Otros marcadores

Ya en 1902, Carrara comprobó la dilución desproporcionada de la sangre contenida en el ventrículo izquierdo de ahogados en agua dulce frente a los ahogados en agua

salada, determinando el *peso específico*, *punto de congelación* y *conductividad eléctrica* para diferenciar estos tipos de sumersión.

Más tarde, en 1921, Gettler propone la medición de la concentración de *cloruro* en la sangre de las cavidades cardíacas izquierdas y derechas, cuyas concentraciones difieren en caso de sumersión vital, en un sentido inverso, según se trate de sumersión en agua dulce o en agua salada.

Algunos autores proponen la utilidad de otros marcadores como el *magnesio* (Moritz, 1944) o la *densidad relativa* (Freimuth y Swann, 1955) y más recientemente, Lorente et al. (1990a) estudian la *osmolaridad del plasma* y las concentraciones de *cloro*, *magnesio* y *potasio*, Yu-Chuan et al. (1990) las concentraciones de *flúor* y Jeanmomod et al. (1992) el *punto de congelación* de la sangre contenida en ambos ventrículos.

Destacan las investigaciones realizadas por Zhu et al. (2003b, 2005) donde el estudio de varios marcadores en la sangre de ambos ventrículos de sujetos ahogados, tanto en agua dulce como en agua salada, comparándolos con los resultados obtenidos en otras causas de muerte, permite diferenciar ambos grupos y el tipo de agua en el que se produjo la sumersión (dulce o salada), siempre que las determinaciones se realicen muy precozmente. Dichos marcadores son el *cloro*, *sodio*, *calcio*, *magnesio*, *urea* y *creatinina*. Encontraron que el marcador más eficiente para el diagnóstico de la sumersión era la diferencia de las concentraciones de urea entre el ventrículo izquierdo y el derecho y el marcador que mejor diferenciaba las sumersiones en agua salada de las de agua dulce era la concentración de magnesio en ventrículo izquierdo.

Zhu et al. también estudiaron la concentración de ciertos marcadores en sangre y en líquido pericárdico para el diagnóstico de la sumersión. Estudiaron la *troponina T* (Zhu et al., 2006a, 2006b), obteniendo resultados que les permiten asegurar que este marcador no sólo puede ser utilizado para el diagnóstico del infarto de miocardio, sino que también puede ser de gran ayuda para diferenciar los cuadros de infarto de los de sumersión y de graves hipotermias. Estudiaron también las concentraciones de *urea*, *creatinina* y *ácido úrico* (Zhu et al., 2007a), encontrando que, en los casos de sumersión, se obtienen valores más bajos de la concentración de urea en ventrículo izquierdo y en el líquido pericárdico al compararlos con los obtenidos en el ventrículo derecho y en sangre periférica, lo que atribuyen a la dilución de la sangre del ventrículo izquierdo debido a la entrada de agua. Así, un ratio alto entre las concentraciones del ventrículo derecho y sangre periférica respecto al líquido pericárdico puede ser utilizado como marcador para el diagnóstico de la sumersión.

De La Grandmaison et al. (2006) estudiaron las concentraciones de *hierro* en la sangre de ventrículo derecho e izquierdo, encontrando diferencias significativas en los casos de sumersión en agua dulce.

Li et al. (2009b) también estudiaron las concentraciones de *calcio* y *magnesio* en líquido pericárdico según distintas causas de muerte, encontrando que las concentraciones de estos elementos eran significativamente superiores en los casos de sumersión en agua salada comparándolo con las otras causas de muerte.

Matoba et al. (2012) estudiaron las concentraciones de *sodio*, *cloro*, *calcio* y *magnesio* en líquido pleural de ambas cavidades torácicas (izquierda y derecha) para el diagnóstico de la sumersión, pudiendo diferenciar además entre sumersiones en agua dulce y en agua salada.

Maraschi et al. (2012) presentaron los primeros resultados que demuestran que la concentración de *silicio* en sangre total de ambos ventrículos puede ser utilizada como marcador adicional en el diagnóstico de sumersión. Así, encontraron que la diferencia de la concentración de silicio entre los ventrículos izquierdo y derecho era significativamente mayor en los casos de sumersión, pudiendo además ser utilizado como marcador de sumersión en agua dulce.

1.2.12. Componentes alveolares que pueden ser encontrados en la circulación general

Los componentes alveolares, según Piette y De Letter (2006), van a ser desplazados de su localización habitual por el arrastre debido al líquido de sumersión aspirado pasando a la circulación general tras la ruptura de las paredes alveolares.

Reiter (1984) puso de manifiesto la presencia de *células de fumadores* en la sangre del ventrículo izquierdo en las víctimas de asfixia por sumersión, con la limitación de que sólo podría aplicarse a los fumadores activos. Existen pocas publicaciones sobre este tipo de marcador.

Por el contrario, el estudio del *surfactante pulmonar* ha sido objeto de estudio por parte de diferentes grupos de investigación. El surfactante pulmonar es un complejo lipoproteínico que recubre la superficie alveolar del pulmón, sintetizado principalmente por las células epiteliales alveolares tipo II y cuya función es reducir la tensión superficial en la interfase aire-líquido. Existen cuatro proteínas específicas del surfactante, dos de las cuales son hidrofílicas (SP-A y SP-D) y otras dos de carácter hidrofóbico (SP-B y SP-C), cuyo significado funcional no es bien conocido. De todas, SP-A es la proteína más abundante del surfactante pulmonar y puede ser analizada usando ensayos de biología molecular o mediante técnicas inmunohistoquímicas y bioquímicas: situaciones de asfixia, daño alveolar o síndrome

respiratorio agudo causan un aumento de esta proteína en sangre y alteraciones del patrón inmunohistoquímico en el pulmón.

La estabilidad post-mortem del surfactante pulmonar ha sido estudiada por Lorente et al. (1992) determinando que la estabilidad es aceptable durante las primeras 24 horas, sufriendo un progresivo deterioro entre las 48-96 horas. También estudiaron las modificaciones en las proporciones de los diferentes fosfolípidos del surfactante (fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina y fosfatidilglicerol) en lavados pulmonares de conejos ahogados en agua dulce, agua salada y grupo control (Lorente et al., 1990b), demostrando que son marcadores útiles en el diagnóstico de sumersión, ya que permitían distinguir por un lado las verdaderas sumersiones de las inmersiones post-mortem y por otro, las sumersiones en agua salada de las de sumersiones en agua dulce.

Kamada et al. (2000) estudiaron la proteína D del surfactante pulmonar (SP-D) en muestras de sangre de ahogados, cuyos niveles se encontraron elevados, tanto en los casos de agua dulce como de agua salada, siendo más altos en este último caso.

Por su parte, Zhu et al. (2000) estudiaron la distribución inmunohistoquímica de la proteína A del surfactante pulmonar (SP-A) en un total de 282 cadáveres autopsiados, de los que 59 habían fallecido por asfixia por sumersión. La inmunotinción más intensa y densa del SP-A se observó en los casos de ahogados, síndrome de las membranas hialinas y en casos de aspiración perinatal del líquido amniótico. Posteriormente, Zhu et al. (2002b) evaluaron los niveles séricos de SP-A y su distribución pulmonar en casos de ahogados en agua dulce y en agua salada, comprobándose que en los casos de sumersión en agua dulce existía una mayor acumulación granular intra-alveolar. En una publicación posterior, Zhu et al. (2003b) compararon también los niveles séricos de SP-A en sangre de ambos ventrículos en

víctimas de sumersión en agua dulce, en agua salada o por infarto agudo de miocardio, encontrando una concentración significativamente elevada de este marcador en ahogados en agua dulce, aunque los datos se solapaban con los obtenidos en los casos de sumersión en agua salada y en los fallecidos por infarto agudo de miocardio.

Pérez-Cárceles et al. (2008a) evaluaron conjuntamente los hallazgos microscópicos y la expresión inmunohistoquímica de la SP-A en lóbulos superiores e inferiores de los pulmones en distintas causas de muerte y su posible aplicación para el diagnóstico de sumersión, permitiendo así diferenciar los casos de asfixia y de sumersión de otras causas de muerte, y los casos de sumersión de otros tipos de asfixia. Además, sólo encontraron diferencias estadísticamente significativas en la inmuno-reactividad de SP-A de los lóbulos superiores de los pulmones, pudiéndose ser debido a las diferencias funcionales (ventilación/perfusión) en las distintas regiones del pulmón.

Posteriormente, Stemberga et al. (2009) y Quan et al. (2009b) demostraron que la detección inmunohistoquímica y bioquímica de SP-A podía ser útil para el diagnóstico forense de aquellos casos en los que la patogénesis incluía mecanismos de asfixia o afección pulmonar. Así, encontraron un aumento significativo de este marcador en las víctimas por sumersión y en aquellos fallecidos que presentaban daño pulmonar por insuficiencia respiratoria aguda y una disminución de estos niveles en los fallecidos por hipotermia.

Recientemente, Miyazato et al (2012) investigaron la patología molecular de la lesión pulmonar en las muertes por sumersión comparándola con otras asfixias y con la muerte por hipotermia. Para ello se estudiaron los niveles de expresión del RNA mensajero (mRNA) de SP-A, SP-D y de varias citoquinas en muestras de pulmón, encontrando niveles de mRNA de SP-A y SP-D más bajos en los casos de sumersión

y de asfixias mecánicas comparándolos con los casos de hipotermia. Sin embargo, los niveles de mRNA de las citoquinas fueron más altos en los casos de sumersión que en el resto. Estos resultados sugieren característicos patrones moleculares del daño pulmonar en los casos de sumersión, que implican la supresión de los surfactantes pulmonares y la activación de los reactantes de fase aguda, con altos niveles de expresión de ARNm de los surfactantes pulmonares en las muertes por hipotermia.

1.2.13. Otros marcadores

El *péptido natriurético auricular (ANP)* es un polipéptido secretado por las células del músculo cardiaco, poseedor de un potente efecto vasodilatador y estrechamente relacionado con el control homeostático del agua corporal, del sodio, potasio y tejido adiposo. Fue estudiado en 1986 por Anderson et al., quienes comprobaron que, durante la inmersión del hombre en agua termoneutral, las concentraciones plasmáticas del ANP se elevaban considerablemente del mismo modo que comprobaba una elevada eliminación urinaria de sodio.

Lorente et al. (1989) realizaron un trabajo experimental en conejos concluyendo que la determinación del ANP era útil para establecer el diagnóstico de la sumersión vital y para el diagnóstico diferencial entre la sumersión en agua dulce y en agua salada.

En un trabajo posterior, Zhu et al. (2007c) estudiaron el péptido natriurético auricular (ANP) y el péptido natriurético cerebral (BNP) en el líquido pericárdico, obteniendo una significativa elevación de los niveles de ANP en contraste con el leve aumento que sufre el BNP, tanto en los ahogados en agua dulce como en agua salada.

En 2012, Chen et al. utilizaron la patología molecular de ANP y BNP en miocardio para poder diferenciar la disfunción cardíaca como posible causa de la muerte o

como factor secundario a los procesos de muerte por sumersión o asfixia mecánica, encontrando que en estos casos la expresión del RNA mensajero de ANP y BNP era significativamente más bajo que en las muertes súbitas cardíacas.

Quan et al. (2001) estudiaron la *ubiquitina* en las neuronas de la “*substantia nigra*” mediante métodos inmunohistoquímicos en diferentes tipos de asfixias mecánicas. La tinción difusa de este marcador fue más frecuentemente observada en los casos de asfixia por sumersión, aunque también observaron resultados positivos en el resto de las asfixias mecánicas, como corresponde a la situación de estrés a la que es sometido el sistema nervioso central, tanto en la asfixia por sumersión como en el resto de las asfixias violentas.

En algunos casos muy concretos podría hacerse uso también de *eventuales contaminantes del medio de sumersión (lignosulfato sódico, sales de baño, etc)*, los cuales se incorporarían a los órganos de la víctima, tras la correspondiente inhalación del líquido de sumersión al que contaminan (Lehmann y Beuthin, 1971; Mukaida et al., 1998).

2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

La asfixia por sumersión es una de las causas más frecuentes de muerte aumentando su prevalencia a nivel mundial en los últimos años, especialmente en su etiología accidental. Esto se debe principalmente al aumento de la práctica de actividades acuáticas, aunque también hay que destacar las muertes por sumersión debidas a catástrofes naturales relacionadas con el agua (inundaciones, tormentas tropicales, huracanes e incluso tsunamis), donde la causa más frecuente de muerte es la sumersión, con un elevado número de víctimas que incrementan de forma continua la cifra de fallecidos.

La asfixia por sumersión supone un importante problema de salud pública. Sin embargo, debido a la falta de una definición uniforme e internacionalmente aceptada, se ha visto dificultada la recogida de datos epidemiológicos y también ha sido complicado acceder a una información fiable y completa al no existir un lenguaje común entre investigadores de diferentes especialidades.

Datos disponibles de la Organización Mundial de la Salud del 2010 vienen a poner de manifiesto una tasa de mortalidad por sumersión de 7 casos por 100.000 habitantes, colocando a la asfixia por sumersión como la segunda causa de muerte no intencional, tras las producidas por accidentes de tráfico.

Desde el punto de vista médico-legal, la muerte como resultado de la sumersión es la que plantea más interés e implicaciones de mayor trascendencia.

De todas las muertes por asfixia, la sumersión es la que requiere con mayor frecuencia recurrir a exámenes complementarios para confirmar o excluir una determinada causa de muerte o para proporcionar información adicional que permita la reconstrucción completa de los hechos. Se han utilizado distintos exámenes complementarios con la intención de resolver la causa de muerte y,

aunque se han analizado muchos métodos diagnósticos, el diagnóstico post-mortem de la asfixia por sumersión sigue siendo uno de los más difíciles en patología forense.

El test diagnóstico ideal como prueba definitiva de muerte por sumersión está todavía por descubrir y es necesario realizar más investigaciones. Los principios en los que se basan los análisis químicos complementarios para determinar la causa de muerte son el análisis de los elementos presentes en el medio de sumersión que penetran en el organismo y el análisis de la hemodilución. De todos, el estroncio es el marcador más sensible de aspiración de agua en un medio rico en este metal. Sin embargo, su concentración en ríos varía enormemente y su determinación en el caso de las sumersiones en agua dulce no siempre es útil para poder determinar la causa de muerte. En estos casos se han utilizado además otros marcadores bioquímicos para llegar a un diagnóstico correcto.

El **objetivo general** del estudio fue:

Analizar distintos parámetros bioquímicos en suero en distintas causas de muerte y su posible aplicación al diagnóstico de sumersión vital.

Los **objetivos específicos** fueron:

1. Determinar las concentraciones de distintos elementos traza en suero en diferentes causas de muerte.
2. Analizar si existen diferencias estadísticamente significativas en las concentraciones de estos marcadores bioquímicos asociados a la edad y el sexo de los fallecidos.

3. Evaluar la capacidad discriminadora de los elementos traza de forma individual y conjunta para diagnosticar las muertes por sumersión.
4. Evaluar la capacidad discriminadora de los elementos traza de forma individual y conjunta para diferenciar las muertes por sumersión en agua salada de las muertes por sumersión en agua dulce.
5. Determinar la influencia del intervalo post-mortem y el tiempo de permanencia del cadáver en el agua en las concentraciones de los marcadores bioquímicos analizados.
6. Analizar si existe una correlación significativa entre las concentraciones de estos elementos traza en suero y en el medio de sumersión.
7. Establecer un posible protocolo diagnóstico en el uso de los marcadores bioquímicos como herramienta complementaria en el correcto diagnóstico post-mortem de las asfixias por sumersión.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Casos de autopsia forense

Hemos estudiado las muestras recogidas de 140 cadáveres seleccionados de las autopsias médico-legales llevadas a cabo en el Instituto de Medicina Legal de Cádiz, siendo aprobado dicho estudio por el Comité de Ética de la Universidad de Murcia. Los casos fueron seleccionados aleatoriamente entre las autopsias médico-legales rutinarias, excepto en los casos de sumersión, en los que se incluyeron todos los casos ocurridos en un año.

De acuerdo con la escena, causa y circunstancias de la muerte, además de los hallazgos de la autopsia (hongo de espuma, espuma traqueobronquial, aumento de volumen de los pulmones con solapamiento de los bordes internos de ambos pulmones y presencia de fóvea), los 140 casos fueron clasificados en tres grupos diagnósticos: sumersión, otras asfixias y otras causas de muerte. Según la causa de muerte, los casos se distribuyeron en siete grupos: sumersión en agua dulce, sumersión en agua salada, ahorcadura, sofocación, aspiración, traumatismo múltiple, disparo con arma de fuego y enfermedad cardiovascular (*Tabla 3, Figuras 12 y 13*).

a. Sumersión (n=67)

a.1. Sumersión en agua salada (n=53)

a.2. Sumersión en agua dulce (n=14)

b. Otras asfixias (n=44)

b.1. Ahorcadura (n=33)

b.2. Sofocación (n=9)

b.3. Aspiración (n=2)

c. Otras causas (n=29)

c.1. Traumatismo múltiple (n=17)

c.2. Disparo con arma de fuego (n=8)

c.3. Enfermedad cardiovascular (n=4)

Grupos	N	%
Sumersión	67	47,9
Sumersión en agua dulce	14	10
Sumersión en agua salada	53	37,9
Otras asfixias	44	31,4
Ahorcadura	33	23,6
Otras asfixias	11	7,8
Otras causas	29	20,7
Traumatismo múltiple	17	12,1
Arma de fuego	8	5,7
Enfermedad cardiovascular	4	2,9
TOTAL	140	100

Tabla 3. Distribución de los casos por grupo diagnóstico y causa de muerte.

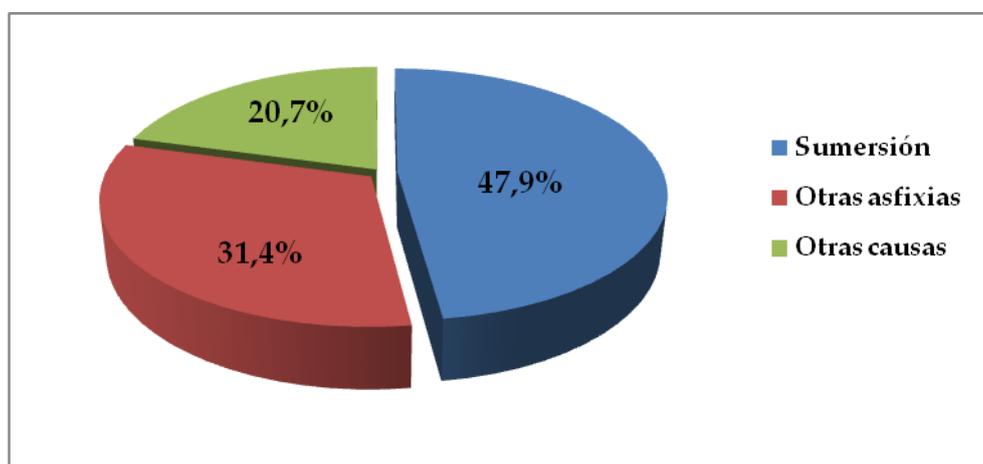


Figura 12. Distribución de los casos por grupo diagnóstico.

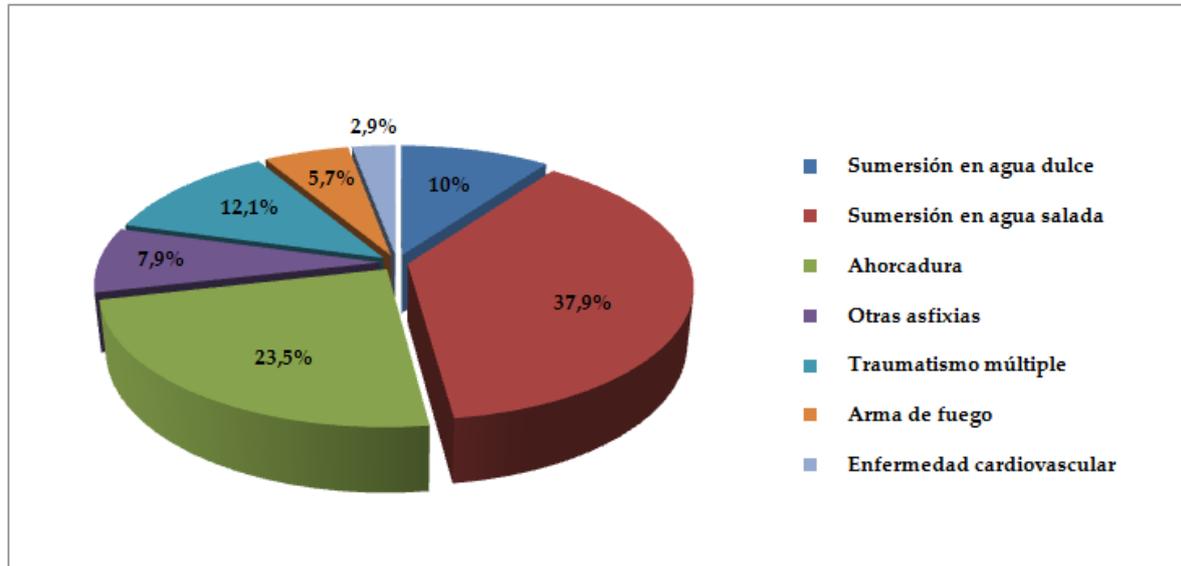


Figura 13. Distribución de los casos por causa de la muerte.

3.2. Recogida de muestras

Se extrajeron muestras de sangre de cada cadáver de tres localizaciones distintas:

- sangre de ventrículo derecho,
- sangre de ventrículo izquierdo,
- sangre periférica, extraída de la vena femoral o ilíaca.

De cada lugar se extrajeron 10 cc de sangre recogidos en 2 viales de 5 cc con distinto conservante (EDTA y gel separador sin conservante) y para evitar cualquier tipo de contaminación se obtuvieron de la siguiente forma:

- En los casos de sangre de ventrículo (izquierdo y derecho), las muestras se obtuvieron por punción intracardiaca evitando abrir el corazón tras la apertura pericárdica, obteniéndolas bien de venas cavas o de aurícula derecha por un lado y de aorta o ventrículo izquierdo en el lado opuesto.

- En el caso de sangre periférica, las muestras se obtuvieron por punción femoral, bien a través de punción intramuscular o bien con denudamiento del triángulo de Scarpa y exposición de la arteria para su obtención parenteral.

Las muestras recogidas en los viales con EDTA fueron conservadas a -70°C , mientras que las muestras recogidas en los viales sin conservante fueron centrifugadas a 3000 rpm durante 10 minutos para la recuperación de los sueros que fueron separados y almacenados a -70°C .

3.3. Análisis bioquímico

Se llevó a cabo un estudio a doble ciego analizando las muestras en el laboratorio sin conocer los resultados de las autopsias. Todas las determinaciones analíticas se realizaron en el Servicio de Análisis Clínicos del Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca.

En las muestras de sangre se realizaron las siguientes determinaciones bioquímicas:

- | | |
|----------------------------|-----------------------|
| - Estroncio (sangre total) | - Calcio (suero) |
| - Urea (suero) | - Magnesio (suero) |
| - Creatinina (suero) | - Hierro (suero) |
| - Sodio (suero) | - Troponina T (suero) |
| - Cloro (suero) | |

En los casos en los que se sospechó que la hemólisis podía afectar a los resultados se hicieron diluciones seriadas con agua desionizada hasta que el efecto de la interferencia fue eliminada.

En los caso de sumersión, se tomaron además muestras de agua del lugar del suceso (100 mL) y en ellas se realizaron las siguientes determinaciones:

- | | |
|-------------|------------|
| - Estroncio | - Calcio |
| - Sodio | - Magnesio |
| - Cloro | - Hierro |

3.3.1. Estroncio

Principio del método

El estroncio en sangre total se analizó mediante Espectrometría de Absorción Atómica Electrotérmica (ETAAS) con horno de grafito y corrección del efecto Zeeman (Azparren et al., 1994). Para ello se emplea un espectrómetro de absorción atómica de Perkin Elmer, modelo AAnalyst 600 (*Figura 14*).



Figura 14. Espectrómetro de absorción atómica de Perkin Elmer, modelo AAnalyst 600.

Las muestras líquidas son aspiradas mediante un flujo de gas de Argón hacia una cámara de grafito donde se seca la muestra, la materia orgánica se transforma en cenizas, la inorgánica se volatiliza y el estroncio presente en la disolución se transforma en vapor atomizado encontrándose en su estado fundamental. Esto se consigue mediante un horno de grafito sobre la denominada plataforma de L'vov (aumenta la sensibilidad, exactitud y posee un corrector de fondo Zeeman para reducir el background al mínimo). En este estado absorbe la radiación de 460,7 nm proveniente de una lámpara de cátodo hueco de estroncio. La absorbancia va a ser directamente proporcional a la concentración de estroncio de la disolución (ley de Lambert-Beer-Bouger).

Reactivos - Soluciones de trabajo

La determinación de estroncio en muestras de agua requiere una dilución 1:500 con agua bidestilada, mientras que para la determinación de este elemento en sangre total se requiere una dilución 1:5 también con agua bidestilada.

Calibración

El modo de calibración es lineal a 5 puntos, utilizando como estándares:

- Estándar 1: Agua bidestilada.
- Estándar 2: Solución de 10 µg/L de estroncio.
- Estándar 3: Solución de 20 µg/L de estroncio.
- Estándar 4: Solución de 30 µg/L de estroncio.
- Estándar 5: Solución de 40 µg/L de estroncio.

Todas estas soluciones se preparan a partir de una solución inicial de estroncio de 1000 mg/L.

Cálculos

Los resultados de las muestras deben multiplicarse por el factor de dilución empleado: factor 500 en el caso de las muestras de agua y factor 5 en el caso de las muestras de sangre total.

Intervalo de medición

0,36-40 µg/L.

Valores teóricos (Piette et al., 1989; Iyengar et al., 1978)

Agua de mares y océanos: ≈ 8000 µg/L, con variaciones dependiendo de la salinidad.

Agua de ríos: varía enormemente ya que en algunos ríos su concentración llega a ser similar a la encontrada en sangre, pero en otros, su concentración puede ser diez veces superior.

Sangre total: 16-95 µg/L.

Suero: 20-46 µg/L.

3.3.2. Urea

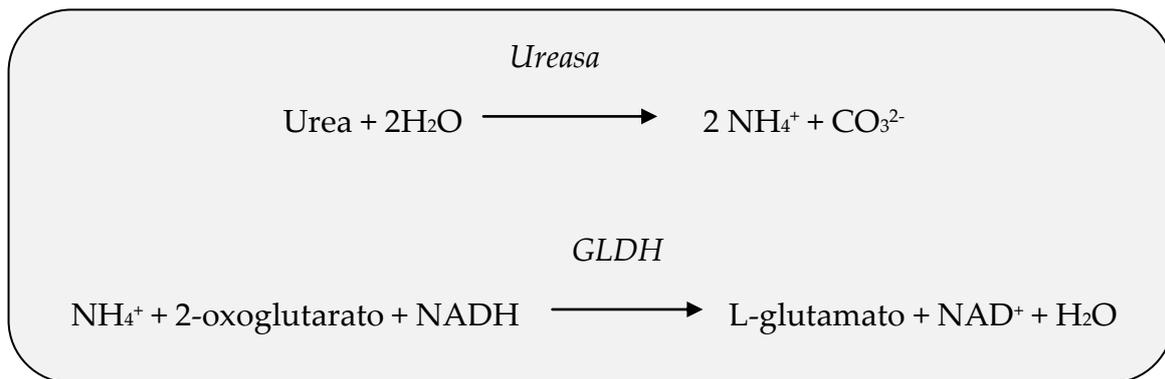
Principio del método

Test in vitro para la determinación cuantitativa de la urea y del nitrógeno ureico en suero, plasma y orina humanos en los sistemas Roche/Hitachi Cobas c 701 (*Figura 15*).



Figura 15. Roche/Hitachi Cobas c 701.

Consiste en un test cinético con ureasa y glutamato deshidrogenasa (Richterich y Colombo, 1978; Sampson et al., 1980). La urea es hidrolizada por la ureasa a amonio y carbonato. En una segunda reacción, el 2-oxoglutarato reacciona con amonio en presencia de la glutamato deshidrogenasa (GLDH) y la coenzima NADH para producir L-glutamato. En esta reacción, por cada mol de urea hidrolizada se oxidan dos moles de NADH a NAD⁺. La velocidad con que la concentración de NADH disminuye es directamente proporcional a la concentración de urea en la muestra y se mide fotométricamente.



Reactivos - Soluciones de trabajo

R1 NaCl al 9 %

R3 Tampón TRIS: 220 mmol/L, pH 8,6; 2-oxoglutarato: 73 mmol/L; NADH: 2,5 mmol/L; ADP: 6,5 mmol/L; ureasa (haba blanca): $\geq 300 \mu\text{kat/L}$; GLDH (hígado bovino): $\geq 80 \mu\text{kat/L}$; conservante; estabilizadores no reactivos.

Calibración

El modo de calibración es lineal a dos puntos, utilizando como estándar 1 el agua y como estándar 2 el C.F.A.S., calibrador bioquímico de Roche Diagnostics de valor variable según lote.

Cálculos

Los analizadores Roche/Hitachi calculan automáticamente la concentración de analito de cada muestra.

Factor de conversión: $\text{mmol/L de urea} \times 6,006 = \text{mg/dL de urea}$

Interferencias

Ictericia: Sin interferencias significativas hasta una concentración de bilirrubina directa/indirecta de aproximadamente 60 mg/dL.

Hemólisis: Sin interferencias significativas hasta una concentración de hemoglobina de aproximadamente 1.000 mg/dL.

Lipemia: Sin interferencias significativas hasta un índice de lipemia de 1.000.

Los iones de amonio pueden causar resultados erróneamente elevados.

Fármacos: No se han registrado interferencias con paneles de fármacos de uso común en concentraciones terapéuticas.

En casos muy raros pueden obtenerse resultados falsos debidos a la gammapatía, particularmente del tipo IgM (macroglobulinemia de Waldenström).

Intervalo de medición

3,0-240 mg/dL de urea

El límite inferior de detección (3,0 mg/dL) equivale a la menor concentración medible de analito que puede distinguirse de cero. Se calcula como el valor situado a tres desviaciones estándar por encima del estándar más bajo (estándar 1 + 3 DE, repetibilidad, n = 21).

Las muestras con concentraciones superiores a 240 mg/dL se calculan a través de la función de repetición del ciclo. La dilución automática de las muestras por la función

de repetición del ciclo es de 1:3. Los resultados de las muestras diluidas por la función de repetición del ciclo se multiplican automáticamente por el factor 3.

Valores teóricos (Löhr et al., 2009)

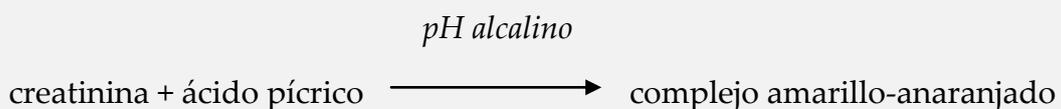
16,6-48,5 mg/dL.

3.3.3. Creatinina

Principio del método

Prueba in vitro para la determinación cuantitativa de la creatinina en suero, plasma y orina humanos en los sistemas Roche/Hitachi Cobas c 701 (*Figura 15*).

Consiste en una prueba cinética colorimétrica basada en el método de Jaffé (Jaffé, 1886; Fabiny y Ertinghausen, 1971; Bartels y Böhmer; 1971). En una solución alcalina, la creatinina forma un complejo amarillo-anaranjado con el picrato. La tasa de formación de colorante es proporcional a la concentración de creatinina en la muestra. La prueba emplea la determinación del blanco para minimizar la interferencia por bilirrubina. Para corregir las reacciones inespecíficas por cromógenos no-creatinina en suero y plasma, como por ejemplo las proteínas y las cetonas, los resultados para suero o plasma se corrigen en $-26 \mu\text{mol/L}$ ($-0,3 \text{ mg/dL}$).



Reactivos - Soluciones de trabajo

R1 Hidróxido de potasio: 900 mmol/L; fosfato: 135 mmol/L; pH \geq 13,5; conservante, estabilizador.

R3 Ácido pícrico: 38 mmol/L; pH 6,5; estabilizador; conservante.

Calibración

El modo de calibración es lineal a dos puntos, utilizando como estándar 1 el agua y como estándar 2 el C.F.A.S., calibrador bioquímico de Roche Diagnostics de valor variable según lote.

Cálculos

Los analizadores Roche/Hitachi calculan automáticamente la concentración de analito de cada muestra.

Factor de conversión: $\mu\text{mol/L} \times 0,0113 = \text{mg/dL}$

Interferencias

Ictericia: Sin interferencias significativas hasta una concentración de bilirrubina directa de aproximadamente 5 mg/dL o una concentración de bilirrubina indirecta de aproximadamente 10 mg/dL.

Hemólisis: Sin interferencias significativas hasta una concentración de hemoglobina de aproximadamente 1.000 mg/dL.

Lipemia: Sin interferencias significativas hasta un índice de lipemia de 800.

Fármacos: No se han registrado interferencias con paneles de fármacos de uso común en concentraciones terapéuticas.

En casos muy raros pueden obtenerse resultados falsos debidos a la gammapatía, particularmente del tipo IgM (macroglobulinemia de Waldenström).

Intervalo de medición

0,17-24,9 mg/dL.

El límite inferior de detección (0,17 mg/dL) equivale a la menor concentración medible de analito que puede distinguirse de cero. Se calcula como el valor situado a tres desviaciones estándar por encima del estándar más bajo (estándar 1 + 3 DE, repetibilidad, n = 21).

Concentraciones superiores a 24,9 mg/dL se calculan a través de la función de repetición del ciclo. La dilución automática de las muestras por la función de repetición del ciclo es de 1:5. Los resultados de las muestras diluidas por la función de repetición del ciclo se multiplican automáticamente por el factor 5.

Valores teóricos (Mazzachi et al., 2000; Schlebusch et al., 2002)

Adultos:

Hombres: 0,7-1,2 mg/dL

Mujeres: 0,50-0,90 mg/dL

Niños:

Neonatos (prematuros): 0,29-1,04 mg/dL

Neonatos (a término): 0,24-0,85 mg/dL

2 - 12 meses: 0,17-0,42 mg/dL

1 - <3 años: 0,24-0,41 mg/dL

3 - <5 años: 0,31-0,47 mg/dL

5 - <7 años: 0,32-0,59 mg/dL

7 - <9 años: 0,40-0,60 mg/dL

9 - <11 años: 0,39-0,73 mg/dL

11 - <13 años: 0,53-0,79 mg/dL

13 - <15 años: 0,57-0,87 mg/dL

3.3.4. Sodio y Cloro

Principio del método

El módulo ISE de los sistemas Roche/Hitachi Cobas ISE (*Figura 16*) está concebido para la determinación de sodio, potasio y cloruro en suero, plasma u orina empleando electrodos selectivos de iones.



Figura 16. Roche/Hitachi Cobas ISE.

Un electrodo selectivo de iones (ISE) hace uso de las propiedades especiales de ciertas membranas para crear un potencial eléctrico (fuerza electromotriz = FEM) que permite medir los iones en solución. El electrodo cuenta con una membrana selectiva que está en contacto con la solución analizada y con una solución interna. La solución interna contiene el ión analizado en una concentración fija. Debido a las características especiales de la membrana, el ión analizado se fija estrechamente a ambos lados de la misma. La fuerza electromotriz de la membrana se determina como la diferencia entre la concentración del ión analizado en la solución analizada y en la solución interna. La FEM varía según la ecuación de Nernst para un ión específico en solución:

$$(1) \quad E = E_0 + \frac{RT}{nF} \times \ln \left(\frac{f \times C_t}{f \times C_i} \right)$$

Siendo:

E = la FEM del electrodo

E_0 = la FEM estándar

R = la constante

T = la temperatura

n = la carga del ión

F = la constante de Faraday

\ln = el logaritmo natural (en base e)

f = el coeficiente de actividad

C_t = la concentración del ión en la solución analizada

C_i = la concentración del ión en la solución interna

Ya que los iones de sodio y cloruro sólo tienen una carga, R , T , n , y F se combinan en un valor único que representa la pendiente (S). Para la determinación en un analizador Roche/Hitachi Modular ISE, donde las muestras se diluyen 1:31, tanto la fuerza iónica como el coeficiente de actividad son esencialmente constantes.

La concentración del ión analizado de la solución interna también es constante. Estas constantes se combinan en el término E_0 . El valor de E_0 también es específico para el tipo de electrodo de referencia utilizado. La ecuación (1) puede escribirse, por tanto, de la siguiente forma:

$$E = E_0 + S + \ln (C_t)$$

El sistema de medición completo para un ión en particular incluye el electrodo selectivo de iones, un electrodo de referencia y circuitos electrónicos de medición y procesamiento de la FEM que proporcionan la concentración del ión analizado.

El electrodo para el sodio se basa en portadores neutrales (Shono et al., 1982; Shibata et al., 1992) mientras que el electrodo de cloruro se basa en un intercambiador de iones (Hartman et al., 1978).

Reactivos - Soluciones de trabajo

ELECTRODOS	Sodio, Cloruro, Referencia
ELECTROLITO DE REFERENCIA	1 mol/L de cloruro de potasio. El frasco de electrolito se conecta directamente con el tubo al electrodo de referencia ISE. Esta solución proporciona el potencial fuerte y estable en el electrodo de referencia necesario para realizar cada medición de ISE.
DILUYENTE	Tampón HEPES 10 mmol/L, trietanolamina 7 mmol/L, conservante. Necesario para la dilución de las muestras.
ESTÁNDAR INTERNO	Tampón HEPES 10 mmol/L, trietanolamina 7 mmol/L, cloruro de sodio 3,06 mmol/L, acetato sódico 1,45 mmol/L, cloruro de potasio 0,16 mmol/L, conservante. Se emplea en la calibración de base que se efectúa en cada ciclo ISE.
SOLUCIÓN DE LIMPIEZA	Solución de hidróxido de sodio al 12% con solución de hipoclorito de sodio < 2% de Cl

activo. Destinada a limpiar los electrodos selectivos de iones, el recipiente y las tuberías.

Calibración

Se requieren tres soluciones de calibración para la calibración completa de sodio, potasio y cloro: ISE Standard 1 (bajo), ISE Standard 2 (alto) e ISE Standard 3 (ISE Compensator basado en proteínas). La pendiente de la curva de calibración se calcula a partir de los estándares 1 y 2. El compensador ISE sirve para reducir los efectos producidos por la matriz. Esto sólo afecta a la intersección, no a la pendiente. Durante la calibración y tras cada muestra se mide un estándar interno para corregir los efectos de la desviación sistemática en la calibración.

Interferencias

Ictericia: Sin interferencias significativas hasta una concentración de bilirrubina directa/indirecta de aproximadamente 60 mg/dL.

Hemólisis: Sin interferencias significativas hasta una concentración de hemoglobina de aproximadamente 1.000 mg/dL.

Lipemia: Sin interferencias significativas hasta un índice de lipemia de 2000.

Fármacos: No se han registrado interferencias con paneles de fármacos de uso común en concentraciones terapéuticas.

Intervalo de medición

Sodio: 80-180 mmol/L

Cloro: 60-140 mmol/L

Valores teóricos (Burtis y Ashwood, 2001)

Sodio: 136-145 mmol/L

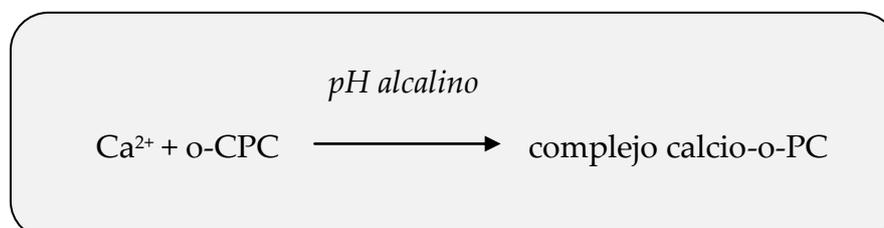
Cloro: 98-107 mmol/L

3.3.5. Calcio

Principio del método

Prueba in vitro para la determinación cuantitativa del calcio en suero, plasma y orina humanos en los sistemas Roche/Hitachi Cobas c 701 (*Figura 15*).

Método según Schwarzenbach con o-cresolftaleína complexona (Schwarzenbach, 1955). En condiciones alcalinas, los iones de calcio reaccionan con la o-cresolftaleína complexona (o-CPC) formando un complejo de color violeta. La adición de 8-hidroxiquinolina previene interferencias debidas al magnesio y al hierro.



La intensidad cromática del complejo formado es directamente proporcional a la concentración de calcio y se mide fotométricamente.

Reactivos - Soluciones de trabajo

- R1 CAPS (ácido 3-[ciclohexilamino]-1-propanesulfónico): 525 mmol/L; NaOH: 400 mmol/L, pH 11,3; agente tensoactivo no reactivo
- R3 complexona o-cresolftaleína: 0,5 mmol/L; 8-hidroxiquinolina: 30 mmol/L; pH 1,3; estabilizador

Calibración

El modo de calibración es lineal a dos puntos, utilizando como estándar 1 el agua y como estándar 2 el C.F.A.S., calibrador bioquímico de Roche Diagnostics de valor variable según lote.

Cálculos

Los analizadores Roche/Hitachi calculan automáticamente la concentración de analito de cada muestra.

Factor de conversión: $\text{mmol/L} \times 4,01 = \text{mg/dL}$

Interferencias

Ictericia: Sin interferencias significativas hasta una concentración de bilirrubina directa/indirecta de aproximadamente 60 mg/dL.

Hemólisis: Sin interferencias significativas hasta una concentración de hemoglobina de aproximadamente 1.000 mg/dL.

Lipemia: Sin interferencias significativas hasta un índice de lipemia de 2.000.

Fármacos: No se han registrado interferencias con paneles de fármacos de uso común en concentraciones terapéuticas.

En casos muy raros pueden obtenerse resultados falsos debidos a la gammapatía, particularmente del tipo IgM (macroglobulinemia de Waldenström).

Intervalo de medición

0,4-20 mg/dL

El límite inferior de detección (0,4 mg/dL) equivale a la menor concentración medible de analito que puede distinguirse de cero. Se calcula como el valor situado a tres desviaciones estándar por encima del estándar más bajo (estándar 1 + 3 DE, repetibilidad, n = 21).

Las muestras con concentraciones superiores a 20 mg/dL se determinan a través de la función de repetición del ciclo. La dilución automática de las muestras por la función de repetición del ciclo es de 1:1,5. Los resultados de las muestras diluidas por la función de repetición del ciclo se multiplican automáticamente por el factor 1,5.

Valores teóricos (Wu, 2006)

Niños:

0-10 días: 7,6-10,4 mg/dL

10 días-2 años: 9,0-11,0 mg/dL

2-12 años: 8,8-10,8 mg/dL

Adultos:

12-60 años: 8,4-10,2 mg/dL

60-90 años: 8,8-10,2 mg/dL

>90 años: 8,2-9,6 mg/dL

3.3.6. Magnesio

Principio del método

El método de referencia para la determinación de magnesio en suero es la espectrofotometría de absorción atómica de llama (Sunderman y Carroll, 1965). Para ello se emplea un espectrómetro de absorción atómica de Perkin Elmer modelo 5100 PC (*Figura 17*).



Figura 17. Espectrómetro de absorción atómica de Perkin Elmer modelo 5100 PC.

Este método se basa en la energía de una llama de aire/acetileno con presiones 4 y 1.1 bares respectivamente, que hace que los átomos de magnesio de una disolución pasen al estado fundamental y sean entonces capaces de absorber la radiación de

285,6 nm proveniente de una lámpara de cátodo hueco de magnesio. La absorbancia va a ser directamente proporcional a la concentración de magnesio de la disolución (ley de Lambert-Beer-Bouger).

Reactivos - Soluciones de trabajo

La determinación de magnesio en muestras de suero requiere un tratamiento previo con lantano para la eliminación de los iones fosfato antes de hacer la medición de la absorbancia a 285,6 nm. Así, las muestras de suero se deben diluir 1/100 con óxido de lantano al 0,2% (50 µL de suero (o control) + 5 mL de lantano 0,2%).

DILUYENTE ÓXIDO DE LANTANO (La_2O_3): Primero se prepara la solución de óxido de lantano de 50.000 ppm y a partir de ésta, la solución de óxido de lantano al 0,2%.

Calibración

Las concentraciones de magnesio sérico son calculadas a partir de una curva de calibración lineal que resulta del análisis de calibradores hechos con el mismo diluyente de lantano y cantidades de Na y K equivalentes a las presentes en suero diluído 50 veces. Para la preparación de los estándares tendremos por tanto que hacer la correspondiente dilución 1/100 con Lantano 0,2%.

La recta de calibración es de tres puntos:

- Estándar 1: Blanco (5 ml de óxido de lantano 0,2%)
- Estándar 2: 20 ppm diluido 1/100 (50 µL de 20 ppm + 5 ml de lantano 0,2%)
- Estándar 3: 40 ppm diluido 1/100 (50 µL de 40 ppm + 5 ml de lantano 0,2%)

Estas soluciones se preparan a partir de una solución de Mg de 100 ppm.

Cálculos

El analizador calcula automáticamente la concentración de magnesio de cada muestra en mg/dL.

Interferencias

Debido a que la concentración de magnesio en eritrocitos es tres veces mayor que en suero, la muestra debería separarse de los eritrocitos tan pronto como sea posible.

Las muestras hemolizadas no deben usarse para su análisis.

La lipemia con triglicéridos de 600 mg/dL y una bilirrubina de 20 mg/dL disminuyen la concentración de magnesio en 0,6 mg/dL y 1,0 mg/dL respectivamente partiendo de una concentración de magnesio de 1,8 mg/dL.

Intervalo de medición

0,1-4 mg/dL.

Valores teóricos (Pesce y Kaplan, 1987)

Hombres: 1,69-2,43 mg/dL

Mujeres: 1,69-2,29 mg/dL

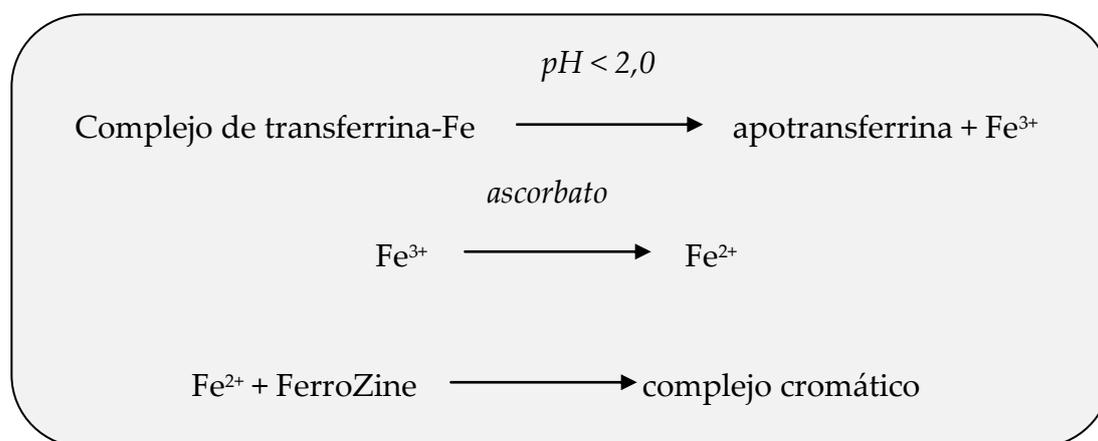
Recién nacidos (hasta 5 meses): 1,04-1,56 mg/dL

3.3.7. Hierro

Principio del método

Test in vitro para la determinación cuantitativa de hierro en suero y plasma humanos en los sistemas Roche/Hitachi Cobas c 701 (*Figura 15*).

Consiste en un test colorimétrico basado en el método FerroZine sin desproteinización (Siedel et al., 1984). En un medio ácido, el hierro se libera de la transferrina. Las muestras lipémicas se aclaran con detergente. El ascorbato reduce los iones de Fe^{3+} liberados a iones de Fe^{2+} , que reaccionan entonces con FerroZine para formar un complejo cromático. La intensidad cromática es directamente proporcional a la concentración de hierro y puede determinarse fotométricamente.



Reactivos - Soluciones de trabajo

R1 Ácido cítrico: 200 mmol/L; tiourea: 115 mmol/L; detergente

R3 Ascorbato sódico: 150 mmol/L; FerroZine: 6 mmol/L; conservante

Calibración

El modo de calibración es lineal a dos puntos, utilizando como estándar 1 el agua y como estándar 2 el C.F.A.S., calibrador bioquímico de Roche Diagnostics de valor variable según lote.

Cálculos

Los analizadores Roche/Hitachi calculan automáticamente la concentración de analito de cada muestra.

Factor de conversión: $\mu\text{mol/L} \times 5,59 = \mu\text{g/dL}$

Interferencias

Ictericia: Sin interferencias significativas hasta una concentración de bilirrubina directa/indirecta de aproximadamente 60 mg/dL.

Hemólisis: Sin interferencias significativas hasta una concentración de hemoglobina de aproximadamente 200 mg/dL. Las concentraciones elevadas de hemoglobina producen valores falsamente elevados debido a la contaminación de la muestra con el hierro fijado a la hemoglobina.

Lipemia: Sin interferencias significativas hasta un índice de lipemia de 1.500.

Fármacos: No se han registrado interferencias con paneles de fármacos de uso común en concentraciones terapéuticas. En pacientes tratados con suplementos férricos o

fármacos fijadores de metales, el hierro fijado al fármaco puede no reaccionar adecuadamente con el test, obteniéndose resultados falsamente disminuidos.

En casos muy raros pueden obtenerse resultados falsos debidos a la gammapatía, particularmente del tipo IgM (macroglobulinemia de Waldenström).

Intervalo de medición

5,00-1.000 µg/dL

El límite inferior de detección (5,00 µg/dL) equivale a la menor concentración medible de analito que puede distinguirse de cero. Se calcula como el valor situado a tres desviaciones estándar por encima del estándar más bajo (estándar 1 + 3 DE, repetibilidad, n = 21).

Las muestras con concentraciones superiores a 1.000 µg/dL se determinan a través de la función de repetición del ciclo. En muestras con concentraciones superiores, la función de repetición del test disminuye el volumen de la muestra por el factor 2,12. Los resultados son multiplicados automáticamente por este factor.

Valores teóricos (Löhr et al., 2008)

Hombres: 59-158 µg/dL

Mujeres: 37-145 µg/dL

3.3.8. Troponina T

Principio del método

Test inmunológico in vitro para la determinación cuantitativa de la troponina T en suero y plasma humanos en los sistemas Roche/Hitachi Cobas e 602 (*Figura 18*).



Figura 18. Roche/Hitachi Cobas e 602.

Este test consiste en un inmunoensayo de electroquimioluminiscencia ("ECLIA") que emplea dos anticuerpos monoclonales específicos dirigidos contra la troponina T cardíaca humana (Ricchiuti et al., 1998). Los anticuerpos reconocen dos epítopes (en los aminoácidos 125-131 y 136-147) situados en la parte central de la proteína troponina T cardíaca, que comprende un total de 288 aminoácidos. Se detecta tanto la forma libre de la troponina T así como los complejos binarios y terciarios de la troponina (Wu et al., 1998).

Consiste en una técnica tipo sandwich con una duración total de 18 minutos:

- 1ª incubación: 15 μL de muestra, un anticuerpo biotinilado monoclonal específico anti-troponina T y un anticuerpo específico monoclonal anti-troponina T marcado con quelato de rutenio ([Quelato Tris (2-2'-bipiridina) rutenio (II)] (Rubpy) $_{3^{2+}}$) forman un complejo sandwich.
- 2ª incubación: Después de incorporar las micropartículas recubiertas de estreptavidina, el complejo formado se fija a la fase sólida por interacción entre la biotina y la estreptavidina.
- La mezcla de reacción es trasladada a la célula de lectura donde, por magnetismo, las micropartículas se fijan a la superficie del electrodo. Los elementos no fijados se eliminan posteriormente con el reactivo ProCell. Al aplicar una corriente eléctrica definida se produce una reacción quimioluminiscente cuya emisión de luz se mide directamente con un fotomultiplicador.
- Los resultados se obtienen mediante una curva de calibración realizada en el sistema a partir de una calibración a dos puntos y una curva máster (calibración a 5 puntos) incluida en el código de barras del reactivo.

Reactivos - Soluciones de trabajo

- M Micropartículas recubiertas de estreptavidina: 0,72 mg/mL; conservante.
- R1 Anticuerpo monoclonal biotinilado anti-troponina T (ratón) 1,5 mg/L; tampón fosfato 100 mmol/L, pH 6,0; conservante, inhibidores.

R2 Anticuerpo monoclonal anti-troponina T (ratón) marcado con quilato de rutenio 1,2 mg/L; tampón fosfato 100 mmol/L, pH 6,0; conservante.

Calibración

El modo de calibración es lineal a dos puntos, utilizando como estándares los específicos de Troponina T de Roche Diagnostics (Troponin T CalSet), de valores aproximados 0,075 ng/mL y 10 ng/mL (varían según lote).

Cálculos

El analizador calcula automáticamente la concentración de analito de cada muestra en ng/mL.

Interferencias

Ictericia: Sin interferencias significativas hasta una concentración de bilirrubina de aproximadamente 27 mg/dL.

Hemólisis: Sin interferencias significativas hasta una concentración de hemoglobina de aproximadamente 100 mg/dL. Las muestras que evidencian hemólisis pueden causar interferencias.

Lipemia: Sin interferencias significativas hasta un índice de lipemia de 1.500.

No se han observado interferencias por factores reumatoides hasta una concentración de 2000 UI/mL.

No se ha registrado el efecto prozona con concentraciones de troponina T de hasta 400 ng/mL.

Se analizaron in vitro 50 fármacos de uso extendido sin encontrar interferencias.

Los resultados obtenidos con muestras de plasma recogidas en tubos con conservante de oxalato/fluoruro arrojaron valores disminuidos de troponina T respecto de los correspondientes a muestras de suero.

Intervalo de medición

0,010-25,0 ng/mL

El límite de detección (0,010 ng/mL) equivale a la menor concentración medible de Troponina T que puede distinguirse de cero. Se calcula como la concentración situada a 3 desviaciones estándar por encima del estándar más bajo (calibrador máster, estándar 1 + 3 DE, estudio de repetibilidad, n = 21).

Los valores superiores al intervalo de medición se indican como > 25,0 ng/mL.

Valores teóricos (Müller-Bardorff et al., 1997)

0-0,1 ng/mL.

3.4. Análisis estadístico

Para llevar a cabo el análisis estadístico de los datos se ha utilizado el programa SPSS versión 19.0. Se han aplicado los siguientes análisis:

3.4.1. *Análisis descriptivo de los datos*

La estadística descriptiva se encarga de ordenar, presentar, sintetizar y organizar los datos de forma inteligente y científica. Este análisis nos proporciona una idea de la forma que tienen los datos: su posible distribución de probabilidad con sus parámetros de centralización (media, mediana y moda) así como sus parámetros de dispersión (rango, varianza y desviación típica).

- *Media*: Valor promedio de un conjunto de valores.

- *Mediana*: Valor de la variable que deja el mismo número de datos antes y después que él.

- *Moda*: Valor con una mayor frecuencia en una distribución de datos.

- *Rango*: Diferencia entre el valor máximo y el valor mínimo de un conjunto de datos. Comparte unidades con los datos.

- *Varianza*: Promedio teórico de las desviaciones cuadráticas de los diferentes valores que puede tomar la variable respecto de su valor medio teórico o esperanza. Se expresa en la misma unidad de los datos de la variable pero elevada al cuadrado.

- *Desviación típica*: Raíz cuadrada de la varianza expresada en las mismas unidades de los datos de la variable objeto de estudio.

En nuestro estudio se han obtenido distintos estadísticos descriptivos de cada una de las variables: media, desviación típica y rango. Cuando las variables analizadas

tenían desviaciones elevadas, se incluyó el cálculo de otras medidas de tendencia central, como la mediana y la moda.

3.4.2. Análisis de comparación de medias

Según sea la distribución de las variables estudiadas se deben aplicar unos métodos estadísticos u otros.

- Métodos estadísticos paramétricos: Cuando las variables estudiadas presentan una distribución normal: aquella en la que los datos de las variables se agrupan de forma simétrica alrededor de la media aritmética en forma de campana y es asintótica respecto al eje de abscisas. Presenta dos puntos de inflexión que coinciden con la desviación típica y el área total bajo la curva es igual a uno. Esta distribución se aplica siempre a variables cuantitativas continuas.

- Métodos estadísticos no paramétricos: Cuando las variables estudiadas no presentan una distribución normal. Para comprobar si las variables estudiadas siguen una distribución normal o no se debe realizar el Test de Kolmogorov-Smirnov (la hipótesis nula que se contrasta es que los datos muestrales proceden de poblaciones normales).

En nuestro estudio, tras comprobar mediante el Test de Kolmogorov-Smirnov que las variables estudiadas no seguían una distribución normal, se han aplicado los siguientes test:

- el *Test de la U de Mann-Whitney*, test no paramétrico utilizado para comparar los valores de dos variables cuantitativas u ordinales de dos muestras

independientes que pueden tener tamaños distintos. Es la versión no paramétrica de la prueba t de Student. En nuestro estudio se utiliza para comparar los valores obtenidos entre dos grupos diagnósticos.

- el *Test de Kruskal-Wallis*, un test no paramétrico utilizado para comparar los valores de variables cuantitativas u ordinales de tres o más muestras independientes. Es una extensión de la prueba de la U de Mann-Whitney para 3 o más grupos. Es la versión no paramétrica del análisis de la varianza simple (ANOVA). En nuestro estudio se utiliza para comparar los valores obtenidos en los distintos grupos diagnósticos.

- el *Test de Wilcoxon*, test no paramétrico para comparar dos muestras apareadas y determinar si existen diferencias entre ellas. Es la versión no paramétrica de la prueba t de Student para muestras apareadas. En nuestro estudio nos permite comprobar si existen diferencias estadísticamente significativas en las concentraciones de los distintos marcadores bioquímicos entre los dos ventrículos en cada caso.

En todos los test aplicados en este estudio se han considerado diferencias estadísticamente significativas para una probabilidad $p \leq 0.05$.

3.4.3. Análisis de correlación

Para valorar la asociación entre dos variables cuantitativas hemos aplicado el método conocido como correlación.

La cuantificación de la fuerza de la relación lineal entre dos variables cuantitativas se estudia por medio del cálculo del coeficiente de correlación de Pearson. Dicho coeficiente oscila entre -1 y 1. Un valor de 1 indica una relación directa y perfecta y un valor de -1 indica una relación inversa y perfecta. Una correlación próxima a 0 indica que no hay relación lineal entre las dos variables.

El coeficiente de correlación posee las siguientes características:

a.- El valor del coeficiente de correlación es independiente de cualquier unidad usada para medir las variables.

b.- El valor del coeficiente de correlación se altera de forma importante ante la presencia de un valor extremo, como sucede con la desviación típica. Ante estas situaciones conviene realizar una transformación de los datos que cambia la escala de medición y modera el efecto de los valores extremos (transformación logarítmica).

c.- El coeficiente de correlación mide sólo la relación con una línea recta. Dos variables pueden tener una relación curvilínea fuerte a pesar de que su correlación sea pequeña. Por tanto, cuando analizamos las relaciones entre dos variables debemos representarlas gráficamente y posteriormente calcular el coeficiente de correlación.

d.- El coeficiente de correlación no se debe extrapolar más allá del rango de valores observado de las variables a estudio ya que la relación existente entre X e Y puede cambiar fuera de dicho rango.

e.- La correlación no implica causalidad. La causalidad es un juicio de valor que requiere más información que un simple valor cuantitativo de un coeficiente de correlación.

Cuando las variables estudiadas no siguen una distribución normal se utiliza el coeficiente de Spearman, coeficiente de correlación que estudia la relación entre dos variables aleatorias continuas y que tiene el mismo significado que el coeficiente de Pearson.

En nuestro estudio, como las variables no se ajustan a una distribución normal, se ha utilizado la *Correlación de Spearman* para comprobar si existe una correlación positiva entre las concentraciones de los elementos traza en el agua de sumersión y las concentraciones en sangre, entre la edad y el intervalo post-mortem con los distintos grupos diagnósticos, entre los marcadores bioquímicos en suero y la edad, el sexo y el intervalo post-mortem y entre las concentraciones de estroncio en sangre y otros elementos traza en los casos de sumersión.

3.4.4. Curvas ROC ("Receiver Operating Characteristic": Curva de característica operativa para el receptor)

El análisis de las curvas ROC constituye un método estadístico que sirve para determinar la exactitud diagnóstica de tests que utilizan escalas continuas. Se utilizan con tres propósitos específicos: determinar el punto de corte en el que se alcanza la sensibilidad y especificidad más alta, evaluar la capacidad discriminativa del test diagnóstico y comparar la capacidad discriminativa de dos o más tests diagnósticos que expresan sus resultados como escalas continuas.

La curva ROC se construye en base a la unión de distintos puntos de corte, correspondiendo el eje Y a la sensibilidad y el eje X a (1-especificidad) de cada uno de ellos. Ambos ejes incluyen valores entre 0 y 1 (0% a 100%). El punto de corte que determina la sensibilidad y especificidad más alta para cada variable fue obtenido como el punto más cercano al punto "ideal" de la curva ROC, que es aquel en el que la sensibilidad fuese 1 y (1 - la especificidad) fuese 0. Este punto de corte es el punto en el que la sensibilidad y la especificidad del test están equilibradas.

A modo de referencia, en todo gráfico de curva ROC se traza una línea desde el punto 0,0 al punto 1,1, llamada diagonal de referencia o línea de no-discriminación que describe la capacidad discriminativa de un test diagnóstico. Así, un test diagnóstico tendrá mayor capacidad discriminativa en la medida que sus puntos de corte tracen una curva ROC lo más lejana posible a la línea de no-discriminación. Como ya se ha indicado, los ejes del gráfico de curva ROC adoptan valores entre 0 y 1 (0% y 100%), delimitando un cuadrado de área=1,00. Por tanto, un test diagnóstico se considera no-discriminativo si su curva ROC coincide con la línea de no-discriminación, la cual posee un área=0,50.

En nuestro estudio, para cada una de las variables analizadas (las concentraciones de los distintos marcadores bioquímicos estudiados) se ha calculado el área bajo la curva ROC utilizando un método no paramétrico. El análisis de estas curvas se ha utilizado para evaluar la eficacia diagnóstica de cada marcador bioquímico o su capacidad para discriminar entre sumersión y otras causas de muerte y entre sumersión en agua salada o sumersión en agua dulce. Superponiendo las curvas correspondientes a las diferentes ecuaciones de regresión se pueden identificar los marcadores que tienen mayor sensibilidad y especificidad. Seleccionamos los marcadores con áreas bajo la curva mayores de 0,70.

3.4.5. Análisis discriminante

El análisis discriminante resulta útil para las situaciones en las que se desea construir un modelo predictivo para pronosticar el grupo de pertenencia de un caso a partir de las características observadas de cada caso. Así, ayuda a identificar las características que diferencian a dos o más grupos y a crear una función capaz de distinguir con la mayor precisión posible a los miembros de uno u otro grupo.

La pertenencia a los grupos, conocida de antemano, se utiliza como variable dependiente (una variable categórica con tantos valores discretos como grupos). Las variables en las que suponemos que se diferencian los grupos se utilizan como variables independientes (también llamadas variables discriminantes).

El objetivo último del análisis discriminante es encontrar la combinación lineal de las variables independientes que mejor permite diferenciar a los grupos. Una vez encontrada esta combinación (función discriminante), podrá ser utilizada para clasificar nuevos casos. Se trata de una técnica de análisis multivariante que es capaz de aprovechar las relaciones existentes entre una gran cantidad de variables independientes para maximizar la capacidad de discriminación.

Así, el análisis discriminante es conceptualmente muy similar al análisis de varianza multivariante de un factor. Su propósito es el mismo que el del análisis de regresión logística, pero a diferencia de él, sólo admite variables cuantitativas.

En nuestro estudio, realizamos el análisis discriminante con aquellos marcadores bioquímicos que mostraban las curvas ROC que mejor discriminaban entre los casos de sumersión y los casos de no sumersión y entre los casos de sumersión en agua salada o dulce y los casos de no sumersión, utilizando como variable dependiente el

grupo diagnóstico y como variables independientes las concentraciones de los distintos elementos traza.

4. RESULTADOS

4.1. Análisis descriptivo de la muestra y de las diferencias según sexo, edad e intervalo post-mortem

4.1.1. Sexo

De los 140 casos seleccionados para la realización de nuestra investigación, 121 fueron hombres (86,4%) y 19 mujeres (13,6%). Según el grupo diagnóstico y la causa de muerte se distribuyen de la siguiente manera (*Tabla 4, Figuras 19, 20 y 21*):

Grupos	Sexo	
	Hombre	Mujer
Sumersión	62	5
Sumersión en agua dulce	12	2
Sumersión en agua salada	50	3
Otras asfixias	41	3
Ahorcadura	31	2
Otras asfixias	10	1
Otras causas	18	11
Traumatismo múltiple	8	9
Arma de fuego	7	1
Enfermedad cardiovascular	3	1
TOTAL	121	19

Tabla 4. Distribución de los casos por grupo diagnóstico, causa de muerte y sexo.

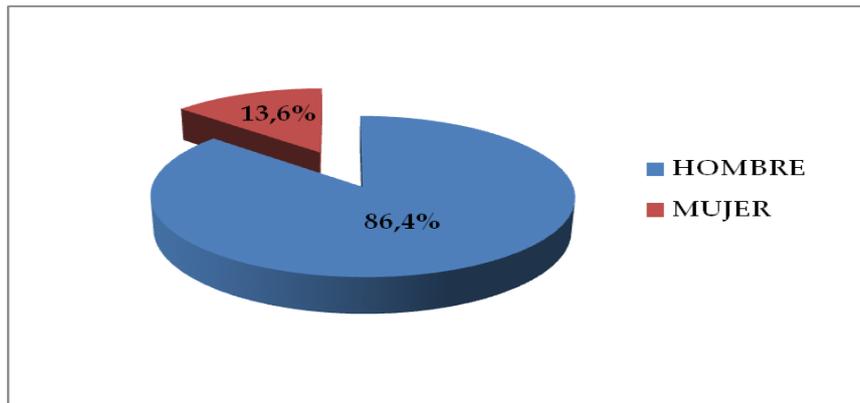


Figura 19. Distribución de los casos por sexo.

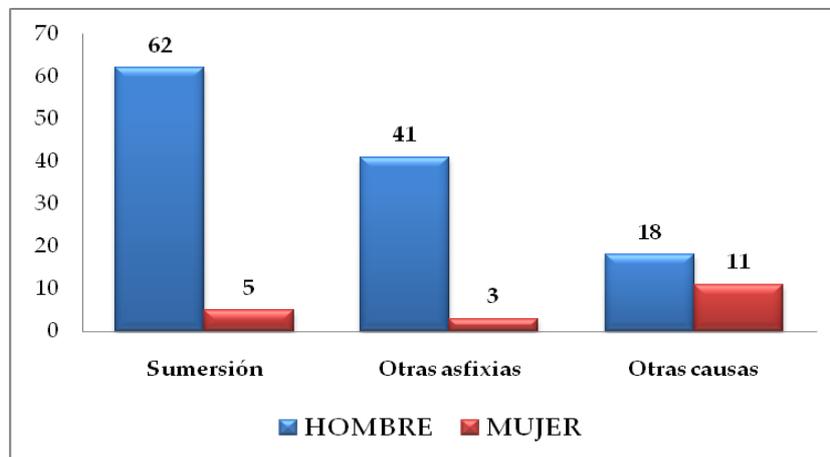


Figura 20. Distribución de los casos por grupo diagnóstico y sexo.

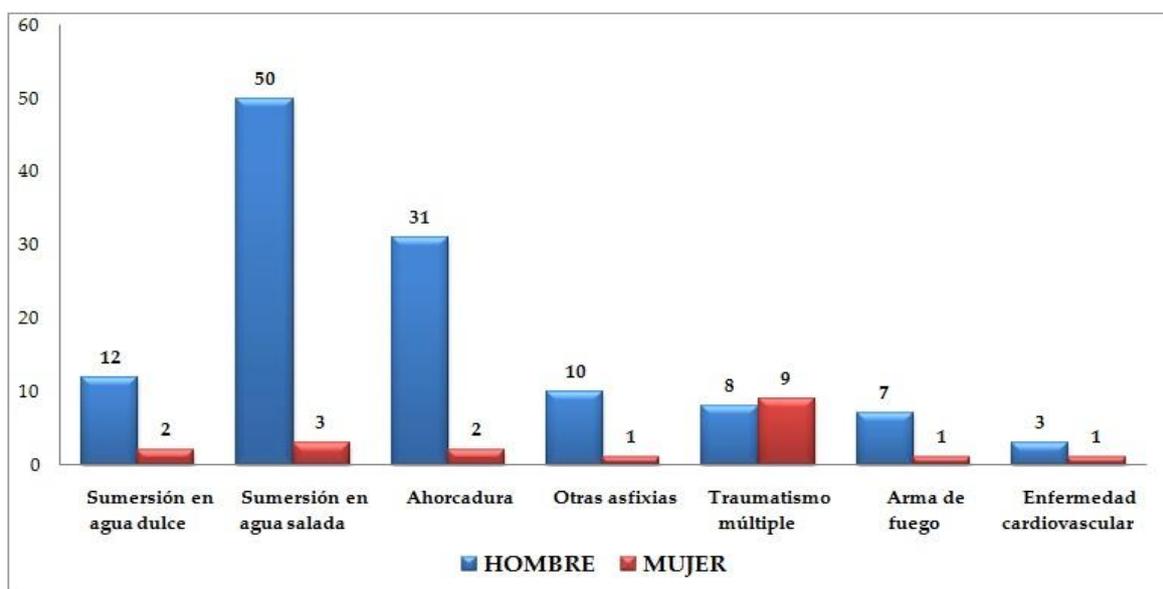


Figura 21. Distribución de los casos por causa de muerte y sexo.

4.1.2. Edad

La media de edad de los sujetos fue de 49,25 años (SD= 19,72; rango= 2-87 años). Según el grupo diagnóstico y la causa de muerte, los valores descriptivos de la edad se muestran en la *Tabla 5* y *Figuras 22, 23 y 24*.

Grupos	Edad (años)	
	Media	(SD; Rango)
Sumersión	50,2	(19,5;2-87)
Sumersión en agua dulce	45,9	(25,0;2-76)
Sumersión en agua salada	51,3	(18,1;23-87)
Otras asfixias	49,4	(20,0;9-86)
Ahorcadura	50,0	(20,9;9-86)
Otras asfixias	51,7	(18,6;22-80)
Otras causas	47,2	(20,0;7-78)
Traumatismo múltiple	53,1	(16,6;21-75)
Arma de fuego	34,5	(13,7;19-54)
Enfermedad cardiovascular	37,5	(29,5;7-78)
TOTAL	49,2	(19,7;2-87)

Tabla 5. Valores descriptivos de la edad distribuidos por grupo diagnóstico y causa de muerte.

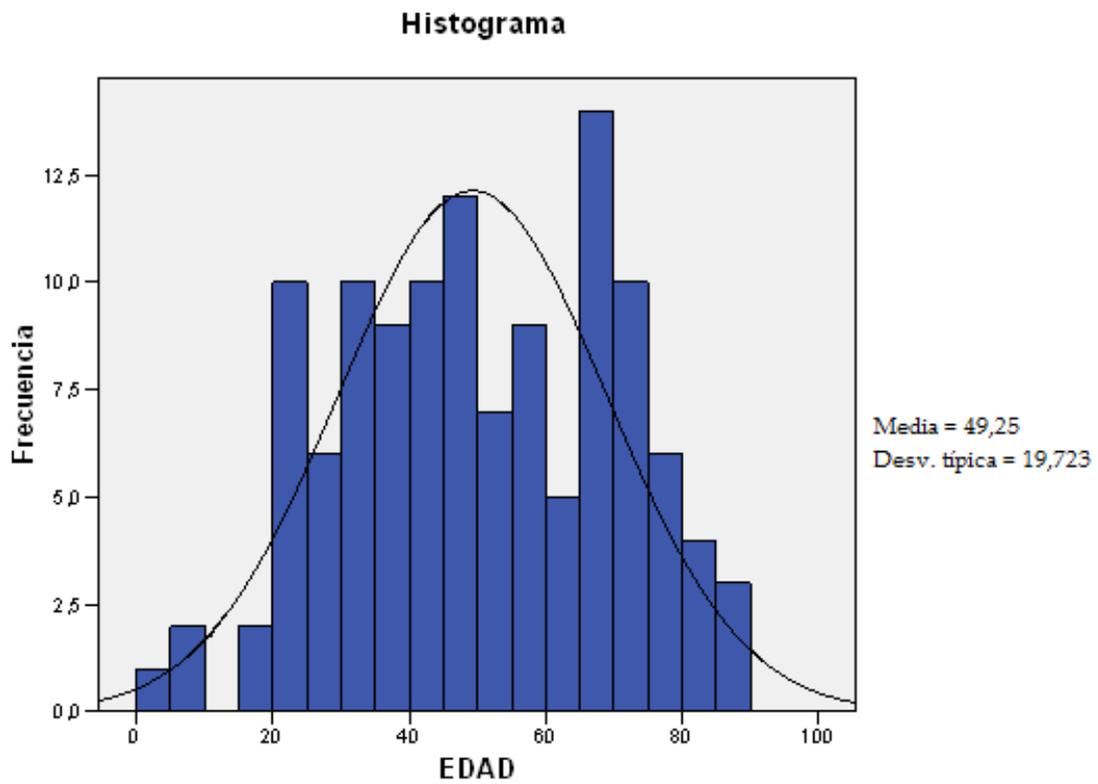


Figura 22. Histograma de la distribución de los casos por edad.

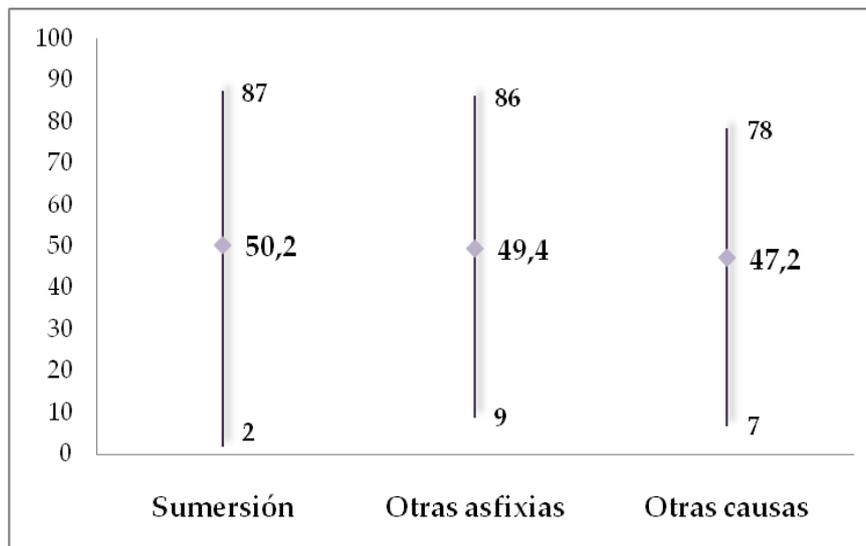


Figura 23. Valores descriptivos de la edad distribuidos por grupo diagnóstico.

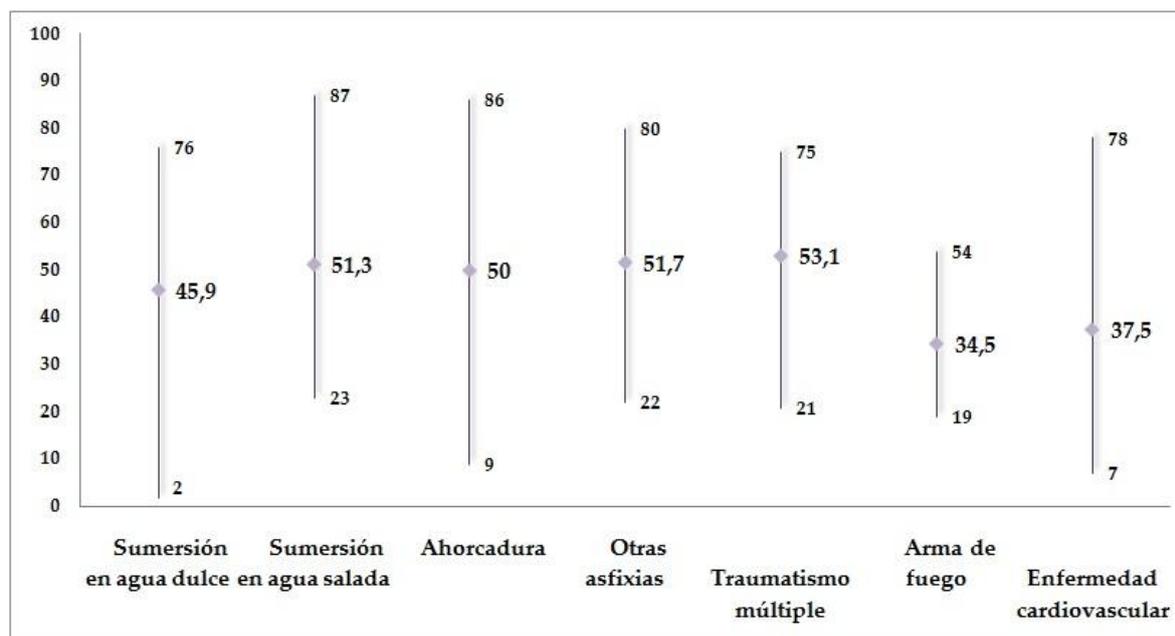


Figura 24. Valores descriptivos de la edad distribuidos por causa de muerte.

4.1.3. Intervalo post-mortem

La media del intervalo post-mortem fue de 30,4 h (SD= 37,84; rango= 3-216 h). Cabe destacar que el intervalo post-mortem fue superior a 72 h en tres casos de sumersión en agua salada, dos casos de sumersión en agua dulce, un caso de ahorcadura y uno en otras asfixias.

Los valores descriptivos del intervalo post-mortem distribuidos por grupo diagnóstico y causa de muerte se muestran en la *Tabla 6* y las *Figuras 25 y 26*.

Grupos	Intervalo post-mortem (horas)		
	Media (SD)	Mediana	Moda
Sumersión	35,1 (39,2)	20	24
Sumersión en agua dulce	35,3 (56,5)	17	17
Sumersión en agua salada	35,1 (34,0)	21	24
Otras asfixias	30,8 (46,2)	19	24
Ahorcadura	24,3 (35,7)	18	24
Otras asfixias	51,0 (66,2)	24	24
Otras causas	19,0 (5,8)	19	17
Traumatismo múltiple	20,2 (4,6)	21	17
Arma de fuego	15,5 (4,6)	16	10
Enfermedad cardiovascular	17,0 (11,1)	15	7
TOTAL	30,4 (37,8)	20	24

Tabla 6. Valores descriptivos del intervalo post-mortem distribuidos por grupo diagnóstico y causa de muerte.

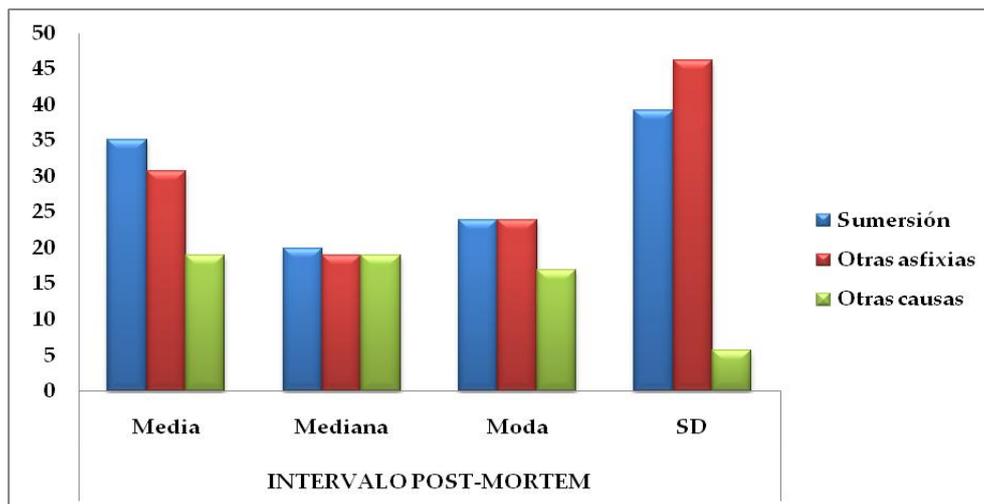


Figura 25. Valores descriptivos del intervalo post-mortem distribuidos por grupo diagnóstico.

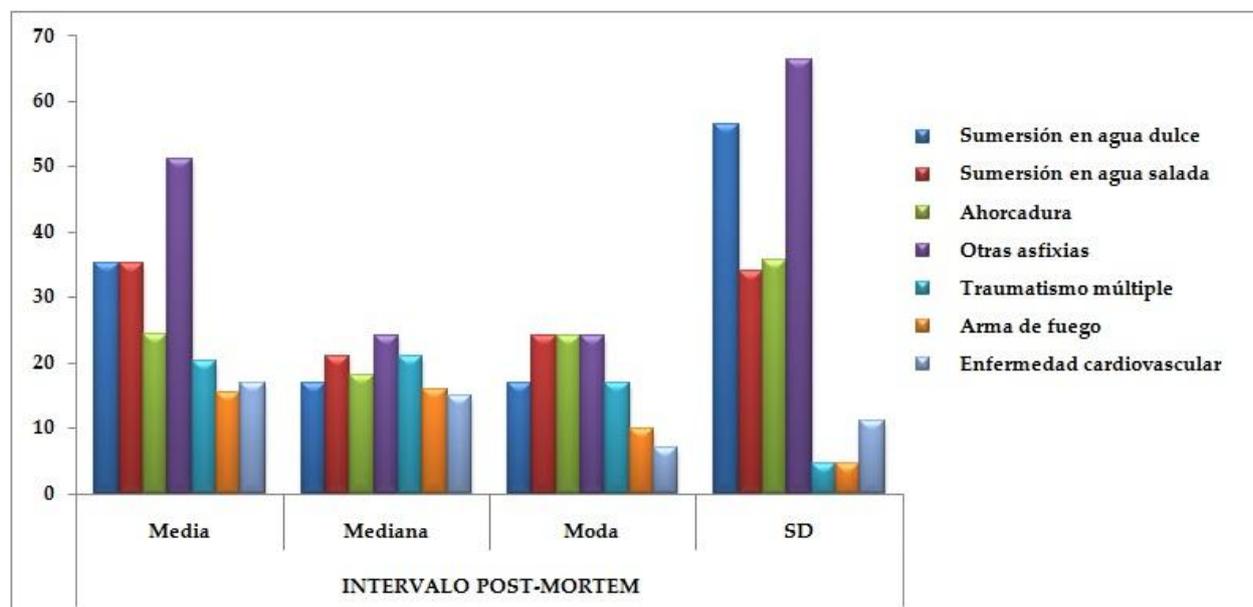


Figura 26. Valores descriptivos del intervalo post-mortem distribuidos por la causa de muerte.

Estudiamos la correlación entre la edad y el intervalo post-mortem con los tres grupos diagnósticos, pero no se encontraron diferencias estadísticamente significativas. Encontramos también que no existían correlaciones estadísticamente significativas entre los marcadores bioquímicos en suero y la edad, el sexo y el intervalo post-mortem.

4.2. Análisis de las diferencias en las concentraciones de los elementos traza entre los casos de muerte por sumersión, muerte por otras asfixias y otras causas de muerte

La *Tabla 7* muestra los valores obtenidos (media, desviación estándar y rango) de los distintos elementos traza y marcadores bioquímicos en sangre de ventrículo izquierdo (VI), ventrículo derecho (VD) y sangre periférica, y las diferencias entre los niveles de los ventrículos izquierdo y derecho (VI-VD) según el grupo diagnóstico.

	Sumersión (N=67)	Otras asfixias (N=44)	Otras causas (N=29)	<i>p</i> *
	Media±SD (Rango)	Media±SD (Rango)	Media±SD (Rango)	
Sr VI (µg/L)	670,90±1307(17,5-5260,5)	34,36±27,8 (10,5-160)	31,8±22,1 (6-107)	<0,0001
Sr VD (µg/L)	396,6±820,0 (9,5-3740)	28,6±24 (5,5-120)	24,5±14,8 (10-71)	<0,0001
Sr perif. (µg/L)	397,1±943,8 (16,5-4750)	30,1±21,1 (5,5-101)	30,2±14,8 (13-82)	<0,0001
Sr (VI-VD) (µg/L)	274,2±631,2 (-169-3427)	6,8±16,6 (-35,5-50)	8,1±12,4 (-11,5-45,5)	<0,0001
Mg VI (mg/dL)	9,6±7,0 (3,0-29,1)	4,8±2 (2,7-15,3)	4,6±0,9 (3,0-6,3)	<0,0001
Mg VD (mg/dL)	8,1±5,3 (3,2-15,9)	4,8±0,9 (2,7-7,1)	5,0±1,0 (2,8-6,9)	<0,0001
Mg perif. (mg/dL)	6,8±5,4 (0,4-27,5)	4,6±0,8 (3,1-7,5)	4,4±0,9 (2,2-6,2)	0,014
Mg (VI-VD) (mg/dL)	1,6±3,3 (-7,9-12,6)	-0,3±0,8 (-2,1-2,2)	-0,4±0,8 (-2,6-1,1)	<0,0001
Ca VI (mg/dL)	9,6±8,7 (0,1-14,2)	6,0±3,1 (1-13)	5,2±3,1 (0,2-10,7)	0,013
Ca VD (mg/dL)	7,6±4,0 (0,4-12,4)	4,8±2,6 (0,1-10,3)	4,2±2,5 (0,3-9,6)	<0,0001
Ca perif. (mg/dL)	8,1±5,2 (0,7-11,3)	6,6±3,3 (1,7-16,9)	7,0±3,2 (0,2-12,5)	NS
Ca (VI-VD) (mg/dL)	2,0±6,2 (-6,7-30,2)	1,2±3,4 (-5,8-7,8)	0,8±2,7 (-5,7-9)	NS
Na VI (mmol/L)	112,0±80,2 (34-176)	76,2±22,7 (34-112)	67,2±29,9 (25-140)	0,004
Na VD (mmol/L)	98,2±48,4 (35-134)	64,8±20,9 (32-112)	64,6±20,9 (39-129)	<0,0001
Na perif. (mmol/L)	95,8±59,9 (41-213)	70,8±23,2 (28-116)	79,2±32,1 (6-151)	NS
Na (VI-VD) (mmol/L)	15,9±45,6 (-60-170)	12,0±27,5 (-41-55)	1,5±25,0 (-52-78)	NS
Cl VI (mmol/L)	126,5±93,2 (50-180)	73,8±8,2 (52-94)	71,1±17,7 (26-111)	<0,0001
Cl VD (mmol/L)	111,7±71,7 (58-160)	69,1±9,1 (54-92)	70,8±10,7 (53-97)	<0,0001
Cl perif. (mmol/L)	103,5±74,3 (53-240)	70,6±10,5 (48-94)	70,4±21,1 (4-98)	0,001
Cl (VI-VD) (mmol/L)	17,4±49,7 (-113-240)	5,6±6,3 (-13-18)	0,0±18,1 (-56-39)	0,001
Fe VI (µg/dL)	690,7±465,9 (133-2425)	976±1241,4 (105-6756)	809,2±709,3 (5-3233)	NS

Fe VD (µg/dL)	941,1±790,2 (3,2-3425)	1210±131 (139-7166)	891±534,9(102-2211)	NS
Fe perif. (µg/dL)	818,2±746,0 (137-4725)	809,2±672,9 (96-3474)	498,8±414,4 (33-1757)	NS
Fe (VI-VD) (µg/dL)	-233,8±763 (-3133-1091)	-277,8±574 (-1412-1566)	-80±699 (-1103-2514)	NS
Urea VI (mg/dL)	81±121,1 (26-901)	111,1±166,4 (43-909)	65±34,6 (0,4-211)	NS
Urea VD (mg/dL)	107,4±197,2 (34-1195)	103±154,3 (39-945)	70,8±33,8 (15-203)	NS
Urea perif. (mg/dL)	99±194,4 (0,5-1375)	76,4±115,2 (0,7-700)	66,1±47,2 (6-268)	NS
Urea (VI-VD) (mg/dL)	-25,2±113,6 (-839-50)	-10,2±15,2 (-38-15)	-6,5±24,3 (-66-75)	NS
Cr VI (mg/dL)	5,5±28,5 (0,8-219)	1,5±0,5 (0,4-2,7)	1,4±0,5 (0,1-2,3)	NS
Cr VD (mg/dL)	2,1±1,9 (0,4-2,9)	1,9±0,6 (0,9-3,3)	1,7±0,6 (0,2-3)	NS
Cr perif. (mg/dL)	2,2±1,5 (1,0-6,1)	2,2±1,1 (0,7-7,3)	2,6±3,6 (1,0-19,3)	NS
Cr (VI-VD) (mg/dL)	3,5±29 (-7,8-216,7)	-0,4±0,5 (-1,6-0,6)	-0,3±0,5 (-1,3-1,1)	NS
cTn-T VI (ng/mL)	20,3±35,3 (0,01-113,4)	37,4±59,5 (0,01-228,6)	11,6±18,1 (0,01-55,7)	NS
cTn-T VD (ng/mL)	27,7±43,4 (0,01-8,7)	29,1±37,2 (0,01-126,7)	34,1±42,3 (0,1-162,2)	NS
cTn-T perif. (ng/mL)	3,9±20,6 (0,01-8,7)	0,4±0,9 (0,01-4,0)	15,7±59,2 (0,01-230)	NS
cTn-T (VI-VD) (ng/mL)	-0,0±22,9 (-70,2-52,8)	-2,7±48,9 (-109,2-113,9)	-4,8±21,9 (-46,2-32,6)	NS

Sr= Estroncio; Mg= Magnesio; Ca= Calcio; Na= Sodio; Cl= Cloro; Fe= Hierro; Cr=Creatinina; cTn-T= TroponinaT

VI= Ventrículo izquierdo; VD= Ventrículo derecho; Perif.= Sangre periférica

p= Probabilidad (*Test de Kruskal-Wallis); NS= No significativas

Tabla 7. Media, desviación estándar (SD) y rango de las concentraciones de los distintos elementos traza y las diferencias estadísticas entre los tres grupos diagnósticos.

Para evaluar la influencia de la causa de la muerte en los valores de los elementos traza y marcadores bioquímicos estudiados, aplicamos el *Test de Kruskal-Wallis*, análisis estadístico de comparación de medias para más de dos muestras independientes. En las *Figuras 27-31* se representan los valores medios de los elementos traza en las distintas localizaciones según el grupo diagnóstico entre los que existen diferencias significativas ($p < 0,05$).

En los casos de sumersión se obtuvieron valores medios de casi todos los elementos traza más elevados que en el resto de grupos diagnósticos, encontrando diferencias estadísticamente significativas en la mayoría de las localizaciones. Los valores medios de urea (excepto en sangre de VI) y creatinina (excepto en sangre periférica) fueron más altos en los casos de sumersión y las concentraciones de troponina T fueron más altas en los casos de muerte por otras asfixias u otras causas de muerte, aunque no se encontraron diferencias estadísticamente significativas para estos tres marcadores bioquímicos entre los tres grupos diagnósticos.

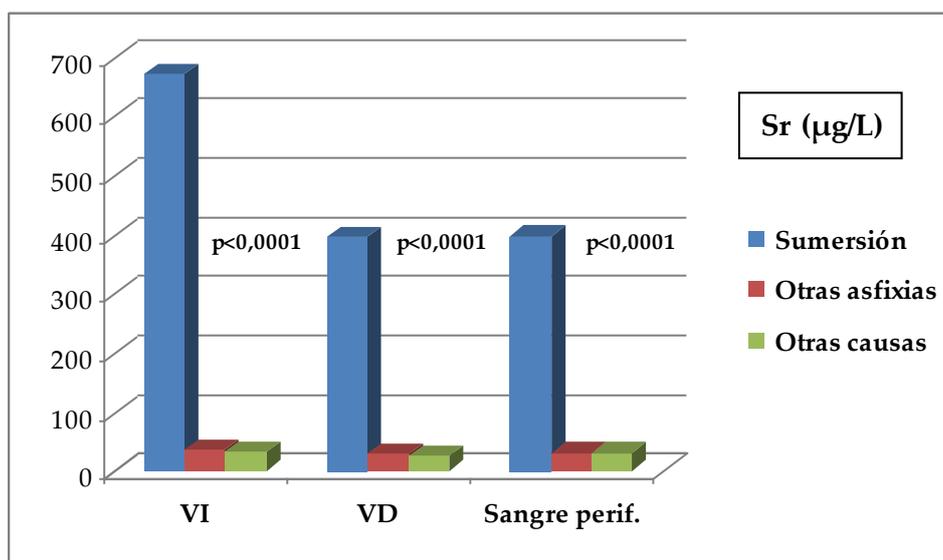


Figura 27. Valores medios de las concentraciones de Sr en sangre en las distintas localizaciones según el grupo diagnóstico entre los que existen diferencias estadísticamente significativas.

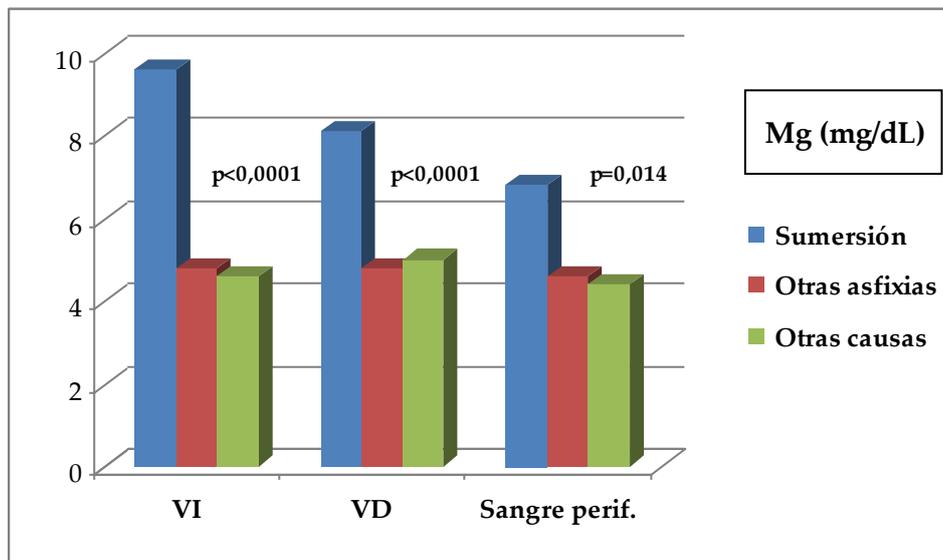


Figura 28. Valores medios de las concentraciones de Mg en suero en las distintas localizaciones según el grupo diagnóstico entre los que existen diferencias estadísticamente significativas.

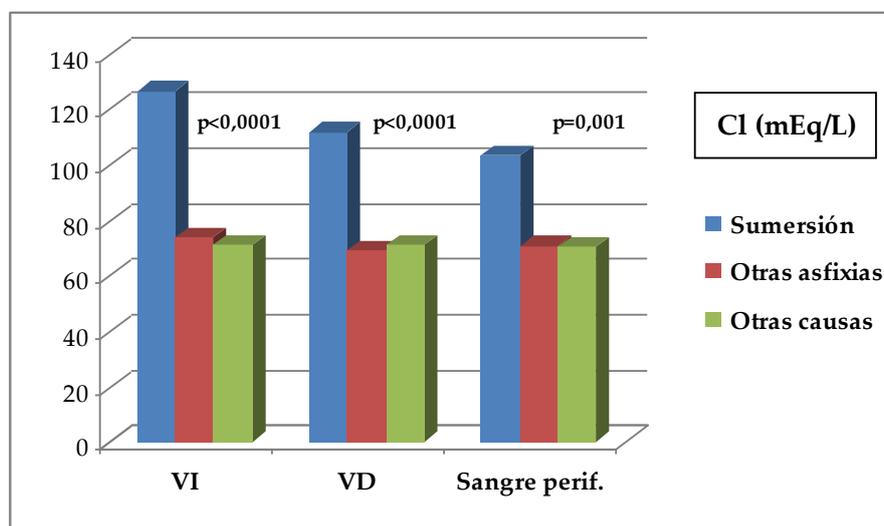


Figura 29. Valores medios de las concentraciones de Cl en suero en las distintas localizaciones según el grupo diagnóstico entre los que existen diferencias estadísticamente significativas.

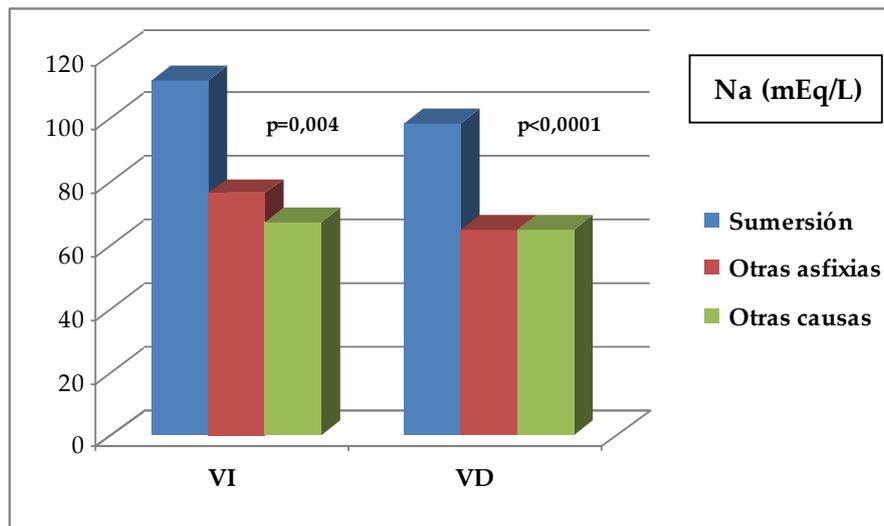


Figura 30. Valores medios de las concentraciones de Na en suero en las distintas localizaciones según el grupo diagnóstico entre los que existen diferencias estadísticamente significativas.

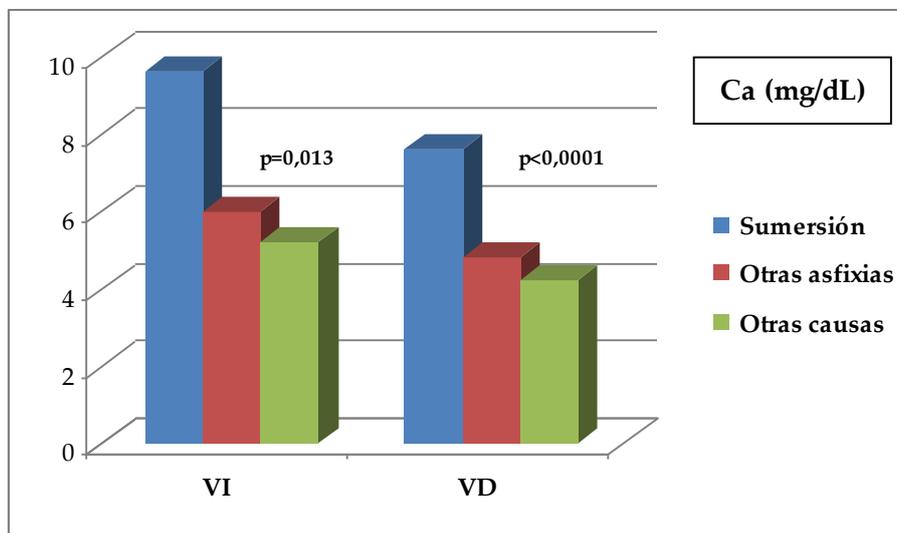


Figura 31. Valores medios de las concentraciones de Ca en suero en las distintas localizaciones según el grupo diagnóstico entre los que existen diferencias estadísticamente significativas.

4.3. Análisis de correlación entre los elementos traza en sangre y las concentraciones en el medio de sumersión y el tiempo estimado aproximadamente de permanencia del cadáver en el agua

Cuando analizamos todos los casos de sumersión de manera conjunta se observaron correlaciones estadísticamente significativas entre las concentraciones del estroncio, magnesio, sodio y cloro en el agua de sumersión y sus correspondientes concentraciones en ambos ventrículos y/o en sangre periférica. Además, encontramos correlaciones estadísticamente significativas entre el tiempo estimado de permanencia en el agua y las concentraciones de estroncio, magnesio y cloro en ambos ventrículos y en sangre periférica y para el sodio y el calcio, en el VI. Por otro lado, cuando se eliminaron los cinco casos de muerte por sumersión en los que el cadáver había permanecido en el agua más de 72 horas, se obtuvo una correlación no significativa entre estas variables.

Sin embargo, cuando los casos de sumersión en agua salada y los de sumersión en agua dulce se analizaron por separado, no se encontraron correlaciones estadísticamente significativas entre esos elementos traza y el tiempo estimado de permanencia en el agua (*Tabla 8*).

	Coeficiente de correlación (r)	p*
Sumersión		
Mg agua- Mg VI	0,434	0,009
Na agua -Na perif.	0,363	0,032
Cl agua - Cl perif.	0,338	0,047
Sr agua - Sr VI	0,635	<0,0001
Sr agua - Sr VD	0,573	<0,0001
Sr agua - Sr perif.	0,591	<0,0001
Tiempo en el agua - Sr VI	0,610	<0,0001
Tiempo en el agua - Sr VD	0,612	<0,0001
Tiempo en el agua - Sr perif.	0,580	<0,0001
Tiempo en el agua - Mg VI	0,389	<0,0001
Tiempo en el agua - Mg VD	0,246	0,013
Tiempo en el agua - Mg perif.	0,205	0,044
Tiempo en el agua - Ca VI	0,213	0,031
Tiempo en el agua - Na VI	0,314	0,001
Tiempo en el agua - Cl VI	0,451	<0,0001
Tiempo en el agua - Cl VD	0,438	<0,0001
Tiempo en el agua - Cl perif.	0,253	0,012
Sumersión en agua dulce		
Ca agua-Ca VI	0,900	0,037
Na agua-Na VI	0,886	0,039
Sumersión en agua salada		
Fe agua- Fe perif.	0,568	0,014
Sr agua- Sr VI	0,405	0,044
<p>Sr= Estroncio; Mg= Magnesio; Ca= Calcio; Na= Sodio; Cl= Cloro; Fe= Hierro</p> <p>VI= Ventrículo izquierdo; VD= Ventrículo derecho, Perif.= Sangre periférica</p> <p>p= Probabilidad (*Correlación de Spearman)</p>		

Tabla 8. Correlaciones entre las concentraciones de los elementos traza en agua y en sangre y entre las concentraciones de los elementos traza y el tiempo estimado de permanencia en el agua en los casos de sumersión.

Se observaron también correlaciones directas y estadísticamente significativas entre las concentraciones de estroncio en los tres diferentes tipos de localizaciones y las concentraciones séricas de magnesio, calcio, cloro y sodio en los casos de sumersión (*Tabla 9*).

	Sr VI	Sr VD	Sr perif.
	Coef. correlación	Coef. correlación	Coef. correlación
Sr VI	1	0,937**	0,933**
Sr VD	0,937**	1	0,918**
Sr perif.	0,933**	0,918**	1
Mg VI	0,696**	0,638**	0,738**
Mg VD	0,568**	0,583**	0,605**
Mg perif.	0,487**	0,491**	0,534**
Ca VI	0,643**	0,599**	0,668**
Ca VD	0,266*	0,269*	0,327*
Ca perif.	0,418**	0,384**	0,453**
Na VI	0,751**	0,705**	0,763**
Na VD	0,448**	0,452**	0,514**
Na perif.	0,559**	0,503**	0,598**
Cl VI	0,789**	0,752**	0,797**
Cl VD	0,666**	0,698**	0,722**
Cl perif.	0,617**	0,564**	0,632**
Fe VD	0,342**	0,355**	0,299*

Sr= Estroncio; Mg= Magnesio; Ca= Calcio; Na= Sodio; Cl= Cloro; Fe= Hierro
 VI= Ventrículo izquierdo; VD= Ventrículo derecho, Perif.= Sangre periférica
 Correlación de Spearman: * p<0,05; **p<0,01

Tabla 9. Correlaciones estadísticamente significativas entre las concentraciones de estroncio en sangre y otros elementos traza en los casos de sumersión.

Para llevar a cabo estos análisis estadísticos se utilizó la *Correlación de Spearman*, test no paramétrico para calcular la correlación entre las distintas variables.

4.4. Análisis de las diferencias en las concentraciones de los elementos traza entre las muertes por sumersión en agua salada y las de sumersión en agua dulce

Se observaron valores más altos para el estroncio, magnesio, cloro y sodio en los casos de sumersión en agua salada y se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas en las tres localizaciones sanguíneas comparándolos con los valores de estos marcadores en los casos de sumersión en agua dulce (*Tabla 10*). En el caso del calcio, encontramos los valores más altos y con diferencias estadísticamente significativas en VI en los casos de sumersión en agua salada respecto a los de sumersión en agua dulce y en el caso de la urea y creatinina obtenemos las concentraciones más elevadas y significativamente diferentes en los casos de sumersión en agua salada solamente en VD.

En las *Figuras 32-36* se representan los valores medios de los elementos traza en las distintas localizaciones según el tipo de sumersión entre los que existen diferencias significativas ($p < 0,05$).

	Sumersión en agua salada (N=53) Media±SD (Rango)	Sumersión en agua dulce (N=14) Media±SD (Rango)	<i>p</i> *
Sr VI (µg/L)	834,6±1432 (17,5-5260)	66,1±42,5 (20-146)	<0,0001
Sr VD (µg/L)	486,4±905 (15-3740)	65±55,3 (9,5-185)	<0,0001
Sr perif. (µg/L)	492,3±1045 (21-4750)	44,6±32 (16,5-131)	<0,0001
Sr (VI-VD) (µg/L)	362,6±706 (-169-3427)	1,1±25,7 (-69-25,5)	0,001
Mg VI (mg/dL)	11,1±7,1 (3,2-29,1)	4,0±0,5 (3-5,1)	<0,0001
Mg VD (mg/dL)	9,0±5,5 (3,7-23,9)	4,5±1,0 (3,2-7,1)	<0,0001
Mg perif. (mg/dL)	7,7±5,9 (2,8-27,5)	3,8±1,1 (0,4-5)	<0,0001
Mg (VI-VD) (mg/dL)	2,4±3,1 (-1,2-12,6)	-0,5±0,9 (-2,9-0,6)	<0,0001
Ca VI (mg/dL)	10,7±9,3 (0,8-47,9)	5,3±3,2 (0,1-10,4)	0,026
Na VI (mmol/L)	121,1±81,6 (42-413)	60,9±25,5 (34-107)	0,001
Na VD (mmol/L)	74±16,7 (41-107)	60,9±25,5(34-93)	0,024
Na perif. (mmol/L)	102,4±66,7 (41-337)	66,3±17 (37-95)	0,006
Cl VI (mmol/L)	141,6±102 (73-545)	70,3±10,6 (50-87)	<0,0001
Cl VD (mmol/L)	114±61,1 (62-316)	69±7,2 (58-81)	<0,0001
Cl perif. (mmol/L)	112,7±83,4 (53-422)	69,6±6 (56-79)	<0,0001
Urea VD (mg/dL)	107,5±189 (34-1195)	61,6±30,4 (39-149)	0,021
Cr VD (mg/dL)	1,8±0,5 (0,4-2,9)	1,4±0,4 (0,9-2,3)	0,018

Sr= Estroncio; Mg= Magnesio; Ca= Calcio; Na= Sodio; Cl= Cloro; Cr=Creatinina
 VI= Ventrículo izquierdo; VD= Ventrículo derecho, Perif.= Sangre periférica
p= Probabilidad (*Test de Mann-Whitney)

Tabla 10. Media, desviación estándar (SD) y rango de los valores de los elementos traza y otros marcadores bioquímicos en suero mostrando las diferencias estadísticamente significativas entre los casos de sumersión en agua salada y los casos de sumersión en agua dulce.

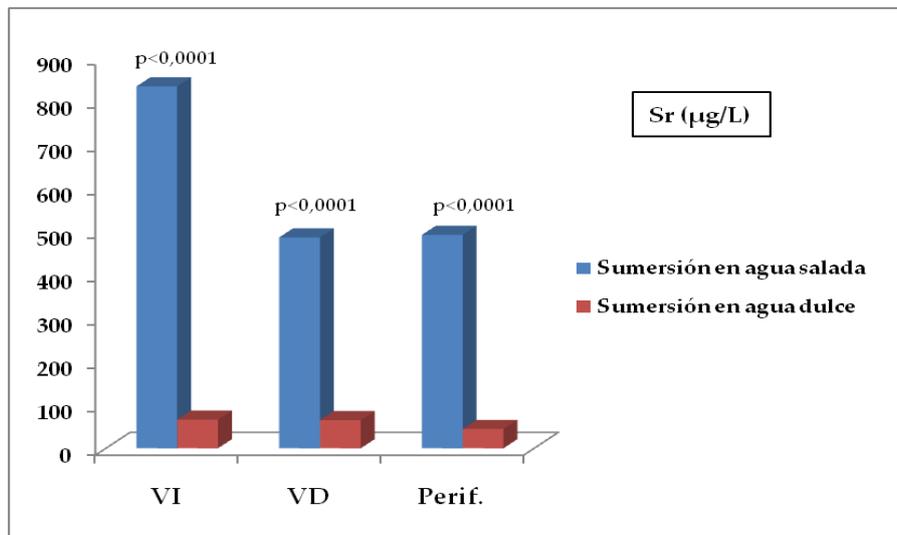


Figura 32. Valores medios de las concentraciones de Sr en sangre en las distintas localizaciones según el tipo de sumersión entre los que existen diferencias estadísticamente significativas.

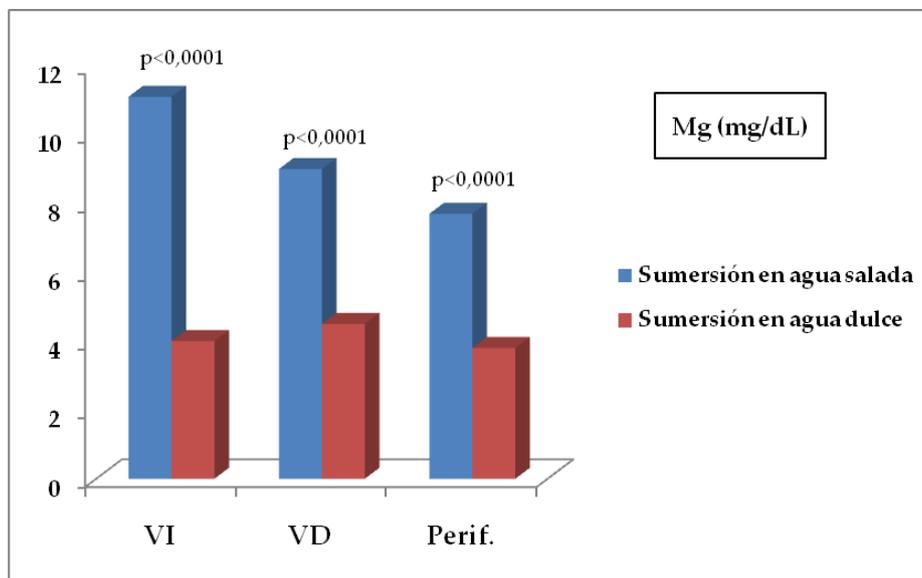


Figura 33. Valores medios de las concentraciones de Mg en suero en las distintas localizaciones según el tipo de sumersión entre los que existen diferencias estadísticamente significativas.

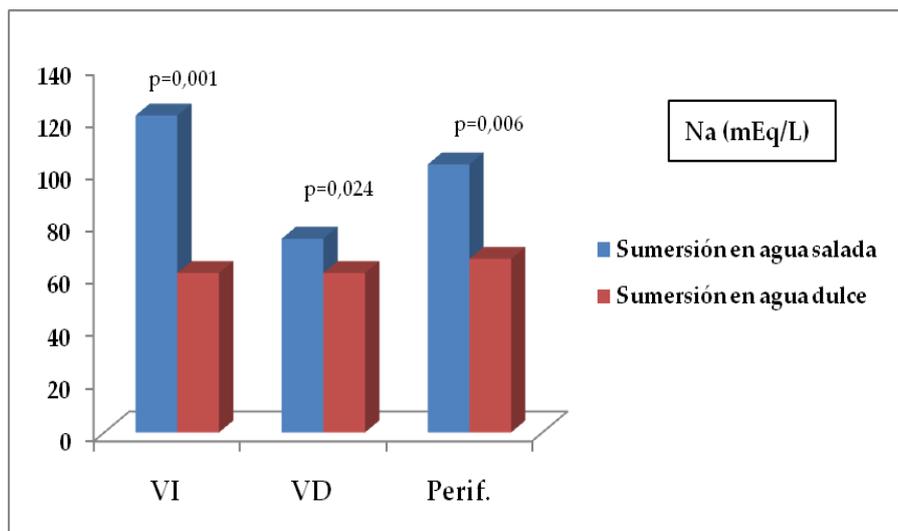


Figura 34. Valores medios de las concentraciones de Na en suero en las distintas localizaciones según el tipo de sumersión entre los que existen diferencias estadísticamente significativas.

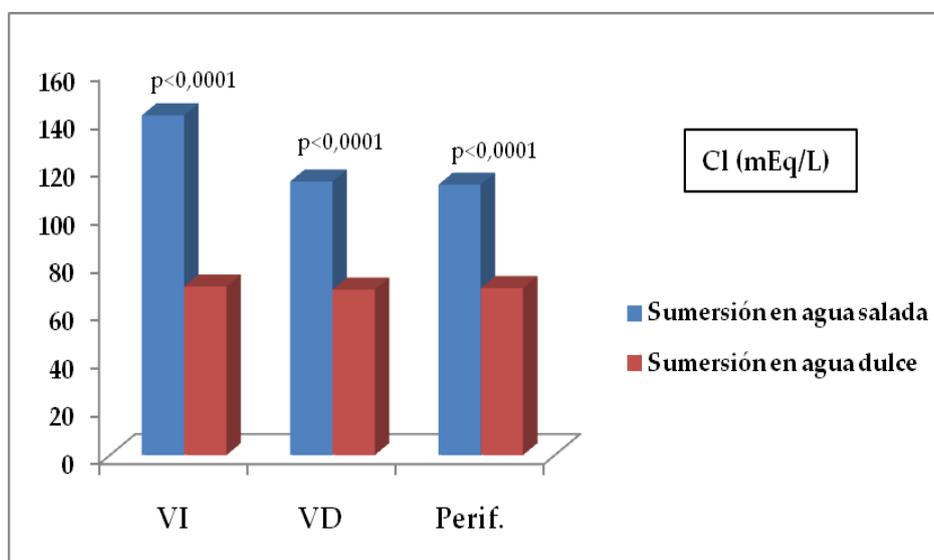


Figura 35. Valores medios de las concentraciones de Cl en suero en las distintas localizaciones según el tipo de sumersión entre los que existen diferencias estadísticamente significativas.

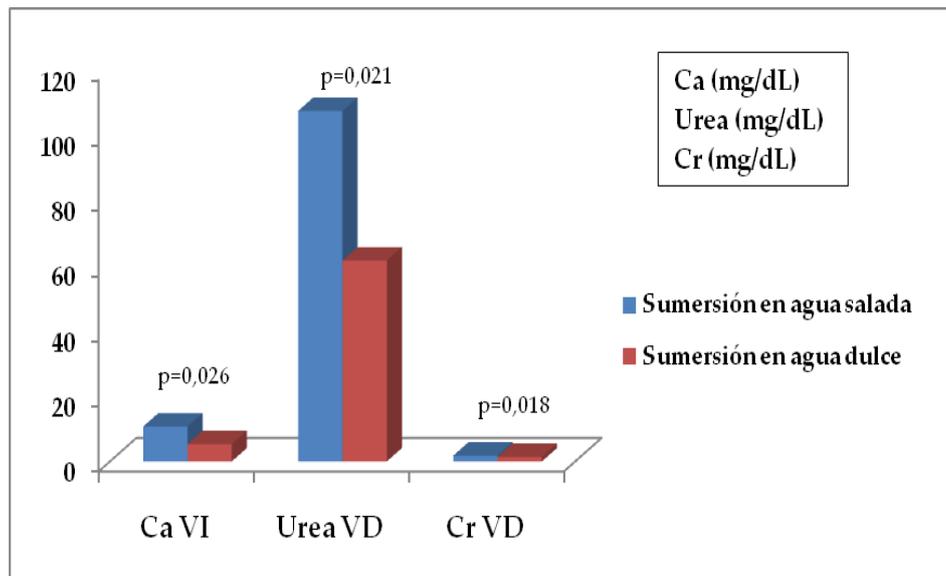


Figura 36. Valores medios de las concentraciones de Ca, Urea y Creatinina en suero en las distintas localizaciones según el tipo de sumersión entre los que existen diferencias estadísticamente significativas.

Para evaluar la influencia del tipo de sumersión en los valores de los elementos traza y marcadores bioquímicos estudiados, aplicamos el *Test de Mann-Whitney*, test no paramétrico, para la comparación de medias de dos muestras independientes.

Las **Figuras 37-39** muestran los diagramas de cajas (media, desviación estándar y rango) de las concentraciones de los distintos marcadores bioquímicos entre VI y VD en los casos de sumersión en agua salada y en agua dulce entre los que existen diferencias estadísticamente significativas.

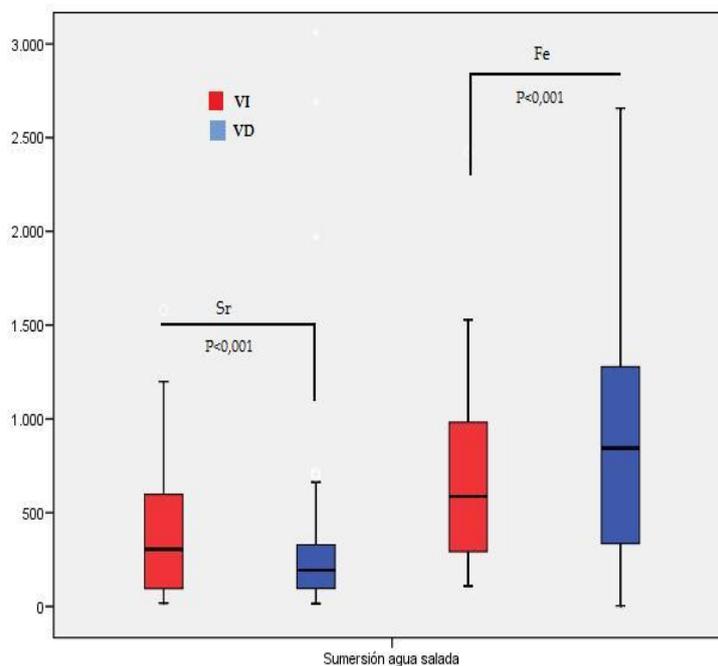


Figura 37. Diagramas de cajas de las concentraciones de Sr y Fe entre VI y VD que mostraron diferencias estadísticamente significativas en los casos de sumersión en agua salada.

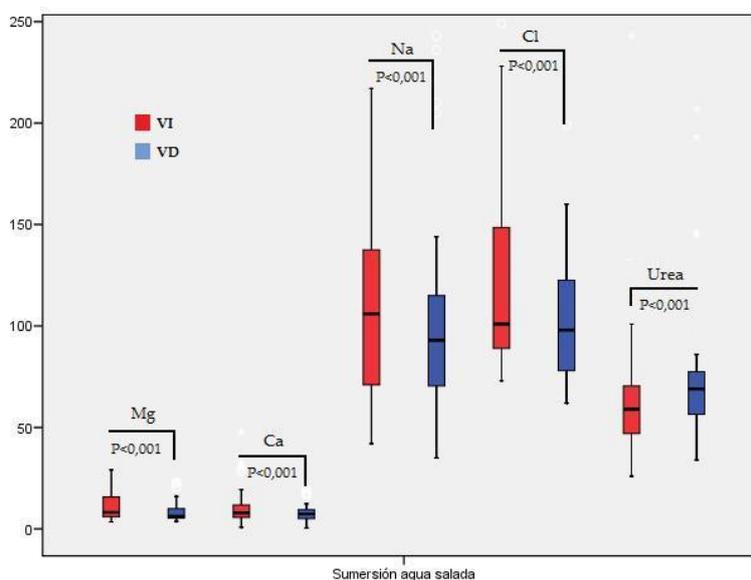


Figura 38. Diagramas de cajas de las concentraciones de Mg, Ca, Na, Cl y Urea entre VI y VD que mostraron diferencias estadísticamente significativas en los casos de sumersión en agua salada.

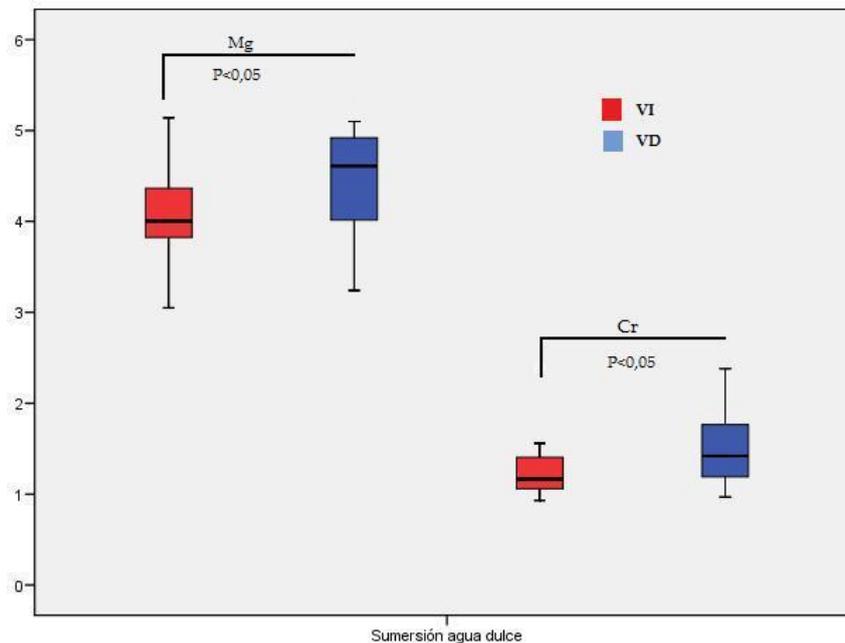


Figura 39. Diagramas de cajas de las concentraciones de Mg y Creatinina entre VI y VD que mostraron diferencias estadísticamente significativas en los casos de sumersión en agua dulce.

En cuanto al tiempo estimado de permanencia en el agua, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los casos de sumersión en agua salada y los de agua dulce, y en cuanto a las concentraciones de los elementos traza en las aguas de sumersión, a excepción del hierro, encontramos valores significativamente más elevados en los casos de sumersión en agua salada que en los de agua dulce (*Tabla 11*).

En la *Figura 40* se representan los valores medios de los elementos traza en las aguas de sumersión entre los que existen diferencias significativas ($p < 0,05$).

	Sumersión en agua salada (N=53)	Sumersión en agua dulce (N=14)	<i>p</i> *
Tiempo en el agua			
Media ± SD (horas)	28,19±63,0	26,2±58,2	NS
Rango	0-420	0-216	
Sr en agua de sumersión			
Media ± SD (µg/L)	5754,2±1931,2	1809,6±1131	<0,0001
Rango	2700-10200	500-3750	
Mg en agua de sumersión			
Media ± SD (mg/dL)	99,1±27,4	2,6±3,7	<0,0001
Rango	45-179,7	0,1-11,7	
Ca en agua de sumersión			
Media ± SD (mg/dL)	30,1±9,4	11,4±11,2	<0,0001
Rango	12-64,4	0,3-30,7	
Na en agua de sumersión			
Media ± SD (mmol/L)	457,53±101,2	10,8±17,6	<0,0001
Rango	181-850	0-53	
Cl en agua de sumersión			
Media ± SD (mmol/L)	474,5±113,5	14,3±16,1	<0,0001
Rango	206-930	0-51	
Fe en agua de sumersión			
Media ± SD (µg/dL)	5,6±19,4	57,6±162,18	NS
Rango	0-99	0-459	
<p>Sr= Estroncio; Mg= Magnesio; Ca= Calcio; Na= Sodio; Cl= Cloro; Fe= Hierro</p> <p><i>p</i>= Probabilidad (*Test de Mann-Whitney); NS= Diferencias no significativas</p>			

Tabla 11. Media, desviación estándar (SD), rango y diferencias entre los casos de sumersión en agua salada y en agua dulce en función del tiempo de permanencia en el agua y de las concentraciones de los elementos traza en el medio de sumersión.

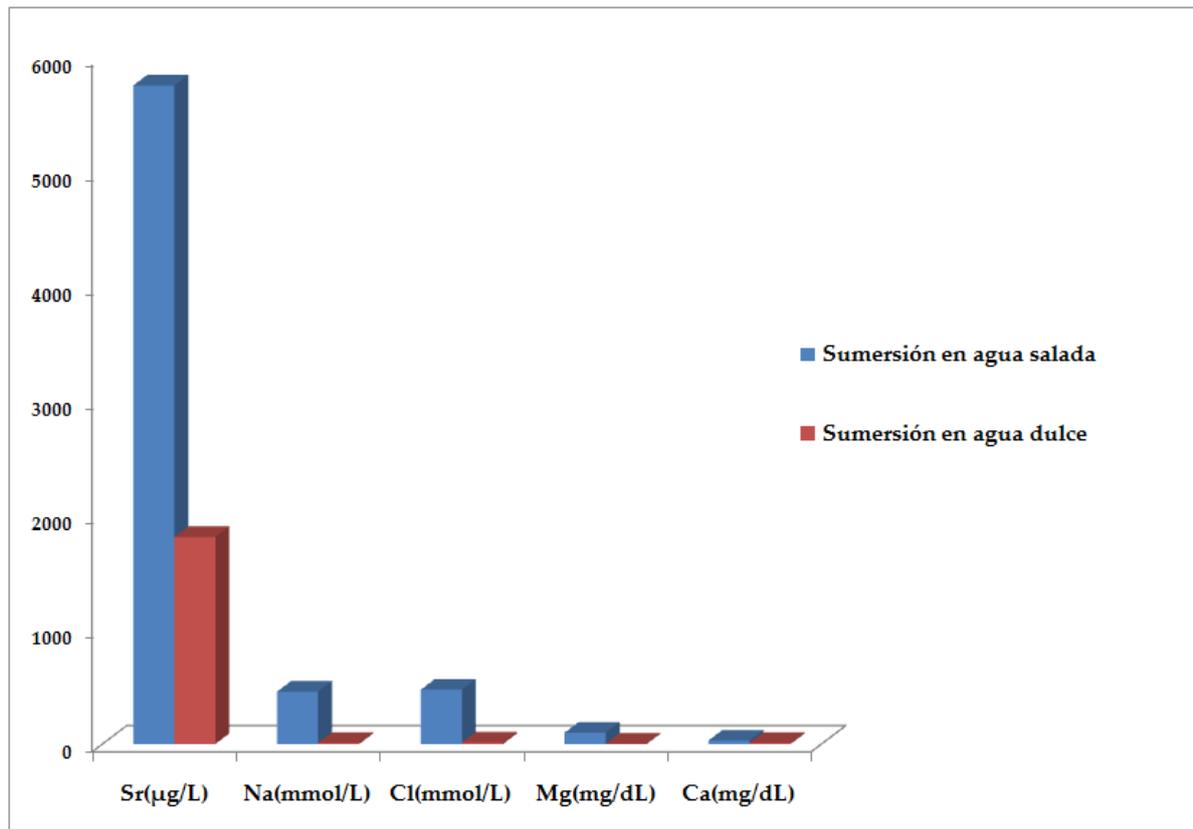


Figura 40. Valores medios de las concentraciones de los elementos traza en las aguas de sumersión entre los que existen diferencias estadísticamente significativas.

4.5. Análisis de las diferencias en las concentraciones de los elementos traza entre los casos de muerte por sumersión y otras causas de muerte

En las *Tabla 12* se recogen las concentraciones de los distintos marcadores bioquímicos (media, desviación estándar y rango) mostrando las diferencias estadísticamente significativas entre los casos de sumersión y otras causas de muerte. Encontramos que los valores de los elementos traza fueron más altos en los casos de sumersión que en las otras causas de muerte, observando diferencias estadísticamente significativas en todas las localizaciones para los niveles de Sr, Mg y Cl y para el Ca y el Na, sólo en VI y en VD, respectivamente.

	Sumersión	No sumersión	<i>p</i> *
	(N=67)	(N=73)	
	Media±SD (Rango)	Media±SD (Rango)	
Sr VI (µg/l)	670,90±1307(17,5-5260.5)	33,3±25,4 (6-160)	<0,0001
Sr VD (µg/l)	396,6±820,0 (9,5-3740)	26,9±20,6 (5,5-120)	<0,0001
Sr perif. (µg/l)	397,1±943,8 (16,5-4750)	30,2±18,6 (5,5-101)	<0,0001
Sr VI-VD (µg/l)	98,9±139,4 (0,5-552)	10,8±12,2 (0-50)	<0,0001
Mg VI (mg/dl)	9,6±7,0 (3,0-29,1)	4,7±1,6 (2,7-15,3)	<0,0001
Mg VD (mg/dl)	8,1±5,3 (3,2-15,9)	4,9±0,9 (2,7-7,1)	0,004
Mg perif. (mg/dl)	6,8±5,4 (0,4-27,5)	4,5±0,8 (2,2-7,5)	0,025
Mg VI-VD (mg/dl)	1,7±2,0 (0,04-7,9)	0,7±0,5 (0,02-2,6)	0,017
Ca VI (mg/dl)	9,6±8,7 (0,1-14,2)	5,6±3,1 (0,2-13)	0,004
Na VD (mEq/l)	98,2±48,4 (35-134)	64,7±20,7 (32-129)	<0,0001
Cl VI (mEq/l)	126,5±93,2 (50-180)	72,7±13,1 (26-111)	<0,0001
Cl VD (mEq/l)	111,7±71,7 (58-160)	69,9±9,8 (53-97)	<0,0001
Cl perif. (mEq/l)	103,5±74,3 (53-240)	70,5±15,8 (4-98)	0,008
Cl VI-VD (mEq/l)	14,0±14,5 (0-78)	8±9,6 (0-56)	0,006

Sr= Estroncio; Mg= Magnesio; Ca= Calcio; Na= Sodio; Cl= Cloro

VI= Ventrículo izquierdo; VD= Ventrículo derecho, Perif.= Sangre periférica

p= Probabilidad (*Test de Mann-Whitney)

Tabla 12. Media, desviación estándar (SD) y rango de las concentraciones de los elementos traza en suero mostrando las diferencias estadísticamente significativas entre los casos de sumersión y otras causas de muerte.

En las **Figuras 41-44** se representan los valores medios de los elementos traza en las distintas localizaciones según los casos de sumersión y otras causas de muerte entre los que existen diferencias significativas ($p < 0,05$).

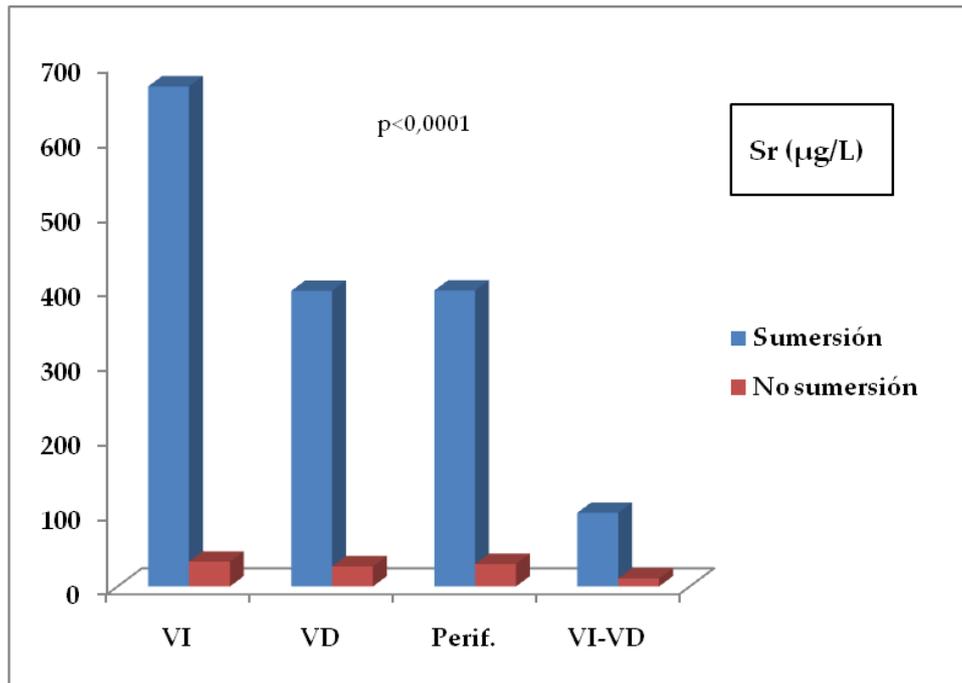


Figura 41. Valores medios de las concentraciones de Sr en sangre en las distintas localizaciones según los casos de sumersión y otras causas de muerte entre los que existen diferencias estadísticamente significativas.

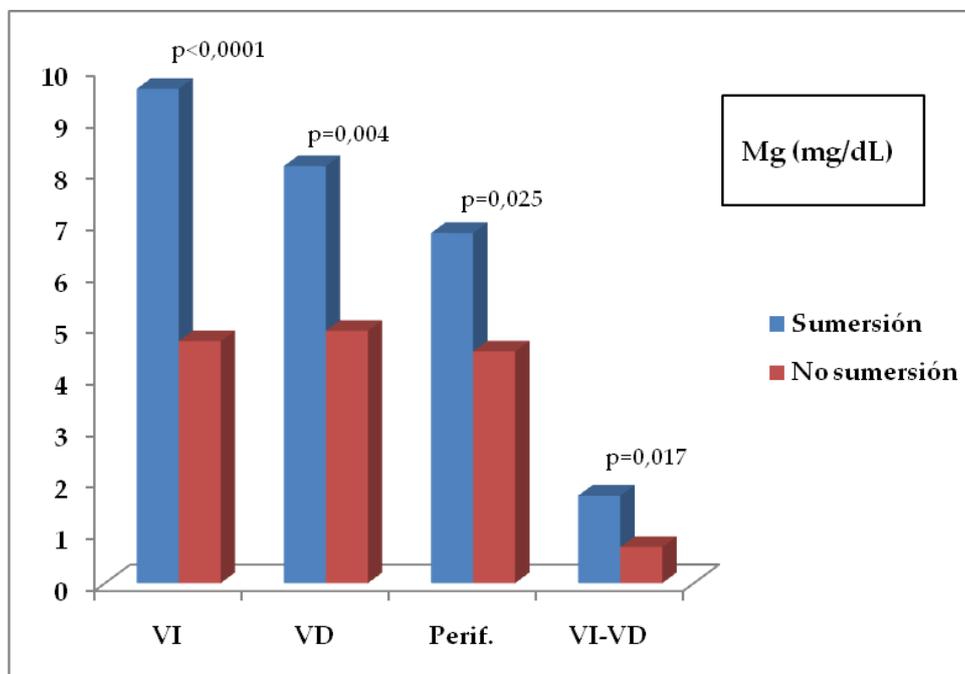


Figura 42. Valores medios de las concentraciones de Mg en suero en las distintas localizaciones según los casos de sumersión y otras causas de muerte entre los que existen diferencias estadísticamente significativas.

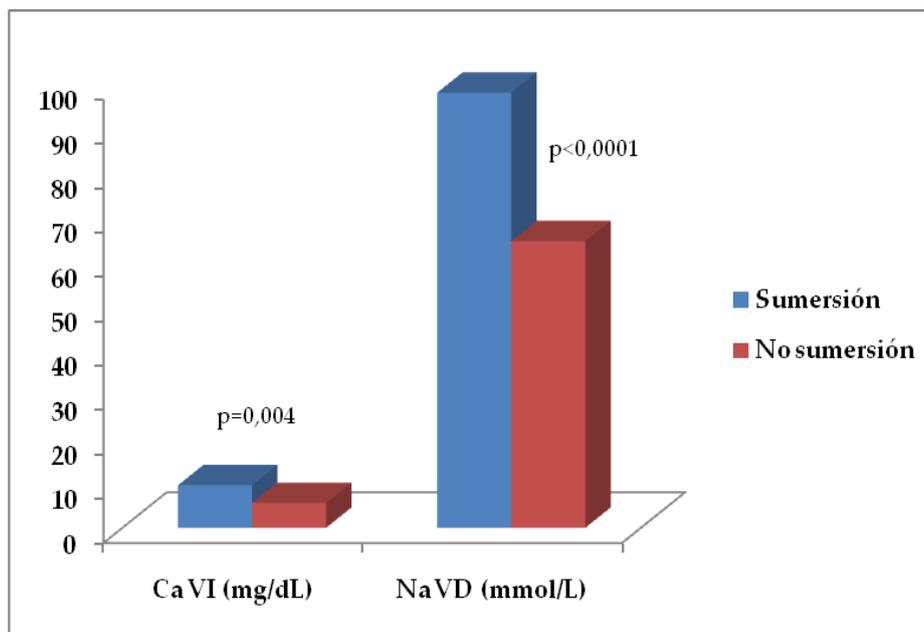


Figura 43. Valores medios de las concentraciones de Ca y Na en suero en las distintas localizaciones según los casos de sumersión y otras causas de muerte entre los que existen diferencias estadísticamente significativas.

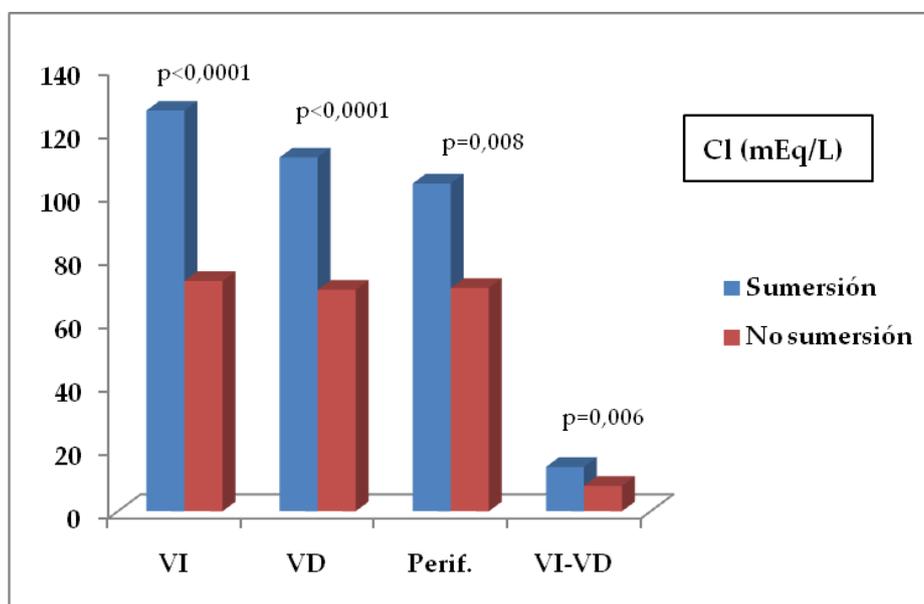


Figura 44. Valores medios de las concentraciones de Cl en suero en las distintas localizaciones según los casos de sumersión y otras causas de muerte entre los que existen diferencias estadísticamente significativas.

Las *Figuras 45-48* muestran los diagramas de cajas (media, desviación estándar y rango) obtenidos para los distintos marcadores en sangre periférica, VD, VI y las diferencias entre los niveles de ambos ventrículos, observando diferencias estadísticamente significativas al comparar los casos de sumersión con las otras causas de muerte. Para llevar a cabo este análisis estadístico aplicamos el *Test de Mann-Whitney*, test no paramétrico para la comparación de medias de dos muestras independientes.

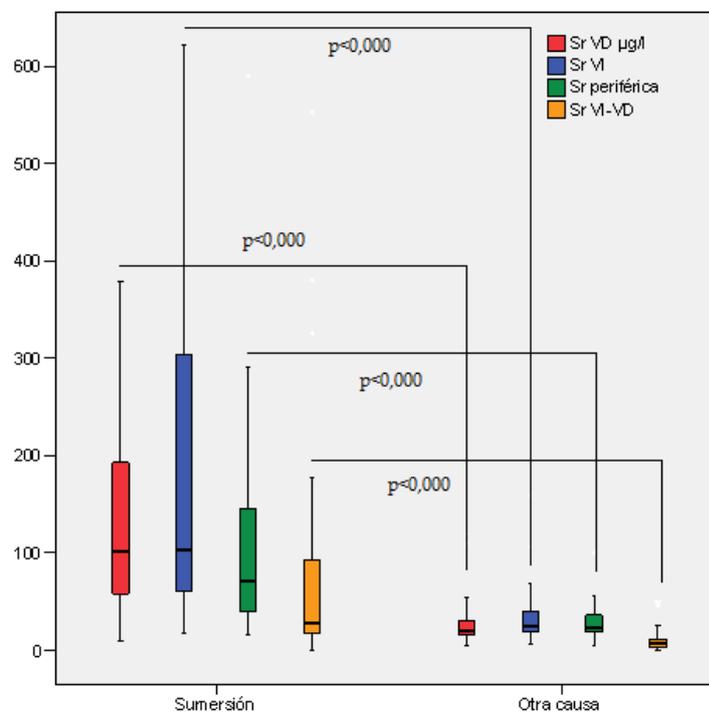


Figura 45. Diagrama de cajas de las concentraciones de Sr en sangre (VD, VI, periférica y VI-VD) y diferencias estadísticamente significativas entre los casos de sumersión y otras causas de muerte.

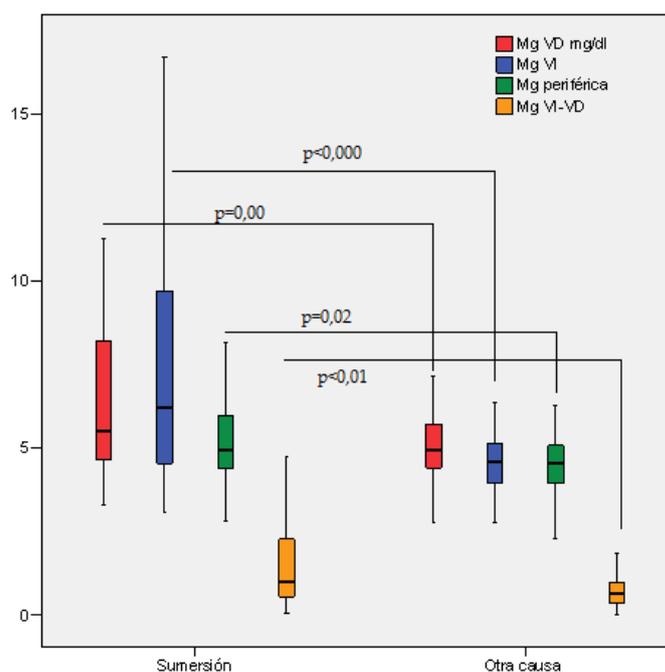


Figura 46. Diagrama de cajas de las concentraciones de Mg en suero (VD, VI, periférica y VI-VD) y diferencias estadísticamente significativas entre los casos de sumersión y otras causas de muerte.

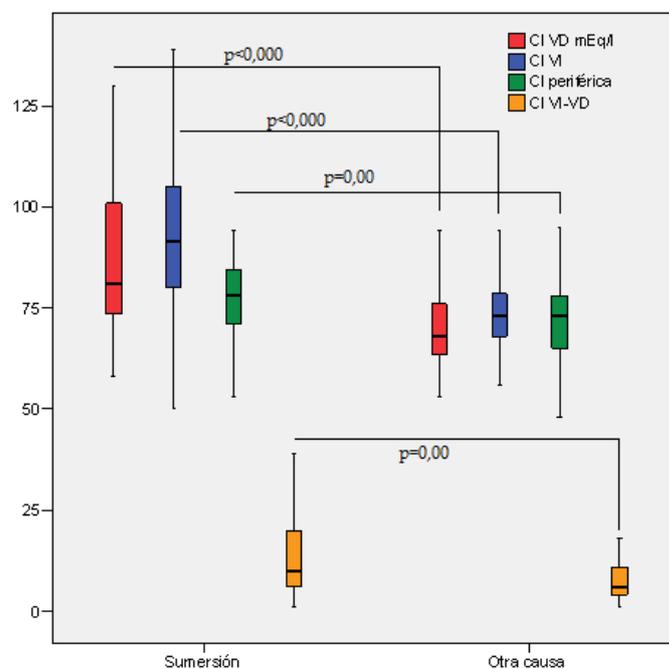


Figura 47. Diagrama de cajas de las concentraciones de Cl en suero (VD, VI, periférica y VI-VD) y diferencias estadísticamente significativas entre los casos de sumersión y otras causas de muerte.

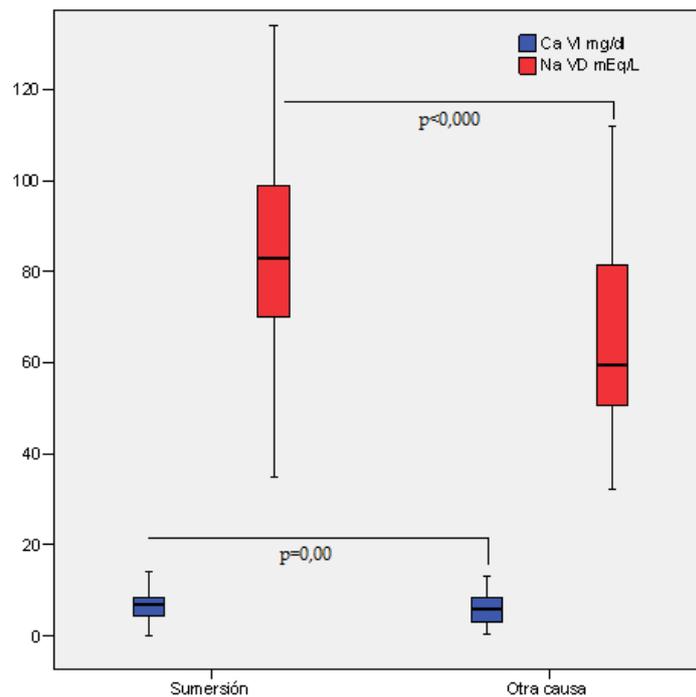


Figura 48. Diagrama de cajas de las concentraciones de Ca y Na en suero (VI y VD, respectivamente) y diferencias estadísticamente significativas entre los casos de sumersión y otras causas de muerte.

Estudiamos las curvas ROC expresadas como las concentraciones de todos los marcadores bioquímicos en ambos ventrículos y en sangre periférica, prestando especial atención al área que representa el diagnóstico correcto entre dos individuos fallecidos, uno por sumersión y otro por otras causas, y seleccionando los marcadores bioquímicos con áreas bajo la curva mayores de 0,70. También determinamos los puntos de corte en las curvas y la especificidad y sensibilidad bajo la curva (*Tabla 13*). La *Figura 49* muestra la curva ROC de los elementos traza con áreas mayores de 0,70 en los casos de sumersión.

Variable	Área	Error estándar	p	Límite inferior	Límite superior	Punto de corte	Especif. del punto de corte	Sensib. del punto de corte
Sr VI	0,874	0,041	<0,0001	0,795	0,954	46,75	87,2	88,7
Sr VD	0,865	0,045	<0,0001	0,776	0,954	44,25	89,4	81
Sr perif.	0,837	0,045	<0,0001	0,748	0,926	38,7	83,7	82,1
Sr (VI-VD)	0,837	0,046	<0,0001	0,748	0,926	11,25	74,5	83,3
Mg VI	0,769	0,056	<0,0001	0,660	0,879	5,13	73,5	75
Cl VI	0,816	0,052	<0,0001	0,713	0,918	79,5	73,5	80,4
Cl VD	0,773	0,053	<0,0001	0,669	0,876	72,5	67,3	75

Sr= Estroncio; Mg= Magnesio; Cl= Cloro
 VI= Ventrículo izquierdo; VD= Ventrículo derecho, Perif.= Sangre periférica
 p = Probabilidad

Tabla 13. Áreas bajo la curva ROC, error estándar y límites inferior y superior del área. Puntos de corte establecidos de acuerdo con el uso de la curva ROC en los casos de sumersión.

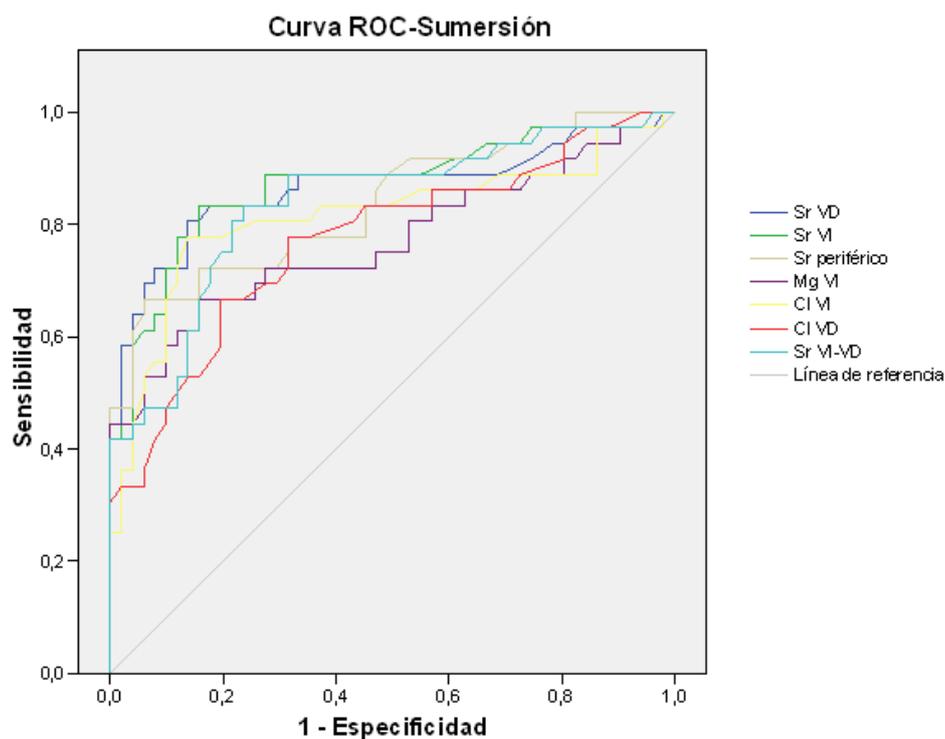


Figura 49. Curva ROC de los elementos traza en los casos de sumersión.

También realizamos un análisis discriminante con aquellos marcadores bioquímicos que mostraban las curvas que mejor discriminaban entre los casos de sumersión y los casos de no sumersión. Utilizamos como variable dependiente el grupo diagnóstico, estableciendo dos grupos: por un lado las muertes por sumersión (67 casos) y por otro las muertes por no sumersión (73 casos) y como variables independientes las concentraciones de los elementos traza. En la *Tabla 14* se muestran los porcentajes correctos de clasificación utilizando los elementos traza de manera individual y conjunta.

	Sumersión (% clasificación correcta)	No sumersión (% clasificación correcta)	Total (% clasificación correcta)
Sr (VI, VD, perif., VI-VD)	67,2	97	82,8
Cl (VI, VD); Mg (VI)	44,8	98,4	72,7
Sr (VI, VD, perif., VI-VD) Cl (VI, VD) Mg (VI)	64,9	96	81
Sr= Estroncio; Mg= Magnesio; Cl= Cloro VI= Ventrículo izquierdo; VD= Ventrículo derecho, Perif.= Sangre periférica			

Tabla 14. Análisis discriminante usando los elementos traza en sumersión.

4.6. Análisis de las diferencias en las concentraciones de los elementos traza entre los casos de sumersión en agua salada o de sumersión en agua dulce y otras causas de muerte

En las *Tablas 15 y 16* se recogen las concentraciones de los distintos marcadores bioquímicos (media, desviación estándar y rango) mostrando las diferencias estadísticamente significativas entre los casos de sumersión en agua salada o dulce y

otras causas de muerte. En los casos de sumersión en agua salada, las concentraciones de los elementos traza fueron significativamente más elevadas que en los casos de no-sumersión. En las muertes distintas a la sumersión, las concentraciones de magnesio en VI y sangre periférica y de urea y creatinina en VD fueron más elevadas que en las muertes por sumersión en agua dulce.

	Sumersión en agua salada	No sumersión	<i>p</i> *
	(N=53)	(N=73)	
	Media±SD (Rango)	Media±SD (Rango)	
Sr VI (µg/l)	834,6±1432 (17,5-5260)	33,3±25,4 (6-160)	<0,0001
Sr VD (µg/l)	486,4±905 (15-3740)	26,9±20,6 (5,5-120)	<0,0001
Sr perif. (µg/l)	492,3±1045 (21-4750)	32,6±23,1 (5,5-131,5)	<0,0001
Sr VI-VD (µg/l)	362,6±706 (-169-3427)	7,3±14,9 (-35,5-50)	<0,0001
Mg VI (mg/dl)	11,1±7,1 (3,2-29,1)	4,7±1,6 (2,7-15,3)	<0,0001
Mg VD (mg/dl)	9,0±5,5 (3,7-23,9)	4,9±0,9 (2,7-7,1)	<0,0001
Mg perif. (mg/dl)	7,7±5,9 (2,8-27,5)	4,7±1,3 (2,2-12,7)	<0,0001
Mg VI-VD (mg/dl)	2,4±3,1 (-1,2-12,6)	0,7±0,5 (0,02-2,6)	<0,0001
Ca VI (mg/dl)	10,7±9,3 (0,8-47,9)	5,7±3,1 (0,2-13)	0,001
Ca VD (mg/dl)	7,9±4,3 (0,4-19,4)	4,6±2,6 (0,1-10,8)	<0,0001
Na VI (mEq/l)	121,1±81,6 (42-413)	72,4±26 (25-140)	<0,0001
Na VD (mEq/l)	74±16,7 (41-107)	66,1±21,9 (32-129)	0,02
Na perif. (mEq/l)	102,4±66,7 (41-337)	75,1±27 (6-151)	<0,0001
Cl VI (mEq/l)	141,6±102 (73-545)	73,1±13,5 (26-111)	<0,0001
Cl VD (mEq/l)	114±61,1 (62-316)	71±12,3 (53-130)	<0,0001
Cl perif. (mEq/l)	112,7±83,4 (53-422)	71,3±16,3 (4-107)	<0,0001
Cl VI-VD (mEq/l)	21,4±56,1 (-113-240)	3,6±12,9 (-56-39)	0,013

Sr= Estroncio; Mg= Magnesio; Ca= Calcio; Na= Sodio; Cl= Cloro

VI= Ventrículo izquierdo; VD= Ventrículo derecho, Perif.= Sangre periférica

p= Probabilidad (*Test de Mann-Whitney)

Tabla 15. Media, desviación estándar (SD) y rango de las concentraciones de los elementos traza y otros marcadores bioquímicos en suero mostrando las diferencias estadísticamente significativas entre los casos de sumersión en agua salada y otras causas de muerte.

	Sumersión en agua dulce	No sumersión	<i>p</i> *
	(N=14)	(N=73)	
	Media±SD (Rango)	Media±SD (Rango)	
Sr VI (µg/l)	66,1±42,5 (20-146)	33,3±25,4 (6-160)	0,009
Sr VD (µg/l)	65±55,3 (9,5-185)	26,9±20,6 (5,5-120)	0,005
Mg VI (mg/dl)	4,0±0,5 (3-5,1)	4,7±1,6 (2,7-15,3)	0,043
Mg perif. (mg/dl)	3,8±1,1 (0,4-5)	4,5±0,8 (2,2-7,5)	0,037
Ca VD (mg/dl)	6,7±2,18 (3,3-10,1)	4,5±2,6 (0,1-10,3)	0,016
Urea VD (mg/dl)	61,6±30,4 (39-149)	87,9±115 (15-945)	0,016
Cr VD (mg/dl)	1,4±0,4 (0,9-2,3)	1,8±0,6 (0,2-3,3)	0,022
Fe VI-VD (mEq/l)	130,3±601,7 (-1148-1091)	-190,4±633,8 (-1412-2514)	0,035

Sr= Estroncio; Mg= Magnesio; Ca= Calcio; Cr=Creatinina; Fe= Hierro

VI= Ventrículo izquierdo; VD= Ventrículo derecho, Perif.= Sangre periférica

p= Probabilidad (*Test de Mann-Whitney)

Tabla 16. Media, desviación estándar (SD) y rango de las concentraciones de los elementos traza y otros marcadores bioquímicos en suero mostrando las diferencias estadísticamente significativas entre los casos de sumersión en agua dulce y otras causas de muerte.

En las **Figuras 50-55** se representan los valores medios de los elementos traza en las distintas localizaciones según los casos de sumersión en agua salada o dulce y otras causas de muerte entre los que existen diferencias significativas ($p < 0,05$).

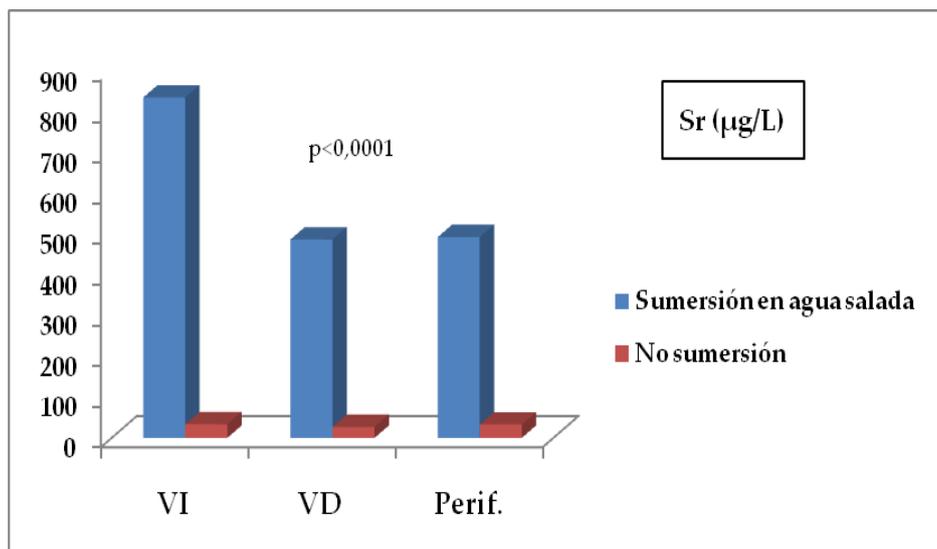


Figura 50. Valores medios de las concentraciones de Sr en sangre en las distintas localizaciones según los casos de sumersión en agua salada y otras causas de muerte entre los que existen diferencias estadísticamente significativas.

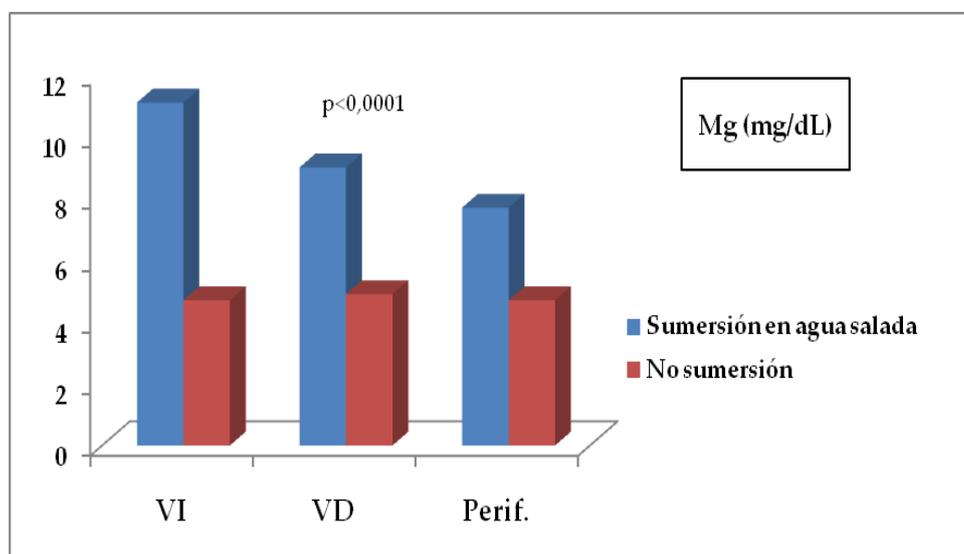


Figura 51. Valores medios de las concentraciones de Mg en suero en las distintas localizaciones según los casos de sumersión en agua salada y otras causas de muerte entre los que existen diferencias estadísticamente significativas.

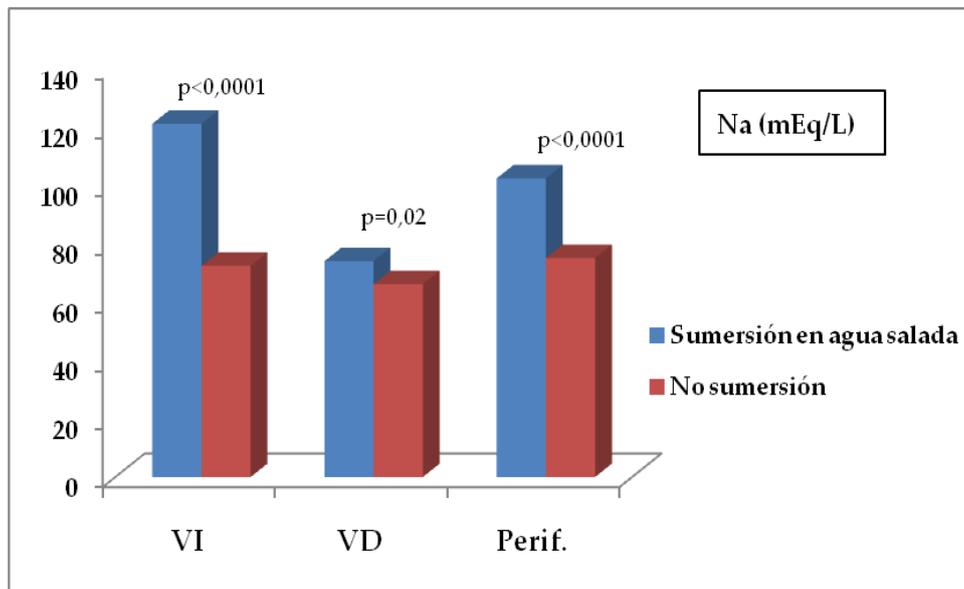


Figura 52. Valores medios de las concentraciones de Na en suero en las distintas localizaciones según los casos de sumersión en agua salada y otras causas de muerte entre los que existen diferencias estadísticamente significativas.

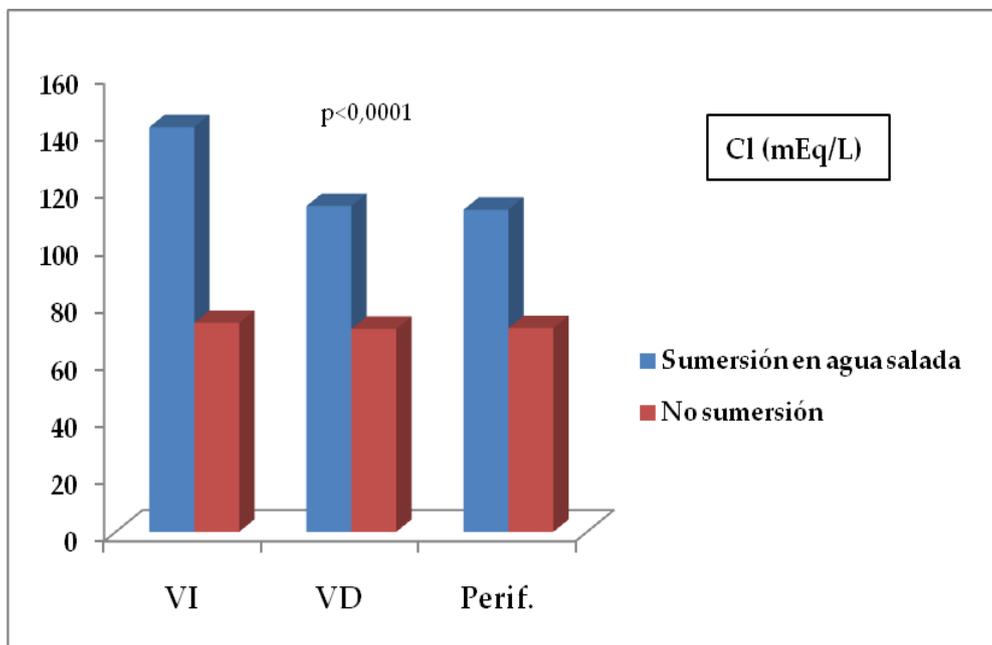


Figura 53. Valores medios de las concentraciones de Cl en suero en las distintas localizaciones según los casos de sumersión en agua salada y otras causas de muerte entre los que existen diferencias estadísticamente significativas.

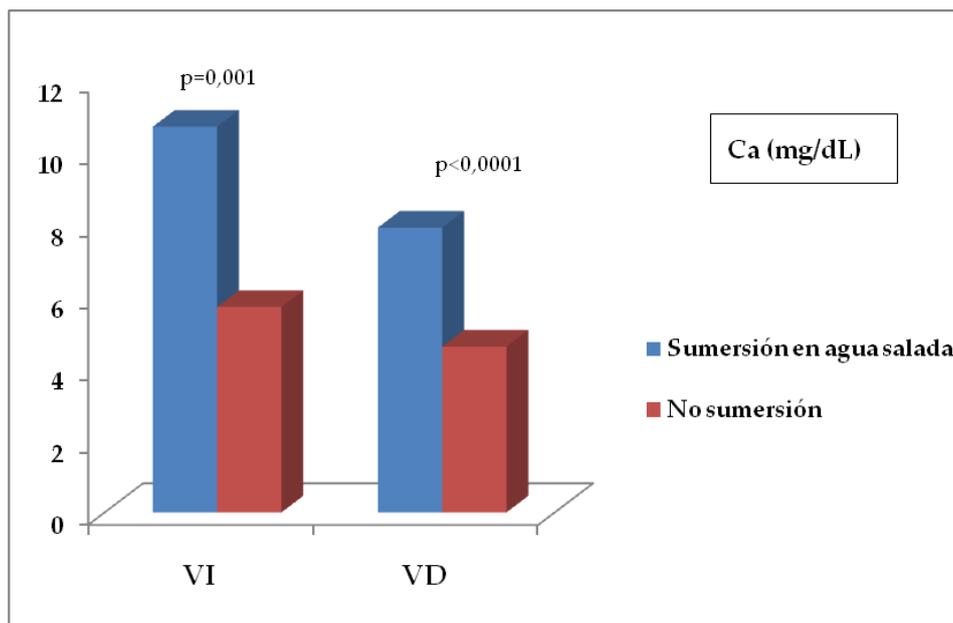


Figura 54. Valores medios de las concentraciones de Ca en suero en las distintas localizaciones según los casos de sumersión en agua salada y otras causas de muerte entre los que existen diferencias estadísticamente significativas.

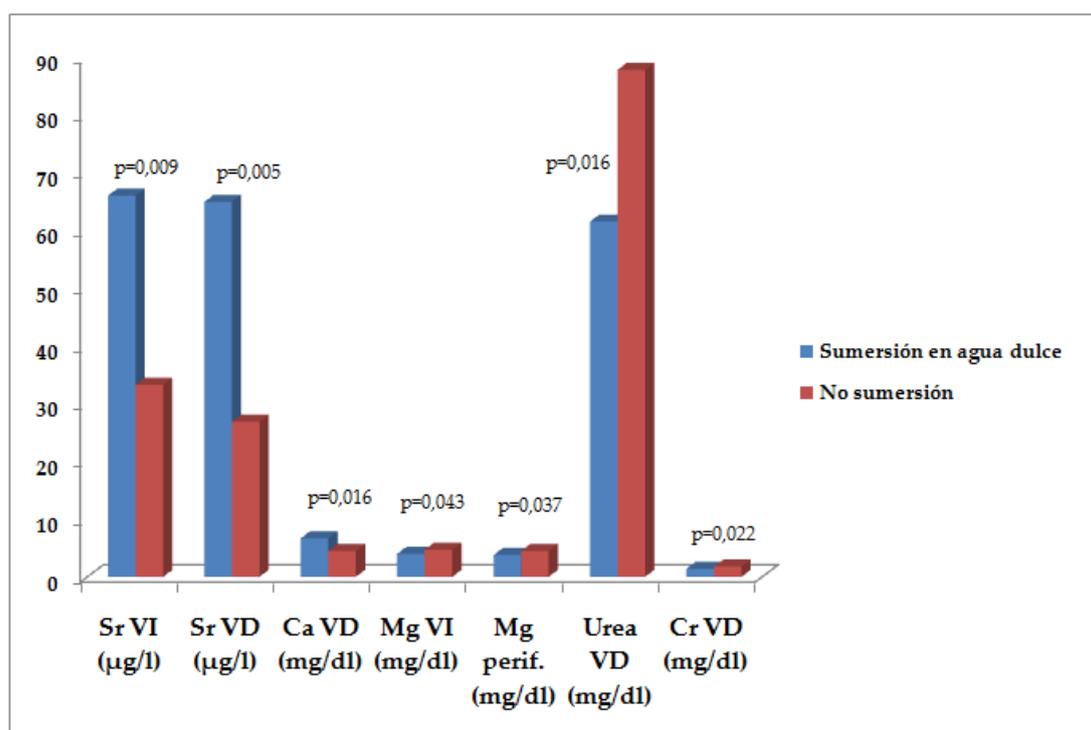


Figura 55. Valores medios de las concentraciones de los distintos elementos traza en las distintas localizaciones según los casos de sumersión en agua dulce y otras causas de muerte entre los que existen diferencias estadísticamente significativas.

Estudiamos las curvas ROC expresadas como las concentraciones de todos los marcadores bioquímicos en ambos ventrículos y en sangre periférica, cuyas áreas representan el diagnóstico correcto entre dos individuos fallecidos, uno por sumersión en agua salada o dulce y otro por no-sumersión y seleccionamos los marcadores bioquímicos con áreas bajo la curva mayores de 0,70. También determinamos los puntos de corte en las curvas y la especificidad y sensibilidad bajo la curva (*Tabla 17, Figuras 56 y 57*).

También realizamos un análisis discriminante con aquellos marcadores bioquímicos que mostraban las curvas que mejor discriminaban entre los casos de sumersión en agua salada o dulce y los casos de no sumersión (*Tablas 15 y 16*). Utilizamos como variable dependiente el grupo diagnóstico, estableciendo dos grupos: por un lado las muertes por sumersión en agua salada (53 casos) o en agua dulce (14 casos) y por otro las muertes por no sumersión (73 casos) y como variables independientes las concentraciones de los elementos traza. En las *Tablas 18 y 19* se muestran los porcentajes correctos de clasificación utilizando los elementos traza de manera individual y conjunta, tanto en los casos de sumersión en agua dulce como en los casos de sumersión en agua salada.

Variable	Área	Error estándar	<i>p</i>	Límite inferior	Límite superior	Punto de corte	Especif. del punto de corte	Sensib. del punto de corte
Sumersión en agua salada								
Sr VI	0,957	0,023	<0,0001	0,911	1,0	46,75	97,5	85,4
Sr VD	0,956	0,024	<0,0001	0,910	1,0	37,25	95	85,4
Sr perif.	0,950	0,023	<0,0001	0,905	0,995	39,5	92,5	83,3
Sr (VI-VD)	0,768	0,061	<0,0001	0,648	0,888	18,13	75	85,4
Mg VI	0,896	0,036	<0,0001	0,825	0,967	5,84	82,5	85,4
Mg VD	0,776	0,051	<0,0001	0,675	0,877	5,4	72,5	66,7
Mg perif.	0,727	0,057	<0,0001	0,615	0,840	4,78	67,5	62,5
Mg (VI-VD)	0,820	0,046	<0,0001	0,730	0,910	0,81	65	91,7
Cl VI	0,917	0,029	<0,0001	0,860	0,974	82,5	92,5	81,2
Cl VD	0,855	0,041	<0,0001	0,775	0,936	77,5	80	77,1
Cl perif.	0,772	0,050	<0,0001	0,674	0,871	76,5	75	66,7
Na VD	0,751	0,054	<0,0001	0,645	0,856	75	75	62,5
Sumersión en agua dulce								
Sr VI	0,758	0,077	0,005	0,607	0,910	34,2	75	72,7
Sr VD	0,732	0,096	0,012	0,543	0,920	27,2	75	69,1
Fe (VI-VD)	0,700	0,087	0,031	0,529	0,871	-137,5	83	63,6
<p>Sr= Estroncio; Mg= Magnesio; Na= Sodio; Cl= Cloro; Fe= Hierro</p> <p>VI= Ventrículo izquierdo; VD= Ventrículo derecho, Perif.= Sangre periférica</p> <p>p = Probabilidad</p>								

Tabla 17. Áreas bajo la curva ROC, error estándar y límites inferior y superior del área. Puntos de corte establecidos de acuerdo con el uso de la curva ROC en los casos de sumersión en agua salada y en agua dulce.

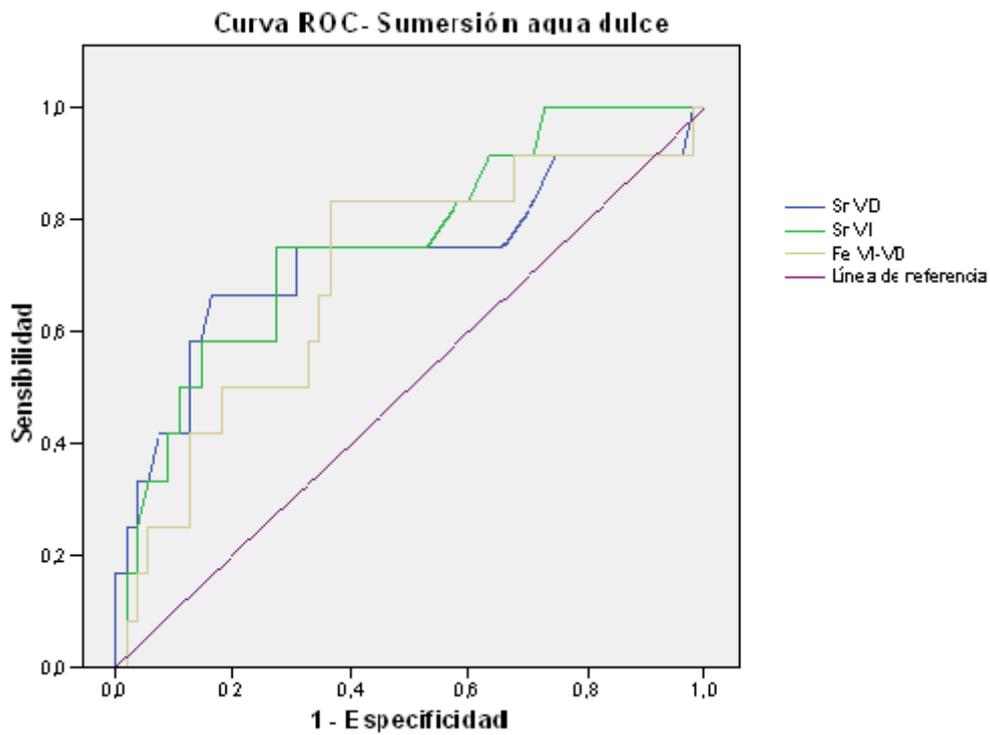


Figura 56. Curvas ROC de los elementos traza en los casos de sumersión en agua dulce.

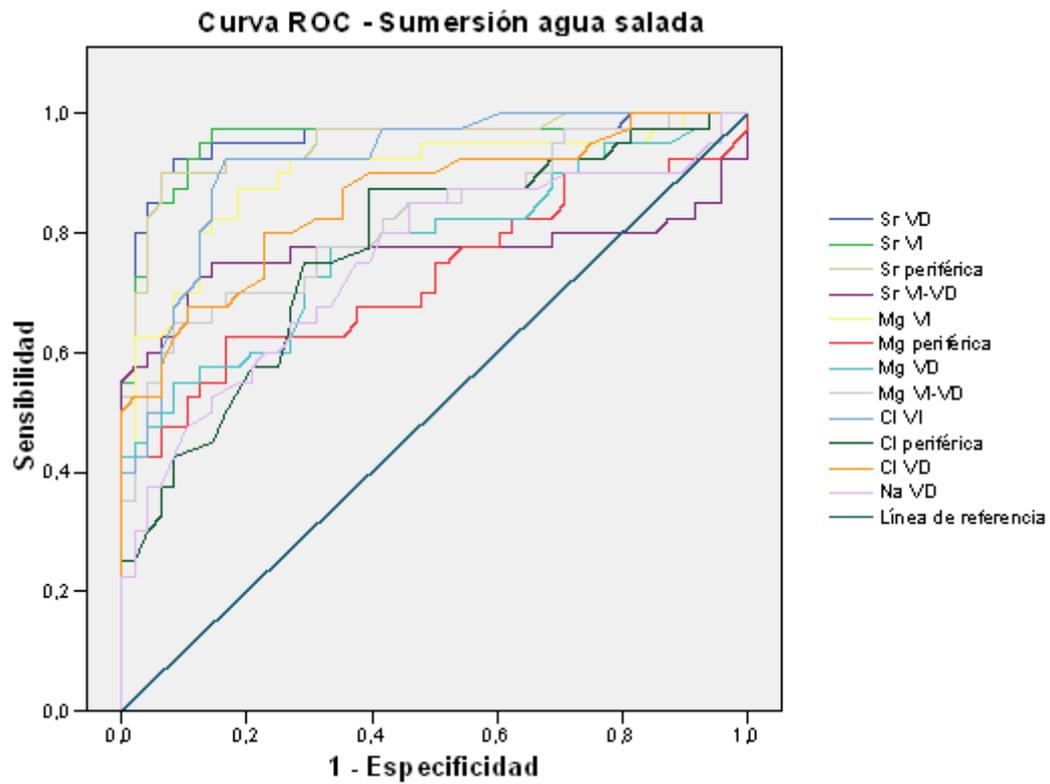


Figura 57. Curvas ROC de los elementos traza en los casos de sumersión en agua salada.

	Sumersión en agua dulce (% clasificación correcta)	No sumersión (% clasificación correcta)	Total (% clasificación correcta)
Sr (VI, VD)	46,2	90,2	82,4
Fe (VI-VD)	66,7	63,9	64,4
Sr (VI, VD) Fe (VI-VD)	50	89,1	82,1
Sr= Estroncio; Fe= Hierro VI= Ventriculo izquierdo; VD= Ventriculo derecho			

Tabla 18. Análisis discriminante usando los elementos traza en sumersión en agua dulce.

	Sumersión en agua salada (% clasificación correcta)	No sumersión (% clasificación correcta)	Total (% clasificación correcta)
Sr (VI, VD, perif., VI-VD)	79,2	96,4	88,5
Mg (VI, VD, perif., VI-VD)	70,5	98,2	85,9
Cl (VI, VD, perif.)	52,4	92,9	75,5
Na (VD)	51,1	90,5	73,6
Mg (VI, VD, perif., VI-VD) Cl (VI, VD, perif.) Na (VD)	66,7	94,5	82,5
Sr (VI, VD, perif., VI-VD) Mg (VI, VD, perif., VI-VD) Cl (VI, VD, perif.) Na (VD)	73,2	93,9	84,4
Sr= Estroncio; Mg= Magnesio; Na= Sodio; Cl= Cloro VI= Ventriculo izquierdo; VD= Ventriculo derecho, Perif.= Sangre periférica			

Tabla 19. Análisis discriminante usando los elementos traza en sumersión en agua salada.

5. DISCUSIÓN

La asfixia por sumersión es considerada como la segunda causa de muerte no intencional tras las producidas por accidentes de tráfico (Beeck et al., 2005) suponiendo más de medio millón de muertes al año en todo el mundo (Salomez y Vincent., 2004) aunque se estima que dicha cifra está muy por debajo de las cifras reales ya que muchos casos no son informados o registrados (De Nicola et al., 1997). Estas muertes se pueden producir en lugares muy variados como pueden ser océanos, lagos, ríos, piscinas, bañeras y se deben, principalmente, al aumento de la práctica de actividades acuáticas (natación, pesca, viajes en barco) y a otros factores de riesgo como pueden ser el abuso del alcohol y las drogas o la falta de supervisión en el caso de niños, aunque también hay que destacar las muertes por sumersión debidas a catástrofes naturales relacionadas con el agua (inundaciones, tormentas tropicales, huracanes e incluso tsunamis), donde la causa más frecuente de muerte es la sumersión, con un elevado número de víctimas que incrementan de forma continua la cifra de fallecidos.

El diagnóstico de muerte por sumersión es uno de los grandes problemas que se plantean en medicina legal y forense debido a la dificultad, por un lado, para llegar a un diagnóstico definitivo de la causa de la muerte y, por otro, para determinar las circunstancias en las que se ha producido. Por ello se necesita la colaboración de especialistas de diferentes disciplinas para conseguir establecer un diagnóstico certero: se requiere de una autopsia meticulosa y lo más completa posible, de hallazgos histológicos, de análisis toxicológicos, de la realización del mayor número posible de pruebas complementarias y también de los datos facilitados por la investigación policial (Esiyok et al., 2006). Así, de todas las muertes por asfixia, la sumersión es la que necesita recurrir con mayor frecuencia a exámenes complementarios para confirmar o excluir una determinada causa de muerte o para proporcionar información adicional que permita la reconstrucción completa de los hechos. Se han utilizado distintos exámenes complementarios con la intención de

resolver la causa de muerte y, aunque se han analizado muchos métodos diagnósticos, el diagnóstico post-mortem de la asfixia por sumersión sigue siendo uno de los más difíciles en patología forense (Piette y De Letter, 2006).

El hallazgo de un cuerpo en el agua plantea siempre múltiples y variadas preguntas, a las cuales, en muchas ocasiones, no es posible encontrar una respuesta adecuada a pesar de la gran cantidad de pruebas que los casos de sumersión nos ofrecen (Romero, 2007). En la actualidad, se piensa que la mayor parte de los efectos cardiovasculares de la asfixia por sumersión son fundamentalmente secundarios a la prolongada hipoxia (Bierens et al, 2002). La hipoxia inicial que sufren las víctimas por sumersión es debida a la apnea, aunque después se ha relacionado más con la lesión pulmonar aguda que se desarrolla como resultado de las alteraciones del surfactante pulmonar, con el colapso alveolar y la atelectasia (Ibsen y Koch, 2002). Por otra parte, la grave disfunción pulmonar sufrida por muchas víctimas de sumersión conduce a una insuficiencia respiratoria y a una profunda hipoxia, que puede ser suficiente para causar un paro cardíaco (Modell, 1993).

Por otra parte hay que destacar las alteraciones electrolíticas que el agua puede producir al ingresar en el torrente circulatorio, las cuales van a depender de la cantidad y el tipo de líquido aspirado. Experimentos con animales han evidenciado que, en los casos de sumersión en agua dulce, debido a las características bioquímicas del agua de sumersión, se producía una marcada hemodilución que llevaba a una situación de hiponatremia y hemólisis, con la consiguiente hiperkaliemia y fibrilación ventricular (Swann et al., 1947, 1951). Estos hallazgos se obtienen al realizar una insuflación experimental de 10-50 ml/kg de agua en los pulmones de los animales anestesiados, sin embargo, en los seres humanos, tan sólo se aspiran 1-4 ml de agua/kg durante el proceso de sumersión, aproximadamente 300 ml/persona (Modell, 1971), por lo que raramente se producen trastornos electrolíticos

significativos (Sarnaik y Vohra, 1986). Así, Oehmichen et al. (2008) hacen un estudio retrospectivo al dudar de la experimentación animal analizando 31 casos de sumersión (23 casos en agua dulce y 8 casos en agua salobre) de los cuales 21 de los casos fueron mortales y 10 sobrevivieron a la sumersión. Casi todos los casos (96%) revelaron una reducción del pH debido a la acidosis hipóxica, y sólo dos casos (6,5%) mostraron una ligera hiperpotasemia. La concentración de hemoglobina fue normal en la mayoría de los casos (83%) y ligeramente inferior en los otros (17%), mientras que la concentración de proteínas se redujo ligeramente en la mayoría de las víctimas mortales (80%). Por tanto llegan a la conclusión de que la muerte por sumersión no se debe ni a la hiperpotasemia ni al aumento de la concentración de hemoglobina debido a la hemólisis provocada por la entrada de agua en el torrente sanguíneo, sino que es el resultado de un proceso hipóxico cerebral. Por consiguiente, no es posible extrapolar los resultados obtenidos en animales a los que se puedan obtener en humanos.

Sin embargo, aunque la causa de muerte no se deba a un desequilibrio electrolítico debido al proceso hipóxico, diferentes efectos hemodinámicos y electrolíticos producidos por la sumersión han sido investigados por varios autores como métodos complementarios para la determinación de la causa de la muerte, los cuales se basan en el análisis de los elementos presentes en el medio de sumersión que penetran en el organismo y en el análisis de la hemodilución. En nuestro caso evaluamos conjuntamente la eficacia de diferentes parámetros bioquímicos a la hora de determinar la causa de muerte, los cuales han sido analizados previamente de manera individual.

Uno de los principios generales que puede ayudar a confirmar el diagnóstico de sumersión es la **presencia en la circulación sanguínea de sustancias químicas presentes en el agua de sumersión** que se encuentran en el cuerpo humano en

concentraciones muy bajas (elementos traza). El marcador ideal, como sugieren Piette y De Letter (2006), debería ser capaz de atravesar la membrana alveolo-capilar y penetrar en la circulación sanguínea, no siendo capaz de llegar a la misma por cualquier otro medio (aparato digestivo) ni debido a fenómenos por difusión post-mortem y además, debería estar presente en altas concentraciones en el agua de sumersión y en concentraciones muy bajas en el cuerpo humano.

Por esta razón, uno de los parámetros más estudiados ha sido el **estroncio**, cuya concentración en sangre total puede variar de 16 a 95 $\mu\text{g/L}$, dependiendo del tipo de agua y alimentos consumidos y del uso de ciertos fármacos para el tratamiento de la osteoporosis (Piette et al., 1994; Tournis et al., 2006), y cuya concentración en agua de mar puede llegar a alcanzar los 13000 $\mu\text{g/L}$, por lo que la proporción entre el agua de mar y la sangre (hasta 650:1) lo convierten en un potencial marcador para el diagnóstico de sumersión, a pesar de las diferencias en su concentración según la ubicación geográfica (Piette et al., 1989).

Las primeras investigaciones que se conocen en cuanto al uso del estroncio como marcador de muerte por sumersión se atribuyen a Icard en 1932, que fue la primera persona en recomendar la determinación en sangre de los elementos que se encontraban en altas concentraciones en el agua con el fin de poder diagnosticar las muertes por sumersión. Propuso la determinación de estroncio, bromo, bario y flúor en sangre de fallecidos por sumersión en agua salada, aunque no llegó a demostrar su hipótesis debido a las dificultades técnicas de aquella época. Fueron Abdallah et al. en 1985 los primeros en determinar las concentraciones de estroncio en sangre de conejos muertos por sumersión en agua dulce y salada. Para ello analizaron sangre periférica y sangre de VI antes y después de realizar el experimento respectivamente en 12 conejos sumergidos en agua salada, 12 en agua dulce y 6 casos control. De cada categoría de los casos de sumersión, 6 animales murieron por sumersión en los

distintos tipos de agua, mientras que el resto recibieron inyecciones intratraqueales del mismo tipo de agua. Las dosis administradas fueron 7,5, 10, 12,5, 15, 17,5 y 20 mL del correspondiente agua/kg. Por otro lado, se administró una dosis letal de tiopental en los casos control y dos minutos después de su muerte se sumergieron en agua salada durante 5 minutos. También fueron analizadas las concentraciones de estroncio en las aguas del mar Mediterráneo y del río Nilo, aguas utilizadas en la realización de los experimentos. Observaron que en los casos de sumersión las concentraciones de estroncio fueron más elevadas que las halladas en los casos control. Además, demostraron que las concentraciones de estroncio en sangre de conejos muertos por sumersión en agua salada fueron superiores a las halladas en conejos muertos por sumersión en agua dulce.

Desde que se empezó a utilizar el análisis del estroncio para el diagnóstico de la muerte por sumersión, fue notorio el hallazgo de concentraciones de estroncio en sangre relativamente bajas en aquellos casos donde la muerte se producía por causas distintas a la sumersión. Según Piette et al. (1994), quienes determinaron mediante ICP-AES (Espectrometría de emisión atómica usando una fuente de plasma de acoplamiento inductivo) la concentración de estroncio en sangre periférica de 22 individuos sanos y de 7 cadáveres fallecidos por causas distintas a la sumersión, la concentración media de estroncio obtenida en la sangre de los sujetos sanos fue de $11,4 \pm 0,83 \mu\text{g/L}$ (Rango 5,7-15,6) y en los cadáveres fue de $11,9 \pm 1,36 \mu\text{g/L}$ (Rango 8,7-19,1), mientras que, según Azparren et al. (2003), que determinaron mediante ETAAS (Espectrometría de absorción atómica electrotérmica con horno de grafito y corrección del efecto Zeeman) la concentración de estroncio en sangre de ambos ventrículos en 144 casos de muerte por sumersión en agua dulce y en 22 casos de muerte por otras causas, la concentración media de estroncio en estos casos distintos a la sumersión fue de $28,0 \mu\text{g/L}$ (SD = 12,4; Rango 14,5-47,5). En nuestro estudio, la concentración media de estroncio en las causas de muerte distintas a la sumersión va

a depender del lugar de muestreo: 26,95 $\mu\text{g/L}$ (SD = 20,67) en VD, 33,32 $\mu\text{g/L}$ (SD = 25,43) en VI, 30,20 $\mu\text{g/L}$ (SD = 18,60) en sangre periférica y 10,79 $\mu\text{g/L}$ (SD = 12,29) en VI-VD, concentraciones similares a las descritas por Azparren et al. (2003).

Azparren et al. (2007b) llevaron a cabo un estudio retrospectivo en el que evaluaron los efectos de la edad, el género, la temperatura y la salinidad del agua sobre la concentración de estroncio en sangre de VI de 150 cadáveres hallados en aguas con alta concentración de estroncio ($> 1000 \mu\text{g/L}$) del norte de España (126 fallecidos en agua salada y 24 en agua dulce). Para ello realizaron dos grupos según los siguientes criterios: en el grupo B se excluyeron los 18 casos comprobados de no sumersión (14 en agua de mar y 4 en agua dulce) y en el grupo C se excluyeron todos los casos en los que la concentración de estroncio en VI fue $< 172 \mu\text{g/L}$. Obtuvieron diferencias estadísticamente significativas en la concentración de estroncio en sangre del VI según la salinidad del medio ($p < 0,001$) y según la temperatura del agua de sumersión ($p = 0,030$). Sin embargo, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en función del sexo o la edad, hecho que coincide con los resultados obtenidos en nuestro trabajo, ya que observamos que ni la edad ni el género influyen significativamente en las concentraciones sanguíneas de estroncio.

Para poder diagnosticar los casos de muerte por sumersión y diferenciarlos del resto de muertes se establecieron una serie de valores límites que iban a proporcionar información acerca de la cantidad de estroncio capaz de penetrar en el torrente sanguíneo; ésta iba a depender de la concentración de estroncio en el medio de sumersión y del periodo de agonía. Azparren et al. (1994) demostraron la utilidad de las diferencias en las concentraciones de estroncio entre el VI y VD en la investigación de la causa de muerte en los casos de sumersión en agua salada. Para ello analizaron muestras de sangre de ambos ventrículos de 28 casos de muerte por sumersión y 20 casos de muerte por otras causas, encontrando que en los casos

"típicos" de asfixia por sumersión en agua salada, las diferencias en las concentraciones de estroncio entre VI-VD superaban los 70 $\mu\text{g/L}$. Esto fue ratificado en un artículo posterior (Azparren et al., 1998), en el que estudiaron el valor diagnóstico del estroncio, cloro, hemoglobina y diatomeas en sangre de ambos ventrículos de 133 casos de muerte por sumersión distribuidos en 3 grupos: un grupo de 76 casos de sumersión "típica", otro grupo de 20 casos de sumersión "atípica" (considerado como grupo control) y un tercer grupo de 37 casos sin suficiente información acerca de la causa de muerte (excluidos del análisis estadístico). Estos 3 grupos fueron clasificados a su vez en función de la concentración de estroncio en el agua de sumersión, distinguiendo 3 grupos según fuese inferior a 80 $\mu\text{g/L}$ (16 casos), entre 80 y 800 $\mu\text{g/L}$ (36 casos) y superior a 800 $\mu\text{g/L}$ (71 casos). En este estudio destacaron además el valor de la utilización de las diferencias en las concentraciones de estroncio entre VI y VD en la clasificación de los casos "típicos" de sumersión cuando éste está presente en el medio de sumersión en concentraciones superiores a 800 $\mu\text{g/L}$. Ya en el año 2000, Azparren et al. también demostraron la utilidad de la concentración de estroncio en sangre de VI, encontrando que valores superiores a 172 $\mu\text{g/L}$ eran indicativos de muerte por sumersión, siendo éste además un marcador menos proclive a experimentar errores analíticos. Para ello determinaron las concentraciones de estroncio en VI y las diferencias VI-VD en 70 casos de sumersión en agua salada que fueron clasificados en función de los hallazgos de las autopsias y de la duración de los periodos de agonía, permitiendo distinguir, gracias a estos dos marcadores (VI y VI-VD), entre tres periodos de agonía diferentes: muertes instantáneas (VI < 125 $\mu\text{g/L}$; VI-VD < 30 $\mu\text{g/L}$), sumersiones vitales rápidas (VI = (125-172) $\mu\text{g/L}$; VI-VD = (30-70) $\mu\text{g/L}$) y sumersiones vitales comunes (VI > 172 $\mu\text{g/L}$; VI-VD > 70 $\mu\text{g/L}$). En nuestro estudio, la media de las concentraciones de estroncio observada en los casos de sumersión en agua salada fue, en el caso de la diferencia entre ambos ventrículos (VI-VD), de aproximadamente 360 $\mu\text{g/L}$ y en el caso de VI, de aproximadamente 830 $\mu\text{g/L}$, valores muy superiores a los mencionados por

Azparren et al. (1994, 2000). Esto podría explicarse teniendo en cuenta que los estudios se realizan en diferentes lugares de la geografía española: Azparren analiza los casos de sumersión ocurridos en el norte de España, mientras que nosotros lo hacemos en el sur de España, pudiendo ser debido a las diferencias en las concentraciones de estroncio de dichas aguas.

Al comparar los resultados obtenidos en las distintas causas de muerte estudiadas obtenemos también que las concentraciones de estroncio en los casos de sumersión eran superiores, en todas las localizaciones sanguíneas, a los niveles observados en los casos de muerte por otras causas, coincidiendo con los resultados obtenidos por otros autores (Piette et al., 1989; Azparren et al., 1994; Fornes et al., 1998). Además, al comparar los casos de sumersión en agua salada con los casos de sumersión en agua dulce, obtenemos que las concentraciones sanguíneas de estroncio en los casos de sumersión en agua salada, en todas las localizaciones sanguíneas, son significativamente superiores a las obtenidas en los casos de sumersión en agua dulce. En los casos de sumersión en agua salada observamos también diferencias estadísticamente significativas entre las concentraciones de estroncio del VI y las del VD. Todos estos datos ratifican la transferencia de estroncio desde el agua hacia la sangre del ventrículo izquierdo del fallecido por sumersión, siendo tanto mayor en aquellos casos en los que la concentración de estroncio en el agua de sumersión es mayor (el agua de mar contiene concentraciones mucho más altas de estroncio que el agua dulce).

Por el contrario, los casos de sumersión en agua dulce ofrecen una gran disparidad en cuanto a las concentraciones de estroncio se refiere. Piette et al. (1989) analizaron la sangre de ambos ventrículos y sangre periférica de 33 sujetos muertos por sumersión en agua salada, 29 por sumersión en agua dulce y 36 por causas distintas a la sumersión comparando estos tres grupos según el lugar de muestreo y observaron

una superposición en las concentraciones de estroncio entre los sujetos fallecidos por sumersión y los fallecidos por otras causas, mientras que Fornes et al. (1998) combinaron en su estudio la histomorfometría de los pulmones y la determinación de estroncio en sangre de 116 fallecidos por sumersión en agua dulce y 58 casos control (22 fallecidos por causas distintas a la asfixia, 13 fallecidos por asfixia y 23 sujetos vivos sanos), además de la determinación de estroncio en el agua de sumersión, comprobando que las concentraciones medias de estroncio en sangre eran mucho más altas en sujetos fallecidos por sumersión que en los fallecidos por otras causas o en sujetos vivos sanos, no apreciando solapamiento alguno entre ambos. Posteriormente, en 2003, Azparren et al. analizaron la concentración de estroncio en sangre de ambos ventrículos de 144 cuerpos fallecidos por sumersión en agua dulce y 20 fallecidos por causas distintas de la sumersión, afirmando que sólo el 32% de las sumersiones en agua dulce podían ser diagnosticadas mediante la determinación de las concentraciones de estroncio en sangre. En nuestro caso, las concentraciones de estroncio en ambos ventrículos son significativamente más altas en los casos de sumersión en agua dulce que en los sujetos fallecidos por otra causa de muerte, aunque no encontramos diferencias estadísticamente significativas en sangre periférica ni entre los dos ventrículos.

En cuanto al método analítico utilizado para la determinación de estroncio en sangre total, nos basamos en los trabajos realizados por Azparren et al. (1994), en los que utilizaron un espectrofotómetro de absorción atómica con cámara de grafito y con corrección del efecto Zeeman, lo cual permitió el análisis directo de las muestras de sangre diluidas (bien con Triton X-100 o con agua desionizada) evitando la tediosa y laboriosa digestión ácida con ácido nítrico y ácido perclórico de las muestras de sangre, pretratamiento necesario en el método utilizado por Piette et al. (1994) – ICP AES (espectrometría de emisión atómica usando una fuente de plasma de acoplamiento inductivo).

Además del estroncio, otros investigadores han analizado las **concentraciones de otros elementos traza** en los sujetos fallecidos por sumersión, aunque las concentraciones de estos parámetros bioquímicos pueden variar en función de la cantidad y el tipo de líquido aspirado.

Se han analizado otros elementos traza útiles como marcadores de hemodilución y de los trastornos electrolíticos que se producen en los casos de muerte por sumersión: son el **sodio**, el **calcio**, el **cloro**, y el **magnesio**. Estos elementos se encuentran en concentraciones abundantes en el agua marina y en sangre humana, presentando unas ratios de concentración agua marina/concentración suero de: 3,7, 4,1, 5,3 y 29,3 para los casos de sodio, calcio, cloro, y magnesio respectivamente (Azparren et al., 2000). El grupo de investigación de Zhu et al. (2003b, 2005) estudió el comportamiento de las concentraciones de estos elementos, entre otros, en la sangre de ambos ventrículos de sujetos ahogados, tanto en agua dulce como en agua salada, comparándolas con los resultados obtenidos en otros tipos de muerte, y concluyeron que dichos resultados era útiles para diferenciar ambos grupos y también para diferenciar si la sumersión se produjo en agua dulce o salada.

Zhu et al. (2003b) investigaron las diferencias existentes entre casos de sumersión en agua dulce (n=11), en agua salada (n=15) y de infarto agudo de miocardio (n=23) en las concentraciones de distintos marcadores bioquímicos post-mortem: sodio, cloro, magnesio, urea, creatinina, SP-A y troponina T. Estos marcadores fueron analizados en sangre de ambos ventrículos de cadáveres con un intervalo post-mortem <48 horas. Los resultados obtenidos para el caso del sodio indicaron que, en los casos de sumersión en agua salada, las concentraciones en ambos ventrículos fueron significativamente más altas comparándolas con los casos de sumersión en agua dulce, mientras que para el caso del cloro, calcio y magnesio, hallaron concentraciones de estos elementos en VI significativamente más elevadas en los

casos de sumersión en agua salada que en los casos de sumersión en agua dulce y en los casos de infarto agudo de miocardio. De todos ellos, concluyeron que la concentración sérica de magnesio en VI era el mejor marcador para diferenciar los casos de sumersión en agua salada de los de agua dulce.

Zhu et al., en el estudio realizado en el 2005, evaluaron la utilidad de las concentraciones séricas post-mortem de calcio y magnesio con el objetivo de identificar la causa de muerte. Para ello analizaron la sangre de ambos ventrículos y la sangre periférica de un total de 360 autopsias, 266 hombres y 94 mujeres con una edad media de 56,2 años y un intervalo post-mortem entre 5-48 horas. Las causas de muerte fueron clasificadas de la siguiente forma: traumatismos cerrados (n=76), muertes por arma blanca (n=29), asfixia (n=42), sumersión (n=28: en agua dulce n=11; en agua salada n=17), muertes por incendio (n=79), sobredosis de metanfetaminas (n=8), muertes por fallo multiorgánico como consecuencia de traumatismo (n=37) e infarto agudo de miocardio (n=61). Los resultados obtenidos concluyeron que ambos elementos traza fueron significativamente más altos tanto en sangre de ambos ventrículos como en sangre periférica en los casos de sumersión en agua salada comparado con las otras causas de muerte. Además, en los casos de sumersión en agua salada, encontraron concentraciones séricas de calcio y magnesio en VI más elevadas que las correspondientes en VD y sangre periférica. Sin embargo, en los casos de sumersión en agua dulce obtuvieron que las concentraciones de calcio en sangre periférica fueron significativamente superiores a las halladas en ambos ventrículos y que para el magnesio, las concentraciones en VD fueron significativamente superiores a las halladas en VI.

Un año después, Byard et al. (2006) llevaron a cabo un estudio para demostrar la hiponatremia debida a la hemodilución que se producía en el VI después de una sumersión en agua dulce y para determinar si la hemólisis resultante de la

hemodilución en el VI podía provocar la tinción de la íntima de la aorta. Para ello determinaron la concentración sérica de sodio en VI de 74 casos de sumersión, 44 en agua dulce y 30 en agua salada obteniendo diferencias significativas entre ambos grupos ($p < 0,001$), con un rango de 93 a 147 mmol/L en los casos de sumersión en agua dulce (media=117+/-14.2 mmol/L) y 123 a 183 en los casos de sumersión en agua salada (media=153+/-14.4 mmol/L). Además, la concentración media de sodio (117 mmol/L) en los casos de sumersión en agua dulce fue significativamente menor que los valores de normalidad del sodio en suero (137-145 mmol/L).

En nuestro estudio, al comparar los casos de sumersión de manera conjunta con las otras causas de muerte, obtenemos que las concentraciones de sodio en el suero de ambos ventrículos son significativamente diferentes y superiores en sujetos fallecidos por sumersión que en otros casos de asfixia u otras causas de muerte, independientemente del medio de sumersión. Sin embargo, al considerar los casos de sumersión por separado, según tengan lugar en agua salada o en agua dulce, comprobamos que al comparar los casos de sumersión en agua salada con las otras causas de muerte, las concentraciones de sodio en el suero de ambos ventrículos y en sangre periférica son significativamente más elevadas en los casos de sumersión en agua salada, sin embargo, al realizar la comparación con los casos de sumersión en agua dulce por separado, no se encuentran diferencias estadísticamente significativas en las concentraciones séricas de sodio entre los dos grupos. Esto puede ser explicado en los casos de sumersión en agua salada como consecuencia de la transferencia de sodio desde el medio de sumersión hasta el torrente sanguíneo, ya que en agua salada, la concentración de sodio es muy elevada (aproximadamente 455 mmol/L), y en los casos de sumersión en agua dulce, como consecuencia del fenómeno de hemodilución, haciendo que las concentraciones séricas de sodio sean menores y no se encuentren diferencias significativas con otras causas de muerte.

Además, al realizar la comparación entre los casos de sumersión en agua salada y los de agua dulce, obtenemos que los valores de sodio en VI, VD y sangre periférica en los casos de sumersión en agua dulce, son significativamente más bajos que los valores obtenidos en los casos de sumersión en agua salada. Todo esto concuerda con los hallazgos descritos por Zhu et al. (2003b) y con los de Byard et al. (2006) y demuestran el fenómeno de la hemodilución. Destacar también que las concentraciones medias de sodio observadas en todas las localizaciones sanguíneas, tanto en los casos de sumersión en agua dulce como en agua salada, son menores que los valores de normalidad del sodio en suero (136,7 a 145,1 mmol/L), particularmente en los casos de sumersión en agua dulce, hecho que también coincide con los resultados obtenidos por Byard et al. (2006).

Cabe destacar también que cuando analizamos los casos de sumersión en agua salada individualmente, encontramos que los niveles de sodio en el VI son significativamente mayores que en el VD, probablemente como resultado de las altas concentraciones de sodio en el agua salada y a la consiguiente hemoconcentración de la sangre debido a la aspiración de un medio hipertónico respecto a la sangre.

En cuanto a las concentraciones de magnesio, cloro y calcio, cuando comparamos los casos de sumersión de manera conjunta con otras causas de muerte, encontramos que los valores séricos de magnesio y cloro son significativamente más elevados en los casos de sumersión, tanto en ambos ventrículos como en sangre periférica, al igual que las diferencias VI-VD. En el caso del calcio, tan sólo las concentraciones séricas en VI y VD son superiores en los casos de sumersión. Sin embargo, al considerar los casos de sumersión por separado, observamos que al comparar los casos de sumersión en agua salada con otras causas de muerte, los resultados coinciden con los obtenidos en la comparación de los casos de sumersión de manera conjunta con otras causas de muerte, pero al realizar la comparación de los casos de

sumersión en agua dulce con otras causas de muerte, tan sólo las concentraciones de calcio en VD son significativamente más altas en los casos de sumersión en agua dulce, mientras que las concentraciones de magnesio en VI y sangre periférica son significativamente menores que en las otras causas de muerte, hechos atribuibles al fenómeno de hemodilución.

Otro de los hallazgos de nuestra investigación es que las concentraciones séricas de magnesio, cloro y calcio en agua salada son significativamente más altas que en agua dulce. Así, al comparar los casos de los sujetos fallecidos por sumersión en agua salada con los casos de los sujetos fallecidos por sumersión en agua dulce, obtenemos que las concentraciones de magnesio y cloro, tanto en ambos ventrículos como en sangre periférica, son significativamente más elevadas en los casos de sumersión en agua salada que en agua dulce, al igual que las concentraciones de magnesio entre los dos ventrículos (VI-VD) y las concentraciones de calcio en VI, resultados que coinciden con los de Zhu et al. (2003b).

Azparren et al. (1998), como ya hemos visto anteriormente, estudiaron el valor diagnóstico del cloro, junto a otros marcadores, en sangre de ambos ventrículos de 133 casos de muerte por sumersión distribuidos en 3 grupos según se tratase de una sumersión "típica", atípica" o sin suficiente información acerca de la causa de muerte. En este caso, estos 3 grupos también fueron clasificados a su vez en función de la concentración de cloro en el agua de sumersión, distinguiendo 2 grupos según fuese inferior a 15 mmol/L (n=63), abarcando todas las sumersiones en agua dulce, o superior a 90 mmol/L (n=49), incluyendo aquí todas las sumersiones en agua salada. De los resultados obtenidos concluyeron que no existían diferencias significativas en las concentraciones de cloro de ambos ventrículos entre los casos de sumersión "típicos" y los "atípicos", tanto en agua dulce como en agua salada. Además, en los casos de sumersión "típicos", al comparar las concentraciones de cloro en ambos

ventrículos entre las sumersiones en agua dulce y las de agua salada, tampoco obtuvieron diferencias significativas. En nuestro caso, contrariamente a los resultados obtenidos por Azparren et al. (1998) y como ya hemos explicado en párrafos anteriores, hallamos diferencias estadísticamente significativas en las concentraciones de cloro en ambos ventrículos, en sangre periférica y en las diferencias VI-VD al comparar los casos de sumersión en agua salada con otras causas de muerte, y en las concentraciones de cloro en ambos ventrículos y en sangre periférica al comparar entre sumersiones en agua salada y en agua dulce.

En cuanto a las diferencias en las concentraciones entre los dos ventrículos en los casos de sumersión en agua salada, los valores de magnesio en VI son significativamente superiores a los del VD, mientras que se obtiene lo contrario en los casos de sumersión en agua dulce, resultados que coinciden con los obtenidos por Zhu et al. (2005). El hecho de que los niveles de magnesio en VI sean más elevados en agua salada se debe a que existe una relación de aproximadamente 100:2 entre la concentración de magnesio en agua salada y agua dulce, pudiéndose producir una transferencia de este elemento desde el agua al VI. Sin embargo, en agua dulce ocurre lo contrario y se debe a que la sangre del VI está más diluida que la del VD, poniendo de manifiesto la hemodilución. Por tanto, estos resultados nos permiten señalar que las diferencias encontradas en las concentraciones de magnesio entre los dos ventrículos pueden proporcionar información útil para el diagnóstico de los casos de sumersión en agua dulce. En los casos del cloro y el calcio, hallamos resultados similares en los casos de sumersión en agua salada, donde observamos que en VI los valores son más altos que en VD. Esto, al igual que en el caso del magnesio, se puede explicar porque las concentraciones de calcio y cloro son más altas en agua salada que en agua dulce. Por tanto, y de acuerdo con Zhu et al. (2003b; 2005), estos hallazgos sugieren que los niveles séricos de cloro, calcio y magnesio puede ser

especialmente útiles para el diagnóstico de los casos de sumersión en agua salada con períodos post-mortem breves.

Otro de los objetivos que nos planteamos para comprobar si nos podía proporcionar información en el diagnóstico de la muerte por sumersión fue el análisis de las concentraciones de **hierro**. De acuerdo con lo publicado por Gettler en su artículo de 1921, la idea inicial de utilizar la concentración de hierro en ambos ventrículos del corazón fue de Carrara (1902). Un siglo después, fueron De La Grandmaison et al. (2006) los que estudiaron el valor diagnóstico del hierro en los casos de sumersión en agua dulce comparándolo con los casos control. Para ello seleccionaron 26 casos de sumersión en agua dulce con un intervalo post-mortem menor de una semana de los 128 casos de sumersión de los que hicieron autopsia entre 1998 y 2004 y 12 casos control cuya causa de muerte se atribuyó a lesiones por traumatismos o sobredosis de drogas, y en todos ellos se determinaron las concentraciones de hierro en ambos ventrículos cardíacos, obteniendo valores significativamente más altos de las diferencias entre VD-VI en los casos de sumersión con respecto a los casos control: para los casos de sumersión, el valor medio de hierro en las diferencias entre VD-VI fue de 67,7 $\mu\text{mol/L}$, mientras que para los casos control fue de 1,36 $\mu\text{mol/L}$. Estos resultados permitieron demostrar así la hemodilución en todos los casos de sumersión en agua dulce.

En los resultados obtenidos por nosotros, no se hallaron diferencias estadísticamente significativas en las concentraciones de hierro en todas las localizaciones sanguíneas entre las muertes por sumersión y las otras causas de la muerte, y tampoco entre los casos de sumersión en agua dulce y en agua salada. Sin embargo, encontramos diferencias estadísticamente significativas en las concentraciones de hierro (VI-VD) entre los casos de sumersión en agua dulce y otras causas de muerte, hallazgo que coincide con los obtenidos por De La Grandmaison et al. (2006).

En cuanto a las diferencias en las concentraciones entre los dos ventrículos en los casos de sumersión en agua salada observamos diferencias estadísticamente significativas entre las concentraciones de hierro en ambos ventrículos, siendo las concentraciones más altas en el VD, lo cual puede ser explicado debido al fenómeno de la hemodilución por aspiración de agua. Por el contrario, esto no ocurre en los casos de sumersión en agua dulce, quizá porque las concentraciones de hierro que encontramos en agua dulce fueron superiores a los valores correspondientes en agua salada, lo que pudo hacer que aumentase su concentración en VI.

Otros posibles marcadores séricos de hemodilución debido a la aspiración del agua de sumersión son la **urea** y la **creatinina**, aunque este último también puede ser utilizado como marcador de hipoxia, ya que aumenta en los casos en los que se produce una hipoxia sistémica aguda provocada por una profunda disminución de oxígeno. Destacan las investigaciones llevadas a cabo por Zhu et al. (2003b, 2007a), en las que estudian estos marcadores post-mortem en suero y en líquido pericárdico para poder diagnosticar la causa de muerte y también para diferenciar entre muertes por sumersión en agua salada y en agua dulce.

En 2003, Zhu et al., como hemos explicado anteriormente, investigaron las diferencias existentes entre casos de sumersión en agua dulce (n=11), en agua salada (n=15) y de infarto agudo de miocardio (n=23) en las concentraciones de distintos marcadores bioquímicos post-mortem, entre ellos la urea y la creatinina. Estos autores refieren que las concentraciones séricas de urea y creatinina en VI y sus ratios VI/VD fueron significativamente menores en los casos de sumersión (tanto en agua dulce como en agua salada) comparado con los casos de infarto agudo de miocardio, considerando la ratio VI/VD en el caso de la urea como el marcador más eficiente para el diagnóstico de las muertes por sumersión debido a la hemodilución. En cuanto a las sumersiones en agua salada, un hecho característico fue el valor tan bajo

de la ratio VI/VD en el caso de la urea aunque no observaron diferencias estadísticamente significativas entre los casos de sumersión en agua salada y los de agua dulce, ni para la urea ni para la creatinina.

Ya en 2007, Zhu et al. analizaron las diferencias existentes entre las concentraciones sanguíneas y en líquido pericárdico de la urea, creatinina y ácido úrico en las muertes agudas con el fin de investigar la fisiopatología de la muerte. Para ello recogieron muestras de líquido pericárdico y de sangre de ambos ventrículos y sangre periférica de las siguientes autopsias según la causa de muerte: traumatismos (n=136), asfixia (n=50), sumersión (n=39: en agua dulce n=21, en agua salada n=18), muertes en incendio (n=99), hipertermia (n=11), hipotermia (n=8), envenenamiento (n=26), muertes por fallo multiorgánico como consecuencia de traumatismo (n=44) y muertes naturales (n=143). Observaron que en los casos de muerte por sumersión, las concentraciones de urea en VD y sangre periférica fueron significativamente superiores a las observadas en VI y en el líquido pericárdico, independientemente del medio de sumersión (agua dulce o salada), demostrando una vez más el fenómeno de hemodilución de la sangre del VI debido a la aspiración de agua. Sin embargo, no encontraron diferencias significativas de las concentraciones de urea y creatinina entre los casos de sumersión y otras causas de muerte.

En nuestro estudio, una de las características de los casos de sumersión en agua salada que hemos observado han sido las concentraciones significativamente más bajas de urea en el VI comparado con el VD. Sin embargo, en los casos de sumersión en agua dulce, han sido las concentraciones de creatinina las que fueron significativamente menores en el VI comparado con el VD. Con estos resultados podemos decir que en los casos de sumersión los niveles de urea y creatinina son más bajos en VI que en VD, hallazgos que confirman el efecto de la hemodilución

independientemente del medio de sumersión y que coinciden con los de Zhu et al. (2007a).

Cuando analizamos de manera conjunta los casos de sumersión frente a otras causas de muerte no observamos diferencias estadísticamente significativas en las concentraciones de urea y creatinina en ninguna de las localizaciones, hallazgo que también coincide con los de Zhu et al. (2007a). Cuando analizamos los casos de sumersión por separado, estos resultados se repiten al comparar los casos de sumersión en agua salada con otras causas de muerte, sin embargo, al comparar los casos de sumersión en agua dulce con otras causas de muerte, observamos que las concentraciones de urea y creatinina en VD son significativamente menores en los casos de sumersión en agua dulce que en otras causas de muerte.

Cuando analizan los casos de sumersión en agua salada frente a los de agua dulce, Zhu et al. (2003b) no observaron diferencias estadísticamente significativas en las concentraciones de urea y creatinina entre estos dos grupos, sin embargo, nosotros observamos que en los casos de sumersión en agua salada, las concentraciones de urea y creatinina en VD son significativamente más altas que en los casos de sumersión en agua dulce.

La **troponina T** es un marcador que aumenta según sea la gravedad del daño miocárdico en el momento de la muerte y que también se ha estudiado como posible marcador bioquímico de muerte por sumersión, siendo útil en la investigación de la influencia de la hipoxia sistémica en el corazón.

En 2003, Zhu et al., como hemos indicado anteriormente, estudiaron la troponina T como marcador sérico para realizar un diagnóstico diferencial entre muerte por sumersión y muerte por infarto agudo de miocardio, encontrando concentraciones

séricas de la troponina T significativamente más altas en los casos de infarto agudo de miocardio comparándolos con los casos de sumersión. También observaron un leve aumento de las concentraciones séricas de troponina T en los casos de sumersión en agua dulce, lo que sugiere un daño miocárdico secundario. Sin embargo, este hallazgo no fue tan evidente en los casos de sumersión en agua salada. Posteriormente, Zhu et al. (2006a) analizaron la troponina T en sangre de ambos ventrículos, sangre periférica y en líquido pericárdico en distintos casos de muerte con el fin de evaluar su validez en la investigación del daño miocárdico, con especial atención a las causas de muerte traumáticas. Las distintas causas de muerte estudiadas fueron: muertes por arma blanca (n=143), asfixia (n=35), sumersión (n=27), muertes en incendio (n=94), hipertermia (n=13), hipotermia (n=6), sobredosis por metanfetaminas (n=12), intoxicación por monóxido de carbono (n=5), infarto de miocardio (n=57) y las muertes por accidentes cerebrovasculares (n=13). Observaron que en periodos post-mortem cortos (<12 horas) las concentraciones más altas de este marcador en suero se encontraron en los casos de hipertermia, abuso letal de metanfetaminas, intoxicación por CO e infarto de miocardio, mientras que las concentraciones más bajas se obtuvieron en los casos de hipotermia y sumersión, demostrando así que el aumento de las concentraciones de la troponina T en suero iba a depender de la gravedad del daño miocárdico en el momento de la muerte. Otros autores como Maeda et al. (2009b) han investigado las concentraciones de las troponinas cardíacas (troponina T e I) y de la isoenzima MB de la creatinín quinasa (CK-MB) en el líquido cefalorraquídeo de 257 autopsias con un periodo post-mortem inferior a 48 horas, obteniendo una correlación significativa entre las concentraciones de la troponina T e I en sangre periférica y en líquido cefalorraquídeo, pero insignificante para la CK-MB. Observaron un marcado aumento en las concentraciones de la troponina T e I en líquido cefalorraquídeo en los casos de asfixia prolongada e hipertermia, además de un aumento de la troponina I en algunos casos de muerte cardíaca aguda. Sin embargo, el aumento de la CK-MB fue

aparentemente independiente de la causa de muerte, y se observó sobre todo en muertes por intoxicación aguda. Estos hallazgos sugirieron que los niveles de troponina T e I en líquido cefalorraquídeo podían ser útiles en la investigación del progreso y la duración de daño miocárdico en el proceso de la muerte.

En nuestro caso, las concentraciones séricas más elevadas de Troponina T se encuentran en VI en las asfixias distintas de la sumersión y en VD y sangre periférica en otras causas de muerte, aunque no hallamos diferencias estadísticamente significativas con los casos de sumersión. Así, el hecho de obtener valores de troponina T más bajos en los casos de sumersión coincide con los resultados obtenidos por Zhu et al. (2003b, 2006a).

Tampoco observamos diferencias estadísticamente significativas cuando comparamos las concentraciones séricas de troponina T entre los casos de sumersión en agua salada y los de agua dulce y al comparar los resultados de las concentraciones séricas de troponina T entre VI y VD en los casos de sumersión en agua dulce y en agua salada.

Por otra parte, es necesario tener en cuenta otros factores, además de la causa de muerte, que pueden modificar las concentraciones de los elementos traza en sangre, como puede ser el **intervalo post-mortem**. En nuestro estudio no encontramos una correlación significativa entre los niveles de los elementos traza y el intervalo post-mortem, aunque en los casos de sumersión hallamos una correlación con otro factor estrechamente relacionado con el intervalo post-mortem: el período de permanencia del cuerpo en el agua. Por esta razón y tal y como indican Maeda et al. (2011), estamos de acuerdo en que la utilización del análisis bioquímico post-mortem debe limitarse al periodo post-mortem precoz.

Aunque hay muy pocas evidencias que sugieran la posibilidad de difusión post-mortem del agua a la sangre, encontramos una correlación significativa entre el tiempo estimado de permanencia en el agua y las concentraciones de los elementos traza en suero: en el caso del estroncio, magnesio y cloro observamos esta correlación con las concentraciones de estos elementos en ambos ventrículos y en sangre periférica y en el caso del sodio y el calcio, con las concentraciones en el VI. Sin embargo, cuando se excluyeron del análisis estadístico los cinco casos que permanecieron más de 3 días en el agua, la correlación significativa entre el tiempo aproximado de permanencia en el agua y las concentraciones de los elementos traza en suero desapareció. Por lo tanto, estos resultados sugieren la posibilidad de difusión post-mortem de los elementos traza desde el agua al organismo, con lo que consideramos recomendable su utilización en los tres primeros días después del fallecimiento, coincidiendo con el tiempo establecido por Azparren et al. (2003). Sin embargo existe el inconveniente de que no siempre es posible obtener información del tiempo de permanencia en el agua.

También observamos que en los casos de sumersión en general, y en las sumersiones en agua salada o en agua dulce individualmente, las concentraciones de los elementos traza en el agua se correlacionaron significativamente con las halladas en suero, confirmándose así su aspiración. Esto fue corroborado por el hecho de que las concentraciones sanguíneas de estroncio, el cual ha demostrado su utilidad como marcador de la aspiración de agua que contiene este metal (Piette et al., 1989; Piette, 1992; Azparren et al., 1994, 1998, 2000, 2003), se correlacionaron directa y significativamente con las concentraciones séricas de otros elementos traza que se encuentran en el medio de sumersión: magnesio, calcio, cloro, sodio y hierro.

En el análisis de las curvas ROC, la mayor capacidad para discriminar entre un caso de una muerte por sumersión frente a otra muerte por otra causa se encuentra en las

concentraciones de estroncio en ambos ventrículos y en sangre periférica y en las concentraciones de cloro y magnesio en VI, todos con áreas bajo la curva mayores de 0,70 y con unas especificidades y sensibilidades en el punto de corte cercanas al 90%, sobre todo en el caso del estroncio en VI y en VD. Cuando estas variables se utilizaron en el análisis discriminante, la determinación conjunta de estroncio en todas las localizaciones permitió una correcta identificación en el 83% del total de los casos, mientras que la determinación conjunta de cloro en ambos ventrículos y de magnesio en ventrículo izquierdo clasificó correctamente tan sólo un 45% de los casos de sumersión. La determinación conjunta de todos estos elementos permitió una identificación correcta del 65% de los casos de sumersión, no mejorando significativamente la correcta clasificación de los casos de sumersión que en los casos en los que se utiliza el estroncio de manera individual.

Si analizamos los casos de sumersión por separado, por un lado las sumersiones en agua dulce y por otro las sumersiones en agua salada, obtenemos que: en el análisis de las curvas ROC para los casos de sumersión en agua dulce, los parámetros con mayor capacidad para discriminar entre la muerte por sumersión frente a otras causas de muerte se encuentra en las concentraciones de estroncio en ambos ventrículos y en la diferencia de las concentraciones de hierro entre los ventrículos (VI-VD). Al utilizar estas variables en el análisis discriminante obtenemos que la determinación conjunta de estroncio en ambos ventrículos permitió una correcta identificación en el 46% de los casos de sumersión en agua dulce, mientras que la diferencia en las concentraciones de hierro entre (VI-VD) clasificó correctamente un 67% de estos casos. La determinación conjunta del estroncio en ambos ventrículos y la diferencia en las concentraciones de Fe entre VI y VD permitió una identificación correcta del 50% de los casos de sumersión en agua dulce, mejorando así la capacidad diagnóstica de las muertes por sumersión en estos casos que cuando sólo se utiliza la determinación del estroncio en ambos ventrículos.

En los casos de sumersión en agua salada, observamos en el análisis de las curvas ROC que las concentraciones sanguíneas de estroncio en ambos ventrículos y en sangre periférica mostraron la mayor capacidad discriminante. Resultados similares se obtuvieron con las concentraciones séricas de magnesio. En el análisis discriminante, las concentraciones de estroncio en todas las localizaciones clasificaron correctamente el 79% de los casos de sumersión en agua salada, mientras que su determinación junto con las concentraciones séricas de magnesio y cloro en todas las localizaciones y las concentraciones de sodio en VD, el porcentaje de clasificación correcta disminuyó a un 73%. Por tanto, la determinación conjunta del estroncio con otros elementos traza no mejoró significativamente la correcta clasificación de los casos de sumersión en agua salada, siendo más efectiva la utilización individual del estroncio como marcador de sumersión en agua salada.

Del análisis discriminante hay que destacar la alta capacidad predictiva negativa de los elementos traza para excluir las muertes producidas por sumersión, tanto evaluando los casos de sumersión de manera conjunta como analizando sumersión en agua salada y sumersión en agua dulce separadamente. El porcentaje correcto de clasificación en otras causas de muerte fue en la mayoría de los elementos traza superior al 93%, lo que significa que, de los 73 fallecidos por causas distintas a la sumersión, menos de 5 de ellos estuvieron mal clasificados, mostrando unas concentraciones de los elementos traza comparables a las obtenidas en los fallecidos por sumersión.

6. CONCLUSIONES

- 1.- Los resultados obtenidos en esta investigación, junto con los aportados por otros autores, ponen de manifiesto que el análisis post-mortem de parámetros bioquímicos y marcadores biológicos moleculares en los casos de sumersión es complicado debido a la implicación conjunta de diferentes procesos, tales como el fallo circulatorio y metabólico, las lesiones alveolares pulmonares y la hipoxia.

- 2.- Nuestros resultados ponen de manifiesto una correlación positiva entre las concentraciones de los elementos traza en el agua de sumersión y las concentraciones en sangre, lo que sugiere la existencia de una difusión post-mortem desde el agua de sumersión a la circulación sanguínea. Sin embargo, ya que esta correlación desaparece en tiempos de sumersión inferiores a 72 horas, sugerimos la utilización de los elementos traza en cadáveres sumergidos menos de 3 días.

- 3.- Elementos traza como el estroncio, magnesio, cloro, calcio y sodio muestran valores significativamente más altos al comparar los casos de sumersión con el resto de causas de muerte.

- 4.- En los casos de sumersión en agua salada, las concentraciones de estroncio, magnesio, calcio, sodio y cloro son significativamente más altas en ventrículo izquierdo que en derecho como resultado de la aspiración de agua hipertónica con altas concentraciones de estos elementos.

- 5.- La hemodilución es evidente por los niveles de hierro y urea significativamente más altos en ventrículo derecho que en ventrículo izquierdo en los casos de sumersión en agua salada, y por los niveles más altos de magnesio y creatinina en ventrículo derecho comparado con el ventrículo izquierdo en los casos de sumersión en agua dulce.

6.- En los casos de sumersión en agua salada, los niveles sanguíneos de estroncio se confirman como el mejor parámetro para su diagnóstico, aunque otros elementos traza pueden también ser útiles, como es el caso de las concentraciones séricas de magnesio y cloro.

7.- En el caso de las sumersiones en agua dulce, la determinación conjunta de estroncio y otros marcadores bioquímicos, especialmente el hierro, puede aumentar la posibilidad de un diagnóstico correcto, siendo especialmente útiles los elementos traza en estos casos.

8.- En la determinación analítica del estroncio recomendamos el método utilizado por Azparren (espectrometría de absorción atómica con cámara de grafito) frente al propuesto por Piette (espectrometría de emisión atómica usando una fuente de plasma de acoplamiento inductivo) ya que el pretratamiento al que deben ser sometidas las muestras de sangre es más limpio, menos laborioso y mucho más económico.

9.- La utilización de elementos traza es una buena herramienta complementaria para el diagnóstico de sumersión, pudiendo aportar además información adicional para la reconstrucción de los hechos, aunque nunca pueden sustituir a la información obtenida de hallazgos morfológicos (macroscópicos e histológicos), circunstancias de la muerte así como la utilización de otras técnicas complementarias.

10.- La investigación de nuevos métodos y parámetros para un correcto diagnóstico post-mortem de las muertes por sumersión y la reconstrucción de los hechos sigue siendo una prioridad en patología forense y la cooperación con distintos profesionales especializados en diferentes técnicas complementarias puede ayudar a conseguir dicho objetivo.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Abdallah AM, Hassan SA, Kabil MA, Ghanim AEE. Serum strontium estimation as a diagnostic criterion of the type of drowning water. *Forensic Sci. Int.* 1985; 28: 47-52.
2. Abe S, Suto M, Nakamura H, Gunji H, Hiraiwa K, Suzuki T, Itoh T, Kochi H, Hoshiai G. A novel PCR method for identifying plankton in cases of death by drowning. *Med. Sci. Law.* 2003; 43: 23–30.
3. An JL, Ishida Y, Kimura A. Forensic application of intrarenal aquaporin-2 expression for differential diagnosis between freshwater and salwater drowning. *Int. J. Leg. Med.* 2010; 124: 99-104.
4. An JL, Ishida Y, Kimura A, Kondo T. Immunohistochemical examination of intracerebral aquaporin-4 expression and its application for differential diagnosis between freshwater and saltwater drowning. *Int. J. Leg. Med.* 2011; 125: 59–65.
5. Anderson JV, Millar ND, O'Hare JP. Atrial natriuretic peptide: Physiological release associated with natriuresis during water immersion in man. *Clinical Science.* 1986; 73: 319-322.
6. Aoyagi M, Iwadate K, Fukui K, Abe S, Sakai K, Maebashi K. A novel method for the diagnosis of drowning by detection of *Aeromonas sobria* with PCR method. *Leg. Med. (Tokyo).* 2009; 11: 257-259.
7. Auer A. Qualitative diatom analysis as a tool to diagnose drowning. *Am. J. Forensic Med. Pathol.* 1991; 12: 213-218.

8. Avis SP. Suicidal drowning. *J. Forensic Sci.* 1993; 38: 1422-1426.
9. Azparren J, De la Rosa I, Sancho M. Biventricular measurement of blood strontium in real cases of drowning. *Forensic Sci. Int.* 1994; 69: 139-148.
10. Azparren JE, Vallejo G, Reyes E, Herranz A, Sancho M. Study of the diagnostic value of strontium, chloride, haemoglobin and diatoms in immersion cases. *Forensic Sci. Int.* 1998; 91: 123-132.
11. Azparren JE, Ortega A, Bueno H, Andreu M. Blood strontium concentration related to the length of the agonal period in seawater drowning cases. *Forensic Sci. Int.* 2000; 108: 51-60.
12. Azparren JE, Fernández-Rodríguez A, Vallejo G. Diagnosing death by drowning in fresh water using blood strontium as an indicator. *Forensic Sci. Int.* 2003; 137: 55-59.
13. Azparren JE, Cubero C, Perucha E, Martínez P, Vallejo G. Comparison between lung weight and blood strontium in bodies found in seawater. *Forensic Sci. Int.* 2007a; 168: 128-132.
14. Azparren JE, Perucha E, Martínez P, Muñoz R, Vallejo G. Factors affecting the strontium absorption in drownings. *Forensic Sci. Int.* 2007b; 168: 138-142.
15. Babin RW, Graves NN, Rose EF. Temporal bone pathology in drowning. *Am. J. Otolaryngol.* 1982; 3: 168-173.

16. Barbieri S, Feltracco P, Delantone M, Spagna A, Michieletto E, Bortolato A, Ori C. Helicopter rescue and prehospital care for drowning children: two summer season case studies. *Minerva Anesthesiol.* 2008; 74: 703-707.
17. Bartels H, Böhmer M. Micro-determination of creatinine. *Clin. Chim. Acta.* 1971; 32: 81-85.
18. Beeck EF, Branche CM, Szpilman D, Modell JH, Bierens JJ. A new definition of drowning: Towards documentation and prevention of a global public health problem. *Bulletin WHO* 2005; 83: 853-856.
19. Betz P, Nerlich A, Penning R, Einsenmenger W. Alveolar macrophages and the diagnosis of drowning. *Forensic Sci. Int.* 1993; 62: 217-224.
20. Betz P, Beier G, Einsenmenger W. Pulmonary giant cells and traumatic asphyxia. *Int. J. Legal. Med.* 1994; 106: 258-261.
21. Betz P, Tubel J, Einsenmenger W. Immunohistochemical analysis of markers of different macrophage phenotypes and their use for forensic wound age estimation. *Int. J. Leg. Med.* 1995; 107: 197-200.
22. Bierens JJ, Knape JT, Gelissen HP. Drowning. *Curr. Opin. Crit. Care.* 2002; 8: 578-586.
23. Blanco Pampín J, García Rivero SA, Tamayo NM, Hinojal Fonseca R. Gastric mucosa lesions in drowning: its usefulness in forensic pathology. *Leg. Med. (Tokyo).* 2005; 7: 89-95.

24. Blum C, Shield J. Toddler drowning in domestic swimming pools. *Injury Prevention*. 2000; 6: 288-290.
25. Bohnert M, Ropohl D, Pollak S. Zur rechtsmedizinischen Bedeutung des Flüssigkeitsgehaltes in den keilbeinhöhlen. *Arch. Criminol*. 2002; 209: 158-164.
26. Bradley T, Dixon J, Easthope R. Unexplained fainting, near drowning and unusual seizures in childhood: screening for long QT syndrome in New Zealand families. *N. Z. Med. J*. 1999; 112: 299–302.
27. Bray M. Chemical estimation of fresh water immersion intervals. *Am. J. Forensic Med. Pathol*. 1985; 6: 133-139.
28. Brouardel P, Vibert CH. Etude sur la submersion. *Annales d'Hygiène. Médecine Légale* 1880; 3-4: 452–470.
29. Browne MI, Lewis EL, Stark AD. Unintentional drowning among New York State residents 1988-1994. *Public Health reports* 2003; 118: 448-458.
30. Burtis CA, Ashwood ER. *Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry* (5^a ed.). WB Saunders Company: St. Louis, 2001.
31. Byard RW, Houldsworth G, James RA, Gilbert JD. Characteristic features of suicidal drownings. A 20 year study. *Am. J. Forensic Med. Pathol*. 2001; 22: 134-138.

32. Byard RW, Cains G, Simpson E, Eitzen D, Tsokos M. Drowning, haemodilution, haemolysis and staining of the intima of the aortic root. Preliminary observations. *J. Clin. Forensic Med.* 2006; 13: 121-124.
33. Canturk N, Es Iyok B, Ozkara E, Canturk G, Bulent Ozata A, Fatih Yavuz M. Medico-legal child deaths in Istanbul: data from the Morgue Department. *Pediatr. Int.* 2007; 49: 88-93.
34. Carrara M. Untersuchungen über den osmotischen druck und die spezifische elektrisches leitfähigkeit des blutes bei der fäulnis. *Vierteljahrsschr Gerichtl Med.* 1902; 24: 236.
35. Carter N, Ali F, Green MA. Problems in the interpretation of hemorrhage into neck musculature in cases of drowning. *Am. J. Forensic Med. Pathol.* 1998; 19: 223-225.
36. Chardez D, Lambert J. Protozoaires ciliés et Thatatologie. *Forensic Sci. Int.* 1985; 28: 83-101.
37. Chen S, Huang Z, Wang L, Jiang T, Wu B, Ma H. Effect of seawater soaking on corneal epidermis inury. *Yan Ke Xue Bao.* 2005; 21: 149-152.
38. Chen JH, Michiue T, Ishikawa T, Maeda H. Difference in molecular pathology of natriuretic peptides in the myocardium between acute asphyxial and cardiac deaths. *Leg. Med. (Tokyo).* 2012; 14: 177-182.
39. Chiodi V, Gilli R, Puccini C, Portigliatti-Barbos M, Fallani M, De Bernardi A. *Manuale di Medicina Legale.* Dr. F. Vallardi: Milano, 1978.

40. Choi G, Kopplin LJ, Tester DJ, Will ML, Haglund CM, Ackerman MJ. Spectrum and frequency of cardiac channel defects in swimming-triggered arrhythmia syndromes. *Circulation*. 2004; 110: 2119-2224.
41. Clesson A, Svensson L, Silfverstolpe J, Herlitz J. Characteristics and outcome among patients suffering out-of-hospital cardiac arrest due to drowning. *Resuscitation* 2008; 76: 381-387.
42. Coe JI. Postmortem chemistry update. Emphasis on forensic application. *Am. J. Forensic Med. Pathol.* 1993; 14: 91-117.
43. Concheiro Carro L, Suárez Peñaranda JM. Asfixias Mecánicas. En: Gisbert Calabuig JA. *Medicina Legal y Toxicología* (5ª ed.). Salvat: Barcelona, 1998.
44. Concheiro Carro L, Suárez Peñaranda JM. Asfixias mecánicas. En: Villanueva E. *Medicina Legal y Toxicología* (60ª ed.). Masson: Barcelona, 2004.
45. Copeland AR. Homicide in childhood: The Metro-Dade County experience from 1956 to 1982. *Am. J. Forensic Med. Pathol.* 1985a; 6: 21-24.
46. Copeland AR. An assessment of lung weights in drowning cases. The Metro Dade County experience from 1978 to 1982. *Am. J. Forensic Med. Pathol.* 1985b; 6: 301-304.
47. Copeland AR. Homicidal drowning. *Forensic Sci. Int.* 1986; 31: 247-252.
48. Corin G, Stockis E. Le diagnostic médico-légale de l'asphyxie par submersion. *Ann. Soc. Méd. Légale Belg.* 1909; 20: 14-23.

49. Corin G. A propos du diagnostic de la mort par submersion. *Ann. Soc. Méd. Légale Belg.* 1909; 20: 375-377.
50. Davies SJ, Gaze DC, Collinson PO. Investigation of cardiac troponins in postmortem subjects: comparing antemortem and postmortem levels. *Am. J. Forensic Med. Pathol.* 2005; 26: 213–215.
51. Davis JH. Autopsy findings in victims of drowning. En: Modell JH. *The Pathophysiology and Treatment of Drowning and Near-Drowning*. Charles C. Thomas: Illinois, 1971.
52. De Bernardi A, Marras G, Turletti M, Lubinu F, Sini MG. *Elementi di Patologia Medico Legale*. A. Delfino: Roma, 1981.
53. De La Grandmaison GL, Clairand I, Durigon M. Organ weight in 684 adult autopsies: New tables for a caucasoid population. *Forensic Sci. Int.* 2001; 119: 149-154.
54. De La Grandmaison GL, Leterreux M, Lasseugnette K, Alvarez JC, De Mazancourt Ph, Durigon M. Study of the diagnostic value of iron in fresh water drowning. *Forensic Sci. Int.* 2006; 157: 117-120.
55. De Nicola LK, Falk JL, Swanson ME, Gayle MO, Kissoon N. Submersion injuries in children and adults. *Crit. Care Clin.* 1997; 13: 477-502.
56. Diekema DS, Quan L, Holt VL. Epilepsy as a risk factor for submersion injury in children. *Pediatrics* 1993; 91: 612-616.

57. DiMaio VJ, DiMaio D. Asphyxia. In: Geberth VJ, series editor. *Forensic pathology*, 2nd edn. Boca Raton, FL: CRC Press, 2001; 229–277.
58. Dressler J, Mueller E. High thyroglobulin (Tg) concentrations in fatal traumatic brain injuries. *Am. J. Forensic Med. Pathol.* 2006; 27: 280–282.
59. Driscoll TR, Harrison JA, Steenkamp M. Review of the role of alcohol in drowning associated with recreational aquatic activity. *Inj. Prev.* 2004; 10: 107-113.
60. Durigon M. *Pathologie médico-légale*. Masson Edit. Paris. 1988.
61. Edston E, Eriksson O, Van Hage M. Mast cell tryptase in postmortem serumreference values and confounders. *Int. J. Leg. Med.* 2007; 121: 275–280.
62. Eich C, Bräuer A, Kettler D. Recovery of a hypothermic drowned child after resuscitation with cardiopulmonary bypass followed by prolonged extracorporeal membrane oxygenation. *Resuscitation* 2005; 67: 145-148.
63. Eich C, Bräuer A, Timmermann A, Schwarz SK, Russo SG, Neubert K, Graf BM, Aleksic I. Outcome of 12 drowned children with attempted resuscitation on cardiopulmonary bypass: an analysis of variables based on the "Utstein Style for Drowning". *Resuscitation.* 2007; 75: 42-52.
64. Esiyok B, Balci Y, Ozbay M. Bodies recovered from wells, sewerage systems and pits: what is the cause of death? *Ann. Acad. Med. Singapore.* 2006; 35: 547-551.

65. Fabiny DL, Ertinghausen G. Automated reaction-rate method for determination of serum creatinine with the CentriChem. *Clin. Chem.* 1971; 17: 696-700.
66. Fields AI. Near drowning in the paediatric population. *Crit. Care Clin.* 1992; 8: 113-129.
67. Fleetham JA, Munt PW. Near-drowning in Canadian waters. *Can. Med. Assoc. J.* 1978; 118: 914-917.
68. Foged N. Diatoms and drowning. Once more. *Forensic Sci. Int.* 1983; 21: 153-159.
69. Fornes P, Pepin G, Heudes D, Lecomte D. Diagnosis of drowning by combined computer-assisted histomorphometry of lungs with blood strontium determination. *J. Forensic Sci.* 1998; 43: 772-776.
70. Forrest AR. Obtaining samples at post mortem examination for toxicological and biochemical analyses. *J. Clin. Pathol.* 1993; 46: 292-296.
71. Freimuth HC, Swann HE. Plasma specific gravity changes in sudden deaths. *Arch. Pathol.* 1955; 59: 214-218.
72. Fujita MQ, Zhu BL, Ishida K, Quan L, Oritani S, Maeda H. Serum C-reactive protein levels in postmortem blood – an analysis with special reference to the cause of death and survival time. *Forensic Sci. Int.* 2002; 130: 160-166.
73. Fukui Y, Hata M, Takahashi S, Matsubara K. A new method for detecting diatoms in human organs. *Forensic Sci. Int.* 1980; 16: 67-74.

74. Funayama M, Mimasaka S, Nata M, Hashiyada M, Yajima Y. Diatom numbers around the continental shelf break. *Am. J. Forensic Med. Pathol.* 2001; 22: 236-238.
75. Fundacion Mapfre. Gerencia de Riesgos. 2009; N.º 104: mayo/agosto [consultado 1 Sep 2011]. Disponible en:
<http://www.mapfre.com/fundacion/html/revistas/gerencia/n104/estud 02.htm>
76. Gabbe BJ, Finch CF, Cameron PA, Williamson OD. Incidence of serious injury and death during sport and recreation activities in Victoria, Australia. *Br. J. Sports Med.* 2005, 39: 573-577.
77. Gamero JJ, Romero JL, Arufe MI, Vizcaya MA, Balanza E. A study among the population of Sevilla of death due to submersion. *Am. J. Forensic Med. Pathol.* 1997; 18: 70-74.
78. Gardner E. Mechanism of certain forms of sudden death in medico-legal practice. *Medico-Legal and Criminological Review* 1942; 10: 120-133.
79. Gettler AO. A method for the determination of death by drowning. *JAMA* 1921; 77: 1650-1652.
80. Giammona ST, Modell JH. Drowning by total immersion: effects on pulmonary surfactant of distilled water, isotonic saline and sea water. *Am. J. Dis. Child* 1967; 114: 612-616.
81. Giersten JC. Drowning while under the influence of alcohol. *Nord. Med.* 1970; 83: 523-527.

82. Gisbert Calabuig JA, Verdú Pascual FA. Autopsia médico-legal. En: Gisbert Calabuig JA. Medicina Legal y Toxicología. Masson: Barcelona, 1998.
83. Gisbert Calabuig JA, Verdú Pascual FA. Accidentes de tráfico. En: Gisbert Calabuig JA. Medicina Legal y Toxicología. Masson: Barcelona, 1998.
84. Gisbert Calabuig JA, Villanueva E. Procesos destructores del cadáver. En: Gisbert Calabuig JA. Medicina Legal y Toxicología. Masson: Barcelona, 2004.
85. Golden FC, Tipton MJ, Scott RC. Immersion, near-drowning and drowning. *Brit. J. Anesth.* 1997; 79: 214-225.
86. Gordon I, Shapiro HA, Berson SD. Forensic Medicine. En: A Guide to Principles. (3ª ed.). Churchill Livingstone: Edinburgh, 1988.
87. Gorniak JM, Jenkins AJ, Felo JA, Balraj E. Drug prevalence in drowning deaths in Cuyahoga County, Ohio. A ten year retrospective study. *Am. J. Forensic Med. Pathol.* 2005; 26: 240-243.
88. Gresham GA. Atlas de Medicina Forense. Científico- Médica: Barcelona, 1977.
89. Gulliver P, Begg D. Usual water-related behaviour and 'near-drowning' incidents in young adults. *Aust. N. Z. J. Public Health.* 2005; 29: 238-243.
90. Hadley JA, Fowler DR. Organ weight effects of drowning and asphyxiation on the lungs, liver, brain, heart, kidneys and spleen. *Forensic Sci. Int.* 2003; 137: 239-246.

91. Haffner HT, Graw M, Erdelkamp J. Spleen findings in drowning. *Forensic Sci. Int.* 1994; 66: 95-104.
92. Hans P, Albert A, Franssen C, Born J. Improved outcome prediction based on CSF extrapolated creatine kinase BB isoenzyme activity and other risk factors in severe head injury. *J. Neurosurg.* 1989; 71, 54-58.
93. Hartman K, Luterotti S, Osswald HF, Oehme M, Meier PC, Ammann D, Simon W. *Mikrochimica Acta (Wien)* 1978; 2: 235.246.
94. Hasibeder W, Schobersberger W. Near drowning. En: Søreide E, Grande CM. *Prehospital trauma care.* Marcel Dekker: New York, 2001.
95. Hasibeder WR. Drowning. *Curr. Opin. Anaesthesiol.* 2003; 16: 139-146.
96. Hayashi T, Ishida Y, Mizunuma S, Kimura A, Kondo T. Differential diagnosis between freshwater drowning and saltwater drowning based on intrapulmonary aquaporin-5 expression. *Int. J. Legal Med.* 2009; 123: 7-13.
97. He F, Huang D, Liu L, Shu X, Yin H, Li X. A novel PCR-DGGE-based method for identifying plankton 16S rDNA for the diagnosis of drowning. *Forensic Sci. Int.* 2008; 176: 152-156.
98. Hendey NI. The diagnostic value of diatoms in drowning. *Med. Sci. Law* 1973; 13: 23-34.
99. Hotmar P. Nachweis von Flüssigkeit in den Nasennebenhöhlen als mögliches diagnostisches Zeichen des Ertrinkungstodes. *Arch. Criminol.* 1996; 198: 89-94.

100. Hull DS, Green K, Hampstead D. Corneal endothelium following immersion of eyes in water. *Arch. Ophthalmol.* 1985; 103: 437-439.
101. Hwang V, Shofer FS, Durbin DR. Prevalence of traumatic injuries in drowning and near drowning in children and adolescents. *Arch. Pediatr. Adolesc. Med.* 2003; 157: 50-53.
102. Ibsen LM, Koch T. Submersion and asphyxial injury. *Crit. Care Med.* 2002; 30: 402-408.
103. Icard S. La preuve de la mort par submersion suivant qu'elle a eu lieu dans une rivière ou dans la mer. *Rev. Pathol. Comparée Hyg. Gen.* 1932; 32: 559-571.
104. Idris AH, Berg RA, Bierens J. Recommended guidelines for uniform reporting of data from drowning: The Utstein style. *Resuscitation* 2003; 59: 45-57.
105. Ishida K, Zhu BL, Quan L, Fujita MQ, Maeda H. Pulmonary surfactant associated protein A levels in cadaveric sera with reference to the cause of death. *Forensic Sci. Int.* 2000; 109: 125-133.
106. Ishida K, Zhu BL, Maeda H. A quantitative RT-PCR assay of surfactant-associated protein A1 and A2 mRNA transcripts as a diagnostic tool for acute asphyxial death. *Leg. Med. (Tokyo).* 2002; 4: 7-12.
107. Ishikawa T, Zhu BL, Li DR, Zhao D, Michiue T, Maeda H. Immunohistochemical investigation of ubiquitin and myoglobin in the kidney in medicolegal autopsy cases. *Forensic Sci. Int.* 2007; 171: 136-141.

108. Ishikawa T, Hamel M, Zhu BL, Li DR, Zhao D, Michiue T, Maeda H. Comparative evaluation of postmortem serum concentrations of neopterin and C-reactive protein. *Forensic Sci. Int.* 2008a; 179: 135–143.
109. Ishikawa T, Quan L, Li DR, Zhao D, Michiue T, Hamel M, Maeda H. Postmortem biochemistry and immunohistochemistry of adrenocorticotrophic hormone with special regard to fatal hypothermia. *Forensic Sci. Int.* 2008b; 179: 147–151.
110. Ishikawa T, Michiue T, Quan L, Zhao D, Komatsu A, Bessho Y, Maeda H. Morphological and functional alterations in the adenohypophysis in cases of brain death. *Leg. Med. (Tokyo)*. 2009; 11: 234–237.
111. Iyengar GU, Kolimer WE, Bowen HJM. *The Elemental Composition of Human Tissues and Body Fluids*. Verlag Chemie: New York, 1978.
112. Jaffé M. Ueber den Niederschlag, welchen Pikrinsäure in normalem Harn erzeugt und über eine neue Reaktion des Kreatinins. *Z. Physiol. Chem.* 1886; 10: 391-400.
113. Janssen W. Drowning-Changes to corpses found in water. En: *Forensic Histopathology*. Springer-Verlag: New York, 1984.
114. Jeanmonod R, Staub CH, Mermillod B. The reliability of cardiac haemodilution as a diagnostic test of drowning. *Forensic Sci. Int.* 1992; 52: 171-180.

115. Kakizaki E, Takahama K, Seo Y, Kozawa S, Sakai M, Yukawa N. Marine bacteria comprise a possible indicator of drowning in seawater. *Forensic Sci. Int.* 2008; 176: 236-247.
116. Kakizaki E, Kozawa S, Sakai M, Yukawa N. Bioluminescent bacteria have potential as a marker of drowning in seawater: two immersed cadavers retrieved near estuaries. *Leg. Med. (Tokyo)*. 2009a; 11: 91-96.
117. Kakizaki E, Kozawa S, Tashiro N, Sakai M, Yukawa N. Detection of bacterioplankton in immersed cadavers using selective agar plates. *Leg. Med. (Tokyo)*. 2009b; 11: 350-353.
118. Kakizaki E, Kozawa S, Sakai M, Yukawa N. Numbers, Sizes, and Types of Diatoms Around Estuaries for a Diatom Test. *Am. J. Forensic Med. Pathol.* 2011; 32: 269-274.
119. Kamada S, Seo Y, Takahama K. A sandwich enzyme immunoassay for pulmonary surfactant protein D and measurement of its blood levels in drowning victims. *Forensic Sci. Int.* 2000; 109: 51-63.
120. Kane M, Fukunaga K, Maeda H, Nishi K. The detection of picoplankton 16S rDNA in cases of drowning. *Int. J. Legal Med.* 1996; 108: 323-326.
121. Karkola K, Neittaanmäki H. Diagnosis of drowning by investigation of left heart blood. *Forensic Sci. Int.* 1981; 18: 149-153.
122. Kelemen G. Temporal bone findings in case of salt water drowning. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.* 1983; 92: 134-136.

123. Kido M, Hitosugi M, Yokoyama T, Tokudome S. Sudden death while bathing. *Nippon Rinsho*. 2005; 63: 1239-1242.
124. Knight B. Immersion deaths. En: *Forensic Pathology* (2^a ed.). Arnold: Londres, 1996.
125. Kobayashi M, Yamada Y, Zhang WD, Itakura Y, Nagao M, Takatori T. Novel detection of plankton from lung tissue by enzymatic digestion method. *Forensic Sci. Int.* 1993; 60: 81-90.
126. Kringsholm B, Filskov A, Kock K. Autopsied cases of drowning in Denmark 1987-1989. *Forensic Sci. Int.* 1991; 52: 85-92.
127. Lachica E, Villanueva E, Luna A. Comparison of different techniques for the postmortem diagnosis of myocardial infarction. *Forensic Sci. Int.* 1988; 38: 21-26.
128. Lawler W. Bodies recovered from water: A personal approach and consideration of difficulties. *J. Clin. Pathol.* 1992; 45: 654-659.
129. Layon AJ, Modell JH. Drowning and near-drowning. En: Tinker J, Zapol WM. *Care of the Critically Ill Patient*. Springer-Verlag: London, 1992.
130. Layon AJ, Modell JH. Drowning. *Anesthesiology*. 2009; 110: 1390-1401.
131. Lehmann K, Beuthin A. Der Nachweis von Calciumlignosulfonat im Blut und in den Organpreßsäften ertränkter Ratten als Zeichen vitalen Ertrinkens. *Z. Rechtsmed.* 1971; 68: 11-16.

132. Li DR, Zhu BL, Ishikawa T, Zhao D, Michiue T, Maeda H. Postmortem serum protein S100B levels with regard to the cause of death involving brain damage in medicolegal autopsy cases. *Leg. Med. (Tokyo)*. 2006a; 8: 71–77.
133. Li DR, Zhu BL, Ishikawa T, Zhao D, Michiue T, Maeda H. Immunohistochemical distribution of S-100 protein in the cerebral cortex with regard to the cause of death in forensic autopsy. *Leg. Med. (Tokyo)*. 2006b; 8: 78–85.
134. Li DR, Michiue T, Zhu BL, Ishikawa T, Quan L, Zhao D, Yoshida C, Chen JH, Wang Q, Komatsu A, Azuma Y, Maeda H. Evaluation of postmortem S100B levels in the cerebrospinal fluid with regard to the cause of death in medicolegal autopsy. *Leg. Med. (Tokyo)*. 2009a; 11: 273–275.
135. Li DR, Quan L, Zhu BL, Ishikawa T, Michiue T, Zhao D, Yoshida C, Chen JH, Wang Q, Komatsu A, Azuma Y, Maeda H. Evaluation of postmortem calcium and magnesium levels in the pericardial fluid with regard to the cause of death in medicolegal autopsy. *Leg. Med. (Tokyo)*. 2009b; 11: 276–278.
136. Löhr B, El-Samalouti V, Junge W, Maatouk H, Halabi A, Fahle A, Bossert-Reuther S, Jung M, Berding C, Domke I. Reference Range Study for Various Parameters on Roche Clinical Chemistry Analyzers. *Clin. Lab*. 2009; 55: 465–471.
137. Locali RF, Almeida MD, Oliveira-Júnior IS. Use of the histopathology in the differential diagnosis of drowning in fresh and salty water: an experimental model establishment in rats. *Acta Cir. Bras*. 2006; 21: 203–206.

138. Longhi L, Paterno R. Therapeutic hypothermia. *Minerva Anesthesiol.* 2009; 75: 353-354.
139. Lorente JA, Hernández-Cueto C, Villanueva E. Post mortem stability of the rat atrial natriuretic peptide in blood and atrial tissue. *Rev. Esp. Fisiol.* 1989; 45: 127-130.
140. Lorente JA, Hernández-Cueto C, Villanueva E. Utilidad de los parámetros hematológicos métrico-ponderales e iónicos en el diagnóstico de la sumersión vital. *Riv. Ital. Med. Legale.* 1990a; 12: 803-811.
141. Lorente JA, Hernández-Cueto C, Villanueva E, Luna JD. The usefulness of lung surfactant phospholipids (LSPs) in the diagnosis of drowning. *J. Forensic Sci.* 1990b; 35: 1367-1372.
142. Lorente JA, Villanueva E, Hernández-Cueto C, Luna JD. Plasmatic levels of atrial natriuretic peptide (ANP) in drowning. A pilot study. *Forensic Sci. Int.* 1990c; 44: 69-75.
143. Lorente JA, Lorente M, Villanueva E. Post mortem stability of lung surfactant phospholipids. *J. Forensic Sci.* 1992; 3: 1341-1345.
144. Lucas J, Goldfeder LB, Gill JR. Bodies found in the waterways of New York City. *J. Forensic Sci.* 2002; 47: 137-141.
145. Lucci A, Cirnelli A. A microbiological test for the diagnosis of death by drowning. *Forensic Sci. Int.* 2007; 168: 34-36.

146. Ludes B, Coste M. Diatomées et Médecine Légale. En: Applications de la recherche des Diatomées au diagnostic de la submersion vitale. Médicales Internationales: Paris, 1996.
147. Luna A, Villanueva E, Jiménez G, Luna JD. Evolución post-mortem de las enzimas GOT, GPT, CK, LDH e isoenzimas en el líquido pericárdico. Rev. Esp. Med. Legal. 1980a; 24-25: 83-84.
148. Luna A, Villanueva E, Luna JD, Jiménez G. Evolución post-mortem de proteínas totales, fracciones proteicas urea y creatinina en el líquido pericárdico. Zacchia. 1980b; 4: 3-12.
149. Luna A, Villanueva E, Castellano M, Jiménez G. The determination of CK, LDH and its isoenzymes in pericardial fluid and its application to the postmortem diagnosis of myocardial infarction. Forensic Sci. Int. 1982; 19: 85-91.
150. Luna A, Carmona A, Villanueva E. The postmortem determination of CK isoenzymes in the pericardial fluid in various causes of death. Forensic Sci. Int. 1983; 22: 23-30.
151. Luna A. Is postmortem biochemistry really useful? Why is it not widely used in forensic pathology? Leg. Med. (Tokyo). 2009; 11: 27-30.
152. Lunetta P, Penttila A, Hallfors G. Scanning and transmission electron microscopical evidence of the capacity of diatoms to penetrate the alveolo-capillary barrier in drowning. Int. J. Legal Med. 1998; 111: 229-237.

153. Lunetta P, Penttilä A, Sajantila A. Circumstances and macropathologic findings in 1590 consecutive cases of bodies found in water. *Am. J. Forensic Med. Pathol.* 2002; 23: 371-376.
154. Lunetta P, Modell JP. Macroscopical, microscopical and laboratory findings in drowning victims. En: Tsokos M. *Forensic Pathology Reviews*. Humana Press: Totowa, 2005.
155. Lunt DW, Rode AG. Pathology of the human heart in Browning. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 1987; 111: 939-942.
156. Maeda H. Pathophysiochemistry of acute death: an approach to evidencebased assessment in forensic pathology. *Nihon Hoigaku Zasshi.* 2004; 58: 121–129.
157. Madea B, Musshoff F. Postmortem biochemistry. *Forensic Sci. Int.* 2007; 165: 165-171.
158. Maeda H, Zhu BL, Ishikawa T, Quan L, Michiue T. Significance of postmortem biochemistry in determining the cause of death. *Leg Med (Tokyo).* 2009a; 11: 46–49.
159. Maeda H, Michiue T, Zhu BL, Ishikawa T, Quan L. Analysis of cardiac troponins and creatine kinase MB in cerebrospinal fluid in medicolegal autopsy cases. *Leg. Med. (Tokyo).* 2009b; 11: 266–268.
160. Maeda H, Zhu BL, Ishikawa T, Michiue T. Forensic molecular pathology of violent deaths. *Forensic Sci. Int.* 2010; 203: 83-92.

161. Maeda H, Ishikawa T, Michiue T. Forensic biochemistry for functional investigation of death: Concept and practical application. *Leg. Med. (Tokyo)*. 2011; 13: 55–67.
162. Maraschi F, Sturini M, Speltini A, Orio F, Profumo A, Pierucci G. Silicon determination in human ventricular whole blood: a possible marker of drowning. *Anal. Biochem.* 2012; 426: 142-146.
163. Matoba K, Murakami M, Hayakawa A, Terazawa K. Application of electrolyte analysis of pleural effusion to diagnosis of drowning. *Leg. Med. (Tokyo)*. 2012; 14: 134-139.
164. Mazzachi BC, Peake MJ, Ehrhardt V. Reference Range and Method Comparison Studies for Enzymatic and Jaffé Creatinine Assays in Plasma and Serum and Early Morning Urine. *Clin. Lab.* 2000; 46: 53-55.
165. Meinck F, Stooff H, Kohlschütter H. *Les Eaux Residuaires Industrielles*. Ed. Masson. Paris, New York, Barcelone, Milan. 1977.
166. Michaud K, Augsburger M, Donzé N, Sabatasso S, Faouzi M, Bollmann M, Mangin P. Evaluation of postmortem measurement of NT-proBNP as a marker for cardiac function. *Int. J. Leg. Med.* 2008; 122: 415–420.
167. Michiue T, Sakurai T, Ishikawa T, Oritani S, Maeda H. Quantitative analysis of pulmonary pathophysiology using postmortem computed tomography with regard to the cause of death. *Forensic Sci. Int.* 2012; 220: 232-238.

168. Milne S, Cohen A. Secondary drowning in a patient with epilepsy. *BMJ*. 2006, 332: 775-776.
169. Mimasaka S, Ohtsu Y, Tsunenari S, Funayama M. Postmortem cytokine levels and severity of traumatic injuries. *Int. J. Leg. Med.* 2006; 120: 265–270.
170. Mishul'skii AM. The use of bacteriological analysis of the blood in the diagnosis of death by drowning. *Sud. Med. Ekspert.* 1990; 33: 26-28.
171. Miyazato T, Ishikawa T, Michiue T, Maeda H. Molecular pathology of pulmonary surfactants and cytokines in drowning compared with other asphyxiation and fatal hypothermia. *Int. J. Legal Med.* 2012; 126: 581-587.
172. Moar JJ. Drowning. Postmortem appearances and forensic significance. A case report. *S. Afr. Med. J.* 1983; 64: 792-795.
173. Modell JH, Gaub M, Moya F, Vestal B, Swarz H. Physiologic effects of near-drowning with chlorinated fresh water, distilled water and isotonic saline. *Anesthesiology*. 1966a; 27: 33-41.
174. Modell JH, Moya F. Effects of volume of aspirated fluid during chlorinated freshwater drowning. *Anesthesiology*. 1966b; 27: 662–672.
175. Modell JH, Moya F, Newby EJ, Ruiz BC, Showers AV. The effects of fluid volume in seawater drowning. *Ann. Intern. Med.* 1967; 67: 68–80.
176. Modell JH, Davis JH. Electrolyte changes in human drowning victims. *Anesthesiology*. 1969; 30: 414–420.

177. Modell JH. The pathophysiology and treatment of drowning and near-drowning. Ed. Springer. Springfield. 1971.
178. Modell JH, Graves SA, Ketover A. Clinical course of 91 consecutive near-drowning victims. *Chest*. 1976; 70: 231-238.
179. Modell JH. Drown versus near-drown: A discussion of definitions. *Crit. Care Med*. 1981; 9: 351-352.
180. Modell JH. Drowning. *New Eng. J. Med*. 1993; 328: 253-256.
181. Modell JH, Bellefleur M, Davis JH. Drowning without aspiration: Is this an appropriate diagnosis? *J. Forensic Sci*. 1999; 44: 1119-1123.
182. Modell JH, Idris AH, Pineda JA, Silverstein JH. Survival after prolonged submersion in freshwater in Florida. *Chest*. 2004; 125: 1948-1951.
183. Morild I. Pleural effusion in drowning. *Am. J. Forensic Med. Pathol*. 1995; 16: 253-256.
184. Moritz AR. Chemical methods for the determination of death by drowning. *Physiol. Rev*. 1944; 24:70-88.
185. Morte Tamayo N, Sibón Olano A, Pérez Cárceles MD. Histopathological findings in drowning. En: Blanco Pampin J, Salguero Villadiego M. *Practical Manual of Forensic Histopathology*. Nova Science Publishers: New York, 2012.

186. Möttönen M, Ravanko O. Nachweis des Todes durch Ertrinken mittels in Blut gefundener fremder Pflanzerelemente. *Z. Rechtsmed.* 1971; 68: 261–266.
187. Mukaida M, Kimura H, Takada Y. Detection of bathsalts in the lung of a baby drowned in a bathtub: A case report. *Forensic Sci. Int.* 1998; 93: 5-11.
188. Müller-Bardorff M, Hallermayer K, Schröder A, Ebert C, Borgya A, Gerhardt W, Remppis A, Zehelein J, Katus HA. Improved troponin T ELISA specific for cardiac troponin T isoform: assay development and analytical validation. *Clin. Chem.* 1997; 43: 458-466.
189. Mulligan-Smith D, Pepe PE, Branche CM. A seven-year statewide study of the epidemiology of pediatric drowning deaths. *Acad. Emerg. Med.* 2002; 9: 488-489.
190. Noble CS, Sharpe N. Drowning: its mechanism and treatment. *Can. Med. Assoc. J.* 1963; 89: 402-405.
191. Oehmichen M, Pedal I, Hohmann P. Diagnostic significance of myofibrillar degeneration of cardiocytes in forensic pathology. *Forensic Sci. Int.* 1990; 48: 163-173.
192. Oehmichen M, Hennig R, Meissner C. Near-drowning and clinical laboratory changes. *Leg. Med. (Tokyo)*. 2008; 10: 1-5.
193. Olshaker JS. Near drowning. *Environ. Emerg.* 1992; 10: 339-350.

194. Orłowski JP. Drowning, near-drowning and ice-water submersion. *Pediatr. Clin. North. Am.* 1987; 34: 75-91.
195. Orłowski J, Szpilman D. Drowning, rescue, resuscitation and reanimation. *Pediatr. Clin. N. Am.* 2001; 48: 627–646.
196. Osuna E, Perez-Carceles MD, Luna A, Pounder DJ. Efficacy of cerebro-spinal fluid biochemistry in the diagnosis of brain insult. *Forensic Sci. Int.* 1992; 52: 193–198.
197. Osuna E, Pérez-Cárceles MD, Vieira DN, Luna A. Distribution of biochemical markers in biologic fluids: application to the postmortem diagnosis of myocardial infarction. *Am. J. Forensic Med. Pathol.* 1998; 19, 123-128.
198. Papa L, Hoelle R, Idris A. Systematic review of definitions for drowning incidents. *Resuscitation.* 2005; 65: 255-264.
199. Peabody AJ. Diatoms and drowning. A review. *Med. Sci. Law.* 1980; 20; 254-261.
200. Pérez-Cárceles MD, Noguera J, Jiménez JL, Martínez P, Luna A, Osuna E. Diagnostic efficacy of biochemical markers in diagnosis post-mortem of ischaemic heart disease. *Forensic Sci. Int.* 2004; 28: 1–7.
201. Pérez-Cárceles MD, Sibón A, Vizcaya MA, Osuna E, Gómez-Zapata M, Luna A, Martínez-Díaz F. Histological findings and immunohistochemical surfactant protein A (SP-A) expression in asphyxia: Its application in the diagnosis of drowning. *Histol. Histopathol.* 2008a; 23: 1061-1068.

202. Pérez-Cárceles MD, Sibón A, Gil Del Castillo ML, Vizcaya MA, Osuna E, Casas T, Romero JL, Luna A. Strontium levels in different causes of death: diagnostic efficacy in drowning. *Biol. Trace Elem. Res.* 2008b; 126: 27–37.
203. Pesce AJ, Kaplan LA. *Methods in clinical chemistry*. CV Mosby Company: St. Louis, 1987.
204. Piette M, Timperman J, Parisis N. Serum strontium estimation as a medico-legal diagnostic indicator of drowning. *Med. Sci. Law.* 1989; 29: 162-171.
205. Piette M. Strontium as a marker for drowning: When is it useful? *Police Surgeon.* 1992; 42: 17-18.
206. Piette M, Desmet B, Dams R. Determination of strontium in human whole blood by ICP-AES. *Sci. Total Environ.* 1994; 141: 269-273.
207. Piette M. La noyade: Recherches actuelles. *J. Méd. Lég. Droit. Méd.* 1996; 39: 417-420.
208. Piette M, De Letter EA. Drowning: still a difficult autopsy diagnosis. *Forensic Sci. Int.* 2006; 163: 1-9.
209. Plueckhahn VD. Alcohol and accidental drowning: a 25-year study. *Med. J. Aust.* 1984; 141: 22–25.
210. Pollanen MS. Diatoms and homicide. *Forensic Sci. Int.* 1997; 91: 29-34.
211. Pollanen MS. *Forensic diatomology and drowning*. Elsevier: Paises Bajos, 1998.

-
212. Polson CJ, Gee DJ, Knight B. The essentials of forensic medicine (4^a ed.). Pergamon Press: Oxford, 1985.
213. Püschel K, Schulz F, Darrmann I, Tsokos M. Macromorphology and histology of intramuscular haemorrhages in cases of drowning. *Int. J. Legal Med.* 1999; 112: 101-106.
214. Quan L, Zhu BL, Ishida K, Oritani S, Taniguchi M, Fujita MQ, Maeda H. Intranuclear ubiquitin immunoreactivity of the pigmented neurons of the substantia nigra in fatal acute mechanical asphyxiation and drowning. *Int. J. Legal Med.* 2001; 115: 6-11.
215. Quan L, Cummings P. Characteristics of drowning by different age groups. *Inj. Prev.* 2003; 9: 163–168.
216. Quan L, Zhu BL, Ishikawa T, Michiue T, Zhao D, Li DR, Ogawa M, Maeda H. Postmortem serum erythropoietin levels in establishing the cause of death and survival time at medicolegal autopsy. *Int. J. Leg. Med.* 2008; 122: 481–487.
217. Quan L, Ishikawa T, Michiue T, Li DR, Zhao D, Yoshida C, Chen JH, Komatsu A, Azuma Y, Sakoda S, Zhu BL, Maeda H. Analyses of cardiac blood cells and serum proteins with regard to cause of death in forensic autopsy cases. *Leg. Med. (Tokyo)*. 2009a; 11: 297–300.
218. Quan L, Zhu BL, Ishikawa T, Michiue T, Zhao D, Yoshida C, Chen JH, Wang Q, Komatsu A, Azuma Y, Maeda H. Postmortem serum levels of pulmonary surfactant-associated proteins A and D with regard to the cause of death in medicolegal autopsy. *Leg Med (Tokyo)*. 2009b; 11: 301-303.

219. Quan L, Zhu BL, Ishikawa T, Michiue T, Zhao D, Ogawa M, Maeda H. Postmortem serum erythropoietin level as a marker of survival time in injury deaths. *Forensic Sci. Int.* 2010; 200: 117–122.
220. Quan L, Ishikawa T, Hara J, Michiue T, Chen JH, Wang Q, Zhu BL, Maeda H. Postmortem serotonin levels in cerebrospinal and pericardial fluids with regard to the cause of death in medicolegal autopsy. *Leg. Med. (Tokyo)*. 2011; 13: 75-78.
221. Rainio J, De Giorgio F, Bortolotti F, Tagliaro F. Objective post-mortem diagnosis of chronic alcohol abuse – a review of studies on new markers. *Leg. Med. (Tokyo)*. 2008; 10: 229–235.
222. Reh H. Diagnostik des Ertrinkungstodes und Bestimmung der Wasserzeit. M Triltsch Verlag: Düsseldorf, 1970.
223. Reh H. Gerichtliche Medizin. Springer: Berlin, 1975.
224. Reiter C. Zum Nachweis des Ertrinkungstodes mittels ins Herzblut eingeschwemmter Raucherzellen. *Z. Rechtsmed.* 1984; 93: 79-88.
225. Revenstorf V. Der Nachweis der aspirierten Ertränkungsflüssigkeit als Kriterium des Todes durch Ertrinken. *Vjschr Gerichtl Med.* 1904; 27: 274-299.
226. Ricchiuti V, Voss EM, Ney A, Odland M, Anderson PAW, Apple FS. Cardiac Troponin T isoforms expressed in renal diseased skeletal muscle will not cause false positive results by the second generation cTnT assay by Boehringer Mannheim. *Clin. Chem.* 1998; 44:1919-1924.

-
227. Richterich R, Colombo JP. *Klinische Chemie*. (4ª ed.). Karger S.: Basel, 1978.
228. Roll HF. *Leerboek der Gerechtelijke Geneeskunde voor de scholen tot opleiding van Ind artsen*. Martinus Nijhoff: Gravenhage, 1918.
229. Romero JL. Muertes por sumersión. Revisión y actualización de un tema clásico de la medicina forense. *Cuad. Med. Forense*. 2007; 13: 99–130.
230. Runyan CW, Casteel C, Perkis D, Black C, Marshall SW, Johnson RM, Coyne-Beasley T, Waller AE, Viswanathan S. Unintentional injuries in the home in the United States Part I: mortality. *Am. J. Prev. Med.* 2005; 28: 73-79.
231. Sakurada M, Asano M, Takahashi M, Kuse A, Morichika M, Nakagawa K, Kondo T, Ueno Y. Estimates of exposure to cold before death from immunohistochemical expression patterns of HSP70 in glomerular podocytes. *Int. J. Legal. Med.* 2012 (DOI 10.1007/s00414-012-0806-3)
232. Salomez F, Vincent JL. Drowning: a review of epidemiology, pathophysiology, treatment and prevention. *Resuscitation*. 2004; 63: 261-268.
233. Sampson EJ, Baired MA, Burtis CA, Smith EM, Witte DL, Bayse DD. A coupled-enzyme equilibrium method for measuring urea in serum: Optimization and evaluation of the AACC study group on urea candidate reference method. *Clin. Chem.* 1980; 26: 816-826.
234. Sánchez de Leon MS, Vallejo G, Azparren JE. Muerte por sumersión. En: Delgado S. *Tratado de medicina legal y ciencias forenses*. Bosch S.A.: Barcelona, 2011.

235. Sarnaik AP, Vohra MP. Near-drowning: fresh, salt and cold water immersion. *Clin. Sport Med.* 1986; 5: 33–46.
236. Saukko P, Knight B. Suffocation and “asphyxia”. En: Ueberberg A. *Knight’s forensic pathology* (3^a ed.). Arnold: London, 2004.
237. Sauvageau A, Boghossian E. Classification of asphyxia: the need for standardization. *J. Forensic Sci.* 2010; 55: 1259-1267.
238. Schilling UM, Bortolin M. Drowning. *Minerva Anesthesiol.* 2012; 78: 69-77.
239. Schlebusch H, Liappis N, Kalina E, Klein G. High sensitive CRP and creatinine: reference intervals from infancy to childhood. *J. Lab. Med.* 2002; 26: 341-346.
240. Schyllander J, Janson S, Nyberg C, Eriksson UB, Stark Ekman D. Case analyses of all children's drowning deaths occurring in Sweden 1998-2007. *Scand. J. Public Health.* 2013; 41: 174-179.
241. Schwär TG. Drowning: its chemical diagnosis. *Forensic Sci.* 1972; 1: 411–417.
242. Schwartz LB, Metcalfe DD, Miller JS, Earl H, Sullivan T. Tryptase levels as an indicator of mast-cell activation in systemic anaphylaxis and mastocytosis. *N. Engl. J. Med.* 1987; 316: 1622–1626.
243. Schwarzenbach G. The complexones and their analytical application. *Analyst.* 1955; 80: 713-729.
244. Schwebel DC, Simpson J, Lindsay S. Ecology of drowning risk at a public swimming pool. *J. Safety Res.* 2007; 38: 367-372.

-
245. Shaw KN, Briede CA. Submersion injuries: drowning and neardrowning. *Emerg. Med. Clin. N. Am.* 1989; 7: 355-370.
246. Shibata Y, Maruizume T, Miyage H. *Journal of the Chemical Society of Japan. Chemistry and Industrial Chemistry.* 1992; 9: 961-967.
247. Shkrum MJ, Ramsay DA. *Forensic Pathology of Trauma.* Humana Press: Totowa, 2007.
248. Shono T, Okahara M, Ikeda I, Kimura K, Tamura HJ. *Electroanal. Chem.* Elsevier Sequoia S.A.: Lausanne, 1982.
249. Sibert JR, Lyons RA, Smith BA, Cornall P, Sumner V, Craven MA, Kemp AM. Preventing deaths by drowning in children in the United Kingdom: have we made progress in 10 years? Population based incidence study. *Brit. Med. J.* 2002; 324: 1070-1071.
250. Sibón Olano A, Martínez-García P, Vizcaya Rojas MA, Romero Palanco JL. Síndrome de Asfixia Sumersión. *Cuad. Med. Forense.* 2005; 11: 229-233.
251. Sidari L, Di Nunno N, Costantinides F, Melato M. Diatom test with Soluene-350 to diagnose drowning in sea water. *Forensic Sci. Int.* 1999; 103: 61-65.
252. Siedel J, Wahlefeld AW, Ziegenhorn J. A new iron ferrozine reagent without deproteinization. *Clin. Chem.* 1984; 30: 975.
253. Sigrist T, Germann U. Homicide by asphyxia - yes or no? on the use of muscle histology. *Z. Rechtmed.* 1989; 102: 549-557.

254. Sigrist T, Schulz F, Koops E. Confusing muscular hemorrhage in a drowned cadaver. A contribution to differentiation between vital and post-mortem changes. *Arch. Kriminol.* 1994; 193: 90-96.
255. Somers GR, Chiasson DA, Smith CR. Pediatric drowning: a 20-year review of autopsied cases: II. Pathologic features. *Am. J. Forensic Med. Pathol.* 2006; 27: 20-24.
256. Spitz WU. Asphyxia. En: Spitz WU, Spitz DJ. *Spitz and Fisher's medicolegal investigation of death: Guidelines for the application of pathology to crime investigation* (4^a ed.). Charles C. Thomas: Springfield, 2006.
257. Steinman AM. Cardiopulmonary resuscitation and hypothermia. *Circulation.* 1986; 74: 29-32.
258. Stemberga V, Stifter S, Cuculić D, Coklo M, Bosnar A. Immunohistochemical surfactant protein-A expression: fatal drowning vs. postmortem immersion. *Med. Hypotheses.* 2009; 72: 413-415.
259. Stockis E. Recherches sur le diagnostic médico-légal de la mort par submersion. *Ann. Soc. Med. Légale de Belgique.* 1909; 20: 71-220.
260. Stockis E. Le diagnostic de la mort par submersion par la méthode du plancton cristallin. *Ann. Méd. Légale Crim. Polic. Sci.* 1921; 1: 43-48.
261. Sunderman FW Jr, Carroll JE. Measurements of serum calcium and magnesium by atomic absorption spectrometry. *Am. J. Clin. Pathol.* 1965; 43: 302-310.

-
262. Suto M, Abe S, Nakamura H, Suzuki T, Itoh T, Kochi H. Phytoplankton gene detection in drowned rabbits. *Leg. Med. (Tokyo)*. 2003; 5: 142-144.
263. Suto M, Kato N, Abe S, Nakamura M, Tsuchiya R, Hiraiwa K. PCR detection of bacterial genes provides evidence of death by drowning. *Leg. Med. (Tokyo)*. 2009; 11: 354-356.
264. Swann HG, Brucer M, Moore C, Vezien BL. Fresh water and sea water drowning: A study of terminal cardiac and biochemical events. *Tex. Rep. Biol. Med.* 1947; 5: 423-437.
265. Swann HG, Spallford NR. Body salt and water changes during fresh water and seawater drowning. *Tex. Rep. Biol. Med.* 1951; 9: 356-382.
266. Szpilman D. Near-drowning and drowning classification: a proposal to stratify mortality based on the analysis of 1831 cases. *Chest*. 1997; 112: 660-665.
267. Tabeling BB, Modell JH. Fluid administration increases oxygen delivery during continuous positive pressure ventilation after freshwater near-drowning. *Crit. Care Med.* 1983; 11: 693-696.
268. Tamaki K, Sato K, Katsumata Y. Enzyme-linked immunosorbent assay for determination of plasma thyroglobulin and its application to post-mortem diagnosis of mechanical asphyxia. *Forensic Sci. Int.* 1987; 33: 259-265.
269. Terazawa K, Haga K. The role of pleural effusion in drowning. *Am. J. Forensic Med. Pathol.* 1996; 17: 173-174.

270. Tie J, Uchigasaki S, Haseba T, Ohno Y, Isahai I, Oshida S. Direct and rapid PCR amplification using digested tissues for the diagnosis of drowning. *Electrophoresis*. 2010; 31: 2411-2415.
271. Tournis S, Economopoulos D, Lyritis GP. Strontium ranelate: a novel treatment in postmenopausal osteoporosis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2006; 1092: 403–407.
272. Tsokos M, Cains G, Byard RW. Hemolytic staining of the intima of the aortic root in freshwater drowning: a retrospective study. *Am. J. Forensic. Med. Pathol.* 2008; 29: 128-130.
273. Uchiyama T, Kakizaki E, Kozawa S, Nishida S, Imamura N, Yukawa N. A new molecular approach to help conclude drowning as a cause of death: simultaneous detection of eight bacterioplankton species using real-time PCR assays with TaqMan probes. *Forensic Sci. Int.* 2012; 222: 11-26.
274. Van Dorp JC, Knape JT, Bierens JJ. Recommendations: World Congress on Drowning. The Netherland. Amsterdam. 2002. (<http://www.drowning.nl/>. 2003).
275. Vallejo G, Azparren JE, Sánchez de León MS, Contardi L, Valverde JL. Pruebas biológicas complementarias en las muertes por sumersión. *Rev. Esp. Med. Legal.* 2012; 38: 17-27.
276. Vázquez MD, Sánchez-Rodríguez F, Osuna E, Diaz J, Cox DE, Pérez-Cárceles MD, Martínez P, Luna A, Pounder DJ. Creatine kinase BB and neuron-specific enolase in cerebrospinal fluid in the diagnosis of brain insult. *Am. J. Forensic Med. Pathol.* 1995; 16: 210–214.

-
277. Watson RS, Cummings P, Quan L. Cervical spine injuries among submersion victims. *J. Trauma*. 2001; 51: 658–662.
278. Wetli CV, Mittleman RE, Rao UJ. *Practical Forensic Pathology*. Igaku-shoin: New York, 1988.
279. Winskog C. Underwater disaster victim identification: the process and the problems. *Forensic Sci. Med. Pathol*. 2012; 8: 174-178.
280. Wirthwein DP, Barnard JJ, Prahlow JA. Suicide by drowning. A 20 year review. *J. Forensic Sci*. 2002; 47: 131-136.
281. Wollenek G, Honarwar N, Golej J, Marx M. Cold water submersion and cardiac arrest in treatment of severe hypothermia with cardiopulmonary bypass. *Resuscitation*. 2002; 52: 255-263.
282. World Health Organization. Drowning. Fact sheet. N° 347; WHO, Geneva. 2010; (On line: www.who.int/violence_prev).
283. Wu AH, Feng YJ, Moore R, Apple FS, McPherson PH, Buechler KF, Bodor G. Characterisation of cardiac troponin subunit release into serum after acute myocardial infarction and comparison of assays for troponin T and I. *Clin. Chem*. 1998; 44:1198-1208.
284. Wu AHB. *Tietz Clinical Guide to Laboratory Tests* (4^a ed.) Saunders Elsevier: St. Louis, 2006

285. Yorulmaz C, Arican N, Afacan I, Dokgoz H, Asirdizer M. Pleural effusion in bodies recovered from water. *Forensic Sci. Int.* 2003; 136: 16-21.
286. Yoshida C, Ishikawa T, Michiue T, Quan L, Maeda H. Postmortem biochemistry and immunohistochemistry of chromogranin A as a stress marker with special regard to fatal hypothermia and hyperthermia. *Int. J. Leg. Med.* 2011; 125: 11–20.
287. Yoshimura S, Yoshida M, Okii Y, Tokiyasu T, Watabiki T, Akane A. Detection of green algae (Chlorophyceae) for the diagnosis of drowning. *Int. J. Legal Med.* 1995; 108: 39-42.
288. Yu-Chuan C, Zhao-Ke D, Jia-Zhen Z. The significance of detecting serum fluorine level in the diagnosis of drowning. *Forensic Sci. Int.* 1990; 46: 287-292.
289. Zangani P, Palmieri VM, Sciaudone. *Manuale di Medicina Legale e delle Assicurazioni* (30^a ed.). Morano: Napoli, 1985.
290. Zhao J, Liu C, Hu S, He S, Lu S. Microwave Digestion-Vacuum Filtration-Automated Scanning Electron Microscopy as a sensitive method for forensic diatom test. *Int. J. Legal Med.* 2013; 127: 459-463.
291. Zhu BL, Ishida K, Quan L, Fujita MQ, Maeda H. Immunohistochemistry of pulmonary surfactant apoprotein A in forensic autopsy: reassessment in relation to the causes of death. *Foresic Sci. Int.* 2000; 113: 193-197.

-
292. Zhu BL, Ishida K, Quan L, Taniguchi M, Oritani S, Kamikodai Y, Fujita MQ, Maeda H. Postmortem urinary myoglobin levels with reference to the causes of death. *Forensic Sci. Int.* 2001; 115: 183–188.
293. Zhu BL, Ishida K, Quan L, Taniguchi M, Oritani S, Li DR, Fujita MQ, Maeda H. Postmortem serum uric acid and creatinine levels in relation to the causes of death. *Forensic Sci. Int.* 2002a; 125: 59–66.
294. Zhu BL, Ishida K, Quan L, Li DR, Taniguchi M, Fujita MQ, Maeda H, Tsuji T. Pulmonary immunohistochemistry and serum levels of a surfactant-associated protein A in fatal drowning. *Leg. Med. (Tokyo)*. 2002b; 4: 1-6.
295. Zhu BL, Quan L, Li DR, Taniguchi M, Kamikodai Y, Tsuda K, Fujita MQ, Nishi K, Tsuji T, Maeda H. Postmortem lung weight in drownings: A comparison with acute asphyxiation and cardiac death. *Leg. Med. (Tokyo)*. 2003a; 5: 20-26.
296. Zhu BL, Ishida K, Taniguchi M, Quan L, Oritani S, Tsuda K, Kamikodai Y, Fujita MQ, Maeda H. Possible postmortem serum markers for differentiation between fresh, saltwater drowning and acute cardiac death: A preliminary investigation. *Leg. Med. (Tokyo)*. 2003b; 5: 298-301.
297. Zhu BL, Ishikawa T, Quan L, Li DR, Zhao D, Michiue T, Maeda H. Evaluation of postmortem serum calcium and magnesium levels in relation to the causes of death in forensic autopsy. *Forensic Sci. Int.* 2005; 155: 18-23.
298. Zhu BL, Ishikawa T, Michiue T, Li DR, Zhao D, Oritani S, Kamikodai Y, Tsuda K, Okazaki S, Maeda H. Postmortem cardiac troponin T levels in the blood and

- pericardial fluid. Part 1. Analysis with special regard to traumatic causes of death. *Leg. Med. (Tokyo)*. 2006a; 8: 86-93.
299. Zhu BL, Ishikawa T, Michiue T, Li DR, Zhao D, Kamikodai Y, et al. Postmortem cardiac troponin T levels in the blood and pericardial fluid. Part 2. Analysis for application in the diagnosis of sudden cardiac death with regard to pathology. *Leg. Med. (Tokyo)*. 2006b; 8: 94–101.
300. Zhu BL, Ishikawa T, Michiue T, Tanaka S, Zhao D, Li DR, Quan L, Oritani S, Maeda H. Differences in postmortem urea nitrogen, creatinine and uric acid levels between blood and pericardial fluid in acute death. *Leg. Med. (Tokyo)*. 2007a; 9: 115-122.
301. Zhu BL, Ishikawa T, Michiue T, Li DR, Zhao D, Bessho Y, et al. Postmortem cardiac troponin I and creatine kinase MB levels in the blood and pericardial fluid as markers of myocardial damage in medicolegal autopsy. *Leg. Med. (Tokyo)*. 2007b; 9: 241–250.
302. Zhu BL, Ishikawa T, Michiue T, Li DR, Zhao D, Tanaka S, Kamikodai Y, Tsuda K, Okazaki S, Maeda H. Postmortem pericardial natriuretic peptides as markers of cardiac function in medico-legal autopsies. *Int. J. Legal Med.* 2007c; 121: 28-35.
303. Zhu BL, Ishikawa T, Michiue T, Li DR, Zhao D, Quan L, et al. Postmortem serum catecholamine levels in relation to the cause of death. *Forensic Sci. Int.* 2007d; 173: 122–129.

304. Zivković V, Babić D, Nikolić S. Svechnikov's sign as an indicator of drowning in immersed bodies changed by decomposition: an autopsy study. *Forensic Sci Med Pathol.* 2013; 9: 177-183.