



UNIVERSIDAD DE MURCIA
ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO

**Investigación Bioquímica y Aproximación
Proteómica de Fluidos Biológicos
en Muertes por Sumersión**

D^a Encarnación Sánchez Rodríguez

2021



INVESTIGACIÓN BIOQUÍMICA Y APROXIMACIÓN PROTEÓMICA DE FLUIDOS BIOLÓGICOS EN MUERTES POR SUMERSIÓN

Tesis doctoral

Presentada por:

Dña. Encarnación Sánchez Rodríguez

Dirigida por:

Prof. Dra. Dña. María Dolores Pérez Cárceles

Dr. D. Agustín Sibón Olano

UNIVERSIDAD DE MURCIA

Escuela Internacional de Doctorado

Murcia 2021



DEDICATORIA

A mis padres, por permitirme caminar y acompañarme en el camino. Sin vosotros nada hubiera sido posible.

Debemos estar dispuestos a renunciar a la vida que planeamos para poder vivir la vida que nos espera.

Joseph Campbell (1904-1987)





AGRADECIMIENTOS

A la profesora M.^a Dolores Pérez Cárceles, catedrática de Medicina Legal y Forense de la Universidad de Murcia y directora de la tesis, por su dedicación, su paciencia y comprensión, sin cuya orientación y tesón no hubiera sido posible el inicio, desarrollo y finalización de este proyecto. Gracias por guiarme.

Al Dr. Agustín Sibón Olano, jefe del Servicio de Patología del IMLyCF de Cádiz y co-director de la tesis; jefe, maestro, compañero y amigo, a quien le debo no solo su inestimable ayuda en la realización de esta empresa sino su guía en el mundo de la medicina legal. Me has enseñado a caminar. Gracias por tu paciencia y apoyo.

A Dña. Estefanía Barrera Pérez, médico forense del IMLyCF de Cádiz y compañera del Servicio de Patología; tu apoyo a diario y tu gran capacidad de trabajo me sirven de inspiración. No imagino mejor compañera de despacho. Gracias por acompañarme en este camino.

A la Dra. Diana Hernández Romero, profesora del Departamento de Medicina Legal y Ciencias Forenses de la Facultad de Medicina de la Universidad de Murcia y al Dr. Eduardo Osuna, catedrático del Departamento de Medicina Legal y Ciencias Forenses de la Facultad de Medicina de la Universidad de Murcia, sin cuya inestimable ayuda no hubiera sido posible la realización de la investigación y la obtención de resultados.

A Miriam Martínez Villanueva, facultativo especialista bioquímica del Servicio de Análisis Clínicos del Hospital Universitario Virgen de Arrixaca de Murcia, y José Antonio Noguera Velasco, Jefe de Sección del Servicio de Análisis Clínicos del Hospital Universitario Virgen de Arrixaca de Murcia, por su colaboración en la realización técnica de los análisis de las muestras.



A Antonio Maurandi López y Gemma Prieto Bonete por su ayuda valiosa ayuda en el análisis de los componentes principales.

A la Dra. Magdalena Vázquez Méndez, cuyo trabajo ha sido una inspiración, a Isidro Ibarra, y al Servicio de Apoyo a la Instrumentación Tecnológica de la Universidad Politécnica de Cartagena, por su inestimable ayuda.

A mis compañeros de desayuno en la Ciudad de la Justicia de Málaga, Pili, Jonatan, Ana, José Manuel y M.^a Luisa; nuestros debates, risas y el café son el motor que impulsa las mañanas. Gracias por vuestra compañía y apoyo durante este proceso.

Al IMLyCF de Granada, forenses, auxiliares y administrativos, quienes guiaron mis pasos cuando comencé a caminar en la medicina forense. Al IMLyCF de Málaga, forenses, auxiliares y administrativos, quienes me ayudan a seguir recorriendo el camino. Gracias a todos por vuestra ayuda.

A Montse y a Carmen, amigas incondicionales, que me han ayudado a hacer el camino y llegar hasta el final. Gracias por ser vosotras.

A Francisco Martínez Socias, jefe del Servicio de Clínica del IMLyCF de Málaga, que falleció pocos días antes de concluir esta tesis. Gracias por todo lo que me has enseñado. Me ha quedado mucho por aprender. Te echamos de menos.

A mis padres por su apoyo incondicional, su paciencia, su amor y valentía. Me habéis dado tanto que una vida no basta para agradeceróslo. Gracias por estar siempre ahí.



ÍNDICE

<i>Resumen</i>	21
<i>Summary</i>	23
1. INTRODUCCIÓN.....	26
1.1. ASFIXIAS MECÁNICAS.....	27
1.1.1. Concepto.....	27
1.1.2. Fisiopatología de las asfixias.....	28
1.1.3. Clasificación.....	29
1.1.4. Hallazgos patológicos generales en las muertes por asfixia.	32
1.1.4.1. Hallazgos externos.....	33
1.1.4.2. Hallazgos internos.....	38
1.2. MUERTES POR SUMERSIÓN.....	45
1.2.1. Concepto de sumersión.	45
1.2.2. Tipos de sumersión	46
1.2.3. Datos epidemiológicos.	47
1.2.4. Etiología médico legal.....	49
1.2.5. Data de la sumersión.	51
1.2.6. Fisiopatología y mecanismos de muerte.	53
1.2.7. Hallazgos de autopsia.....	58
1.2.7.1 Examen externo.....	58
1.2.7.2. Examen interno.....	61
1.2.8. Estudios complementarios en caso de sumersión.	71
1.2.8.1. Histopatológicos.....	72
1.2.8.2. Biológicos.....	75
1.2.8.3. Bioquímicos.....	80
1.2.8.4. Radiológicos.....	87
1.2.8.5. Componentes alveolares que pueden ser hallados en la circulación general.....	88
1.2.8.6. Proteómica en patología forense.....	90
2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	92



3. MATERIAL Y MÉTODO	96
3.1. INVESTIGACIÓN BIOQUÍMICA DE FLUIDOS.....	97
3.1.1. Casos forenses. Diseño del estudio.	97
3.1.2. Extracción de las muestras.	98
3.1.3. Recogida de muestras.	98
3.1.4. Análisis químico.....	99
3.1.5. Preparación de las muestras.	99
3.1.6. Plasma de acoplamiento inductivo con espectrometría de masas (ICP-MS).....	100
3.2. APROXIMACIÓN PROTEÓMICA	102
3.2.1. Diseño del estudio.	102
3.2.2. Procedimiento de extracción de fluidos biológicos.....	102
3.2.3. Extracción de proteínas.	102
3.2.4. Búsqueda de base de datos.	103
3.2.5. Criterios para la búsqueda de proteínas.....	103
3.2.6. Experimento de validación.	104
3.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	105
3.3.1. Análisis descriptivo de los datos.	105
3.3.2. Análisis de comparación de medias.	105
3.3.3. Análisis de correlación.	106
3.3.4. Curvas ROC (curva de característica operativa para el receptor).	106
3.3.5. Análisis de regresión.	108
3.3.6. Análisis discriminante.	108
3.3.7. Análisis de componentes principales.....	109
4. RESULTADOS	112
4.1. INVESTIGACIÓN BIOQUÍMICA DE FLUIDOS.....	113
4.1.1. Análisis descriptivo de la muestra y de las diferencias según edad, intervalo postmortem, peso pulmonar y causa de la muerte.....	113
4.1.2. Análisis de las diferencias en las concentraciones de los elementos traza en sangre entre los casos de muerte por sumersión y otras causas de muerte.....	116
4.1.3. Análisis de las diferencias entre las concentraciones de elementos traza en humor vítreo en los casos de muerte por sumersión y otras causas de muerte.	125



4.1.4.	Análisis de las diferencias entre las concentraciones de elementos traza en agua de sumersión.	128
4.1.5.	Análisis de correlaciones de elementos traza en humor vítreo, sangre y agua en muertes por sumersión.....	129
4.1.6.	Análisis de correlación entre intervalo postmortem y elementos trazas en humor vítreo y sangre en muertes por sumersión.....	137
4.1.7.	Análisis de las diferencias en las concentraciones de los elementos químicos en las muestras de sangre entre los casos de muerte por sumersión y no sumersión mediante las curvas ROC.	139
4.1.8.	Análisis de las diferencias en las concentraciones de los elementos químicos en humor vítreo entre los casos de muerte por sumersión y no sumersión mediante las curvas ROC.....	142
4.1.9.	Análisis de regresión logística según edad, sexo, peso de pulmones, intervalo postmortem y de los elementos químicos en sangre y humor vítreo	1473
4.1.10.	Análisis discriminante en elementos traza en muestras de sangre y humor vítreo.....	1437
4.1.11.	Análisis de componentes principales en los tres grupos diagnósticos y todos los elementos químicos analizados en las muestras de sangre.	148
4.1.12.	Análisis de componentes principales en los tres grupos diagnósticos y todos los elementos químicos analizados en las muestras de humor vítreo.....	154
4.2.	APROXIMACIÓN PROTEÓMICA	160
4.2.1.	Identificación y cuantificación de proteínas en las muestras de plasma en casos de muerte por sumersión y otras causas de muerte.....	160
4.2.2.	Evaluación cuantitativa de apolipoproteína A1 y α -1 antitripsina en casos de muerte por sumersión y otras causas de muerte.....	165
4.2.3.	Análisis de las diferencias de concentraciones plasmáticas de apolipoproteína A1 y α -1 antitripsina en los casos de muerte por sumersión y otras causas de muerte mediante curvas ROC y análisis discriminante.....	168
5.	DISCUSIÓN.....	171
6.	CONCLUSIONES.....	185
7.	BIBLIOGRAFÍA.....	189



ÍNDICE DE IMÁGENES

Imagen 1. <i>Sección transversal vías respiratorias. Obstrucciones al paso del aire..</i>	29
Imagen 2. <i>Tipos de asfixias mecánicas.</i>	32
Imagen 3. <i>Livideces rosadas y restos de arena en sumersión en agua salada.</i>	34
Imagen 4. <i>Cianosis facial.</i>	35
Imagen 5. <i>Petequias en miembros inferiores.</i>	36
Imagen 6. <i>Petequias en mucosas.</i>	36
Imagen 7. <i>Protusión lingual.</i>	37
Imagen 8. <i>Hongo de espuma en cavidad bucal.</i>	37
Imagen 9. <i>Hongo de espuma en orificios nasales.</i>	38
Imagen 10. <i>Enfisema hidro-aéreo pulmonar.</i>	40
Imagen 11. <i>Manchas de Paltauf.</i>	41
Imagen 12. <i>Edema Pulmonar.</i>	41
Imagen 13. <i>Espuma en laringe y tráquea.</i>	42
Imagen 14. <i>Edema cerebral e hiperemia.</i>	43
Imagen 15. <i>Enarenado hemorrágico.</i>	43
Imagen 16. <i>Hígado en nuez moscada.</i>	44
Imagen 17. <i>Cutis anserina y heridas superficiales.</i>	59
Imagen 18. <i>Manos de lavandera.</i>	59
Imagen 19. <i>Livideces rosadas.</i>	61
Imagen 20. <i>Solapamiento de bordes pulmonares.</i>	62
Imagen 21. <i>Manchas de Paltauf.</i>	63
Imagen 22. <i>Edema pulmonar acuoso.</i>	64
Imagen 23. <i>Espuma en bronquios.</i>	64
Imagen 24. <i>Espuma rosada en tráquea.</i>	65
Imagen 25. <i>Líquido en cavidad pleural.</i>	67
Imagen 26. <i>Líquido de sumersión en estómago.</i>	68
Imagen 27. <i>Bazo.</i>	68
Imagen 28. <i>Hígado congestivo.</i>	69



Imagen 29. <i>Coloración azulada en ambos peñascos (signo de Nyles).</i>	70
Imagen 30. <i>Tinción de arco aórtico.</i>	71
Imagen 31. <i>Hemorragias cervicales y manchas de Paltauf.</i>	75
Imagen 32. <i>Apolipoproteína A1 y alfa-1 antitripsina.</i>	180



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. <i>Defunciones por ahogamiento.....</i>	49
Tabla 2. <i>Etiología de las muertes por sumersión..</i>	51
Tabla 3. <i>Peso de pulmones en las asfixias por sumersión.....</i>	65
Tabla 4. <i>Peso de pulmones según causa de muerte.....</i>	66
Tabla 5. <i>Peso de pulmones según sumersión en agua dulce y salada.....</i>	66
Tabla 6. <i>Isótopos monitorizados, estándares internos, rangos de medida, IDL y BEC.</i>	101
Tabla 7. <i>Valores descriptivos de edad, peso de pulmones e intervalo postmortem en los casos.</i>	114
Tabla 8. <i>Estadísticos descriptivos de las concentraciones de boro en sangre en las tres localizaciones y diferencias entre muertes por sumersión y otras causas de muerte..</i>	117
Tabla 9. <i>Estadísticos descriptivos de las concentraciones de bromo en sangre en las tres localizaciones y diferencias entre muertes por sumersión y otras causas de muerte..</i>	118
Tabla 10. <i>Estadísticos descriptivos de las concentraciones de calcio en sangre en las tres localizaciones y diferencias entre muertes por sumersión y otras causas de muerte..</i>	119
Tabla 11. <i>Estadísticos descriptivos de las concentraciones de estroncio en sangre en las tres localizaciones y diferencias entre muertes por sumersión y otras causas de muerte</i>	120
Tabla 12. <i>Estadísticos descriptivos de las concentraciones de litio en sangre en las tres localizaciones y diferencias entre muertes por sumersión y otras causas de muerte..</i>	121
Tabla 13. <i>Estadísticos descriptivos de las concentraciones de magnesio en sangre en las tres localizaciones y diferencias entre muertes por sumersión y otras causas de muerte</i>	122
Tabla 14. <i>Estadísticos descriptivos de las concentraciones de potasio en sangre en las tres localizaciones y diferencias entre muertes por sumersión y otras causas de muerte</i>	123
Tabla 15. <i>Estadísticos descriptivos de las concentraciones de bromo, litio, boro y estroncio en humor vítreo y diferencias entre muertes por sumersión y otras causas de muerte.</i>	126



Tabla 16. <i>Estadísticos descriptivos de las concentraciones de magnesio, potasio y calcio en humor vítreo y diferencias entre muertes por sumersión y otras causas de muerte.</i>	127
Tabla 17. <i>Concentraciones de elementos traza en el agua de sumersión.</i>	129
Tabla 18. <i>Correlaciones de las concentraciones de litio entre humor vítreo, sangre y agua en los casos de sumersión.</i>	131
Tabla 19. <i>Correlaciones de las concentraciones de bromo entre humor vítreo, sangre y agua en los casos de sumersión.</i>	132
Tabla 20. <i>Correlaciones de las concentraciones de magnesio entre humor vítreo, sangre y agua en los casos de sumersión.</i>	133
Tabla 21. <i>Correlaciones de las concentraciones de calcio entre humor vítreo, sangre y agua en los casos de sumersión.</i>	134
Tabla 22. <i>Correlaciones de las concentraciones de potasio entre humor vítreo, sangre y agua en los casos de muerte por sumersión.</i>	135
Tabla 23. <i>Correlaciones de las concentraciones de estroncio entre humor vítreo, sangre y agua en los casos de sumersión.</i>	136
Tabla 24. <i>Correlaciones de las concentraciones de boro entre humor vítreo, sangre y agua en los casos de sumersión.</i>	137
Tabla 25. <i>Correlaciones entre el intervalo postmortem y las concentraciones de los distintos elementos en sangre y humor vítreo.</i>	138
Tabla 26. <i>Áreas bajo curvas ROC de elementos traza en casos de sumersión, error estándar, probabilidad y límites superior e inferior bajo el área.</i>	141
Tabla 27. <i>Área bajo la curva ROC de elementos traza en los casos de sumersión, error estándar, probabilidad y límites superior e inferior del área.</i>	143
Tabla 28. <i>Análisis de regresión logística univariante de edad, sexo, peso de pulmones e intervalo postmortem.</i>	144
Tabla 29. <i>Análisis de regresión logística univariante de los elementos químicos litio, boro, estroncio, bromo, magnesio y calcio en las muestras de sangre periférica, ventrículo derecho y ventrículo izquierdo.</i>	145
Tabla 30. <i>Análisis de regresión logística univariante de boro en sangre periférica y estroncio y bromo en sangre de ventrículo izquierdo.</i>	146



Tabla 31. <i>Análisis de regresión logística univariante de los elementos químicos litio, boro, estroncio, bromo y magnesio en humor vítreo.</i>	146
Tabla 32. <i>Análisis de regresión logística multivariante de boro y bromo en humor vítreo.</i>	147
Tabla 33. <i>Análisis discriminante de boro, bromo y estroncio.</i>	147
Tabla 34. <i>Análisis discriminante en humor vítreo de boro y bromo.</i>	148
Tabla 35. <i>Proporción de variables retenidas por las diferentes dimensiones en muestras de sangre.</i>	150
Tabla 36. <i>Proporción de variables retenidas por las diferentes dimensiones en muestras de humor vítreo.</i>	155
Tabla 37. <i>Análisis de asociación (regresión lineal) de los niveles de apolipoproteína A1 con muerte por sumersión.</i>	167
Tabla 38. <i>Análisis de asociación (regresión lineal) de los niveles de α-1 antitripsina con muerte por sumersión.</i>	167
Tabla 39. <i>Áreas por debajo de las curvas ROC, error estándar y límites inferior y superior del área. Puntos de corte establecidos según el uso de una curva característica del operador del receptor.</i>	169
Tabla 40. <i>Análisis discriminante usando apolipoproteína A1 sumersión.</i>	169
Tabla 41. <i>Análisis discriminante usando apolipoproteína A1 sumersión.</i>	169



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. <i>Distribución del total de muestras por grupos diagnósticos.</i>	97
Figura 2. <i>Distribución del total de muestras por grupos de sexo.</i>	98
Figura 3. <i>Distribución de la edad en relación a la causa de muerte.</i>	114
Figura 4. <i>Media del intervalo postmortem según las causas de muerte.</i>	115
Figura 5. <i>Media de los pesos pulmonares según causa de muerte.</i>	115
Figura 6. <i>Distribución de las muestras por subgrupos diagnósticos.</i>	116
Figura 7. <i>Valores hallados en VD, SP y VI de B (a), Br (b), Ca (c), Sr (d), Li (e), Mg (f) y K (g) en muertes por sumersión y otras causas de muerte.</i>	124
Figura 8. <i>Concentraciones Br, Li, B, Sr, Mg, K y Ca en humor vítreo en muertes por sumersión y otras causas de muerte.</i>	128
Figura 9. <i>Valores medios de elementos traza hallados en agua de sumersión.</i>	129
Figura 10. <i>Curva ROC de elementos traza en sangre en casos de sumersión.</i>	139
Figura 11. <i>Curva ROC de los elementos traza en humor vítreo en casos de sumersión.</i>	142
Figura 12. <i>Relación entre variables en muestras de sangre.</i>	149
Figura 13. <i>Discriminación de elementos en la primera dimensión en muestras de sangre.</i>	151
Figura 14. <i>Discriminación de elementos traza en segunda dimensión en muestras de sangre.</i>	152
Figura 15. <i>Discriminación de elementos traza en tercera dimensión en muestras de sangre.</i>	153
Figura 16. <i>Discriminación entre sumersión (Dim 1) y otras causas de muerte (Dim 2) en muestras de sangre.</i>	154
Figura 17. <i>Relación entre variables en muestras de humor vítreo.</i>	155
Figura 18. <i>Discriminación de elementos en la primera dimensión en muestras de humor vítreo.</i>	156
Figura 19. <i>Discriminación de elementos traza en segunda dimensión en muestras de humor vítreo.</i>	157
Figura 20. <i>Discriminación de elementos traza en tercera dimensión en muestras de humor vítreo.</i>	158



Figura 21. <i>Discriminación entre sumersión (Dim 1) y otras causas de muerte (Dim 2) en muestras de humor vítreo.</i>	159
Figura 22. <i>Diagrama de Venn de proteínas agrupadas por causa de muerte.</i>	160
Figura 23. <i>Número de proteínas expresadas tanto en sumersión como en grupo control, agrupadas por su función biológica.</i>	161
Figura 24. <i>Visión cuantitativa de la normalización de la diferencial expresión de Apolipoproteína A-1.</i>	161
Figura 25. <i>Visión cuantitativa de la normalización de la diferencial expresión de α-1 antitripsina.</i>	162
Figura 26. <i>Diagrama de Venn de proteínas en los casos vs. subanálisis de control de varones.</i>	162
Figura 27. <i>Visión cuantitativa de la normalización de la apolipoproteína A1 expresada diferencialmente en el subanálisis de casos frente a controles en varones.</i>	163
Figura 28. <i>Visión cuantitativa de la normalización de α-1 antitripsina expresada diferencialmente en el subanálisis de casos frente a controles en varones.</i>	163
Figura 29. <i>Diagrama de Venn de proteínas en los casos vs. subanálisis de control de mujeres.</i>	164
Figura 30. <i>Visión cuantitativa de la normalización de la apolipoproteína A1 expresada diferencialmente en el subanálisis de casos frente a controles en mujeres.</i>	164
Figura 31. <i>Visión cuantitativa de la normalización de α-1 antitripsina expresada diferencialmente en el subanálisis de casos frente a controles en mujeres.</i>	165
Figura 32. <i>Niveles plasmáticos de apolipoproteína A1 y α-1 antitripsina comparados en sumersión vs. muestras controles.</i>	166
Figura 33. <i>Curvas ROC de niveles de apolipoproteína y α-1 antitripsina en la predicción de muerte por sumersión.</i>	168





Resumen

En el mundo han aumentado las muertes por sumersión llegando a ser la segunda causa de muerte no intencional. Su diagnóstico en patología forense es un reto en la práctica diaria ya que la ausencia de prueba diagnóstica específica y absolutamente fiable provoca la necesidad de realización de exámenes complementarios a la autopsia médico-legal, tales como investigaciones histopatológicas, biológicas y bioquímicas para identificar la causa de la muerte, por las implicaciones judiciales que se presentan. Los avances en la investigación del análisis de elementos trazan en fluidos biológicos y en medio de sumersión y el estudio de proteínas con expresión diferencial en muertes por sumersión contribuirían al diagnóstico postmortem de sumersión.

Los objetivos fueron analizar concentraciones de elementos traza en sangre y en humor vítreo en casos de sumersión y otras causas de muerte, así como investigar por primera vez el perfil proteómico de casos de sumersión para mejorar el conocimiento de su fisiopatología y su posible aplicación en el diagnóstico y tratamiento en casos de supervivencia.

Material y métodos: La muestra estuvo formada por 137 cadáveres (n=111 casos de sumersión y n=26 casos de otras causas de muerte) cuyas autopsias se realizaron en el Instituto de Medicina Legal y Ciencias forenses de España. La edad media de los sujetos fue 48,58 años y el intervalo postmortem medio 27,87 horas. De cada caso se obtuvieron muestras de sangre de ambos ventrículos y periférica y humor vítreo. En los casos de sumersión se recogió agua del lugar de los hechos. En cada muestra se analizaron litio, potasio, magnesio, bromo, boro, calcio y estroncio mediante las técnicas ICP-MS.

Para el análisis proteómico, mediante la aplicación de tecnologías basadas en la Espectrometría de Masas, identificamos proteínas de expresión que pudieran actuar como potenciales biomarcadores en el diagnóstico postmortem de sumersión. Realizamos un experimento proteómico piloto con inclusión de dos ahogados y dos casos forenses de control, validado en 25 casos, con determinación de apolipoproteína A y α -1 antitripsina.



Resultados: El análisis de diferencias de concentraciones de elementos en sangre reveló mayores concentraciones en muertes por sumersión que en otras causas de muerte salvo en el caso de potasio, junto a concentraciones más elevadas a nivel de ventrículo izquierdo. Las concentraciones de todos los elementos en humor vítreo fueron significativamente superiores en sumersión, salvo para el calcio. En los casos de sumersión hallamos correlaciones estadísticamente significativas entre concentraciones de elementos en sangre, humor vítreo y agua para el litio, calcio y estroncio. No encontramos correlaciones significativas entre el intervalo postmortem y elementos traza en sangre ni humor vítreo en muertes por sumersión.

En el análisis de las curvas ROC en sangre la mayor capacidad discriminante se halló para las concentraciones de estroncio, litio y magnesio, mientras que en humor vítreo se halló para las concentraciones de estroncio, litio, boro, bromo y magnesio. El análisis multivariante reveló concentraciones de estroncio y bromo en ventrículo izquierdo y boro en sangre periférica como factores predictivos en la muerte por sumersión, mientras que en humor vítreo el bromo se reveló como primer factor asociado a la muerte por sumersión.

Tanto apolipoproteína A1 como α -1 antitripsina son factores predictivos independientes de muertes por sumersión.

Evidenciamos correlaciones significativas entre concentraciones de elementos en sangre y humor vítreo. El estudio piloto proteómico revela que tanto apolipoproteína A1 como α -1 antitripsina son factores predictivos independientes de muertes por sumersión.

Conclusiones: La determinación conjunta de elementos traza en sangre y humor vítreo junto a la determinación proteómica de apolipoproteína A1 y α -1 antitripsina contribuiría como pruebas complementarias al diagnóstico de muertes por sumersión en agua salada.

Palabras clave: sumersión; elementos traza en sangre; elementos traza en humor vítreo; proteómica; apolipoproteína A1; α -1 antitripsina.



Summary

Drowning deaths have increased worldwide to become the second cause of unintentional death. Therefore, its diagnosis in forensic pathology is a challenge for our daily practice since the absence of specific and absolutely reliable diagnostic test causes requires complementary examinations to the medical-legal autopsy, such as histopathological, biological and biochemical investigations to identify the cause of death, due to the judicial implications present. Consequently, advances in the research of trace element analysis in biological fluids and in immersion means as well as the study of proteins with differential expression in drowning deaths would contribute to the postmortem diagnosis of drowning.

Our objectives were analyzing concentrations of trace elements in blood and in vitreous humor in drowning cases among other causes of death, as well as investigating for the first time the proteomic profile of drowning cases so as to enhance our knowledge of their physiopathology and their possible application in the diagnosis and treatment in survival cases.

Material and methods: The sample consisted of 137 bodies (n=111 drowning cases and n=26 cases of other causes of death) whose autopsies were performed at the Institute of Legal Medicine and Forensic Sciences of Spain. The average age of the subjects was 48.58 years and the average post-mortem interval was 27.87 hours. In all case, blood samples were obtained from both ventricles and peripheral and vitreous humor. More specifically, regarding drowning cases, water was collected from the scene. We analyzed lithium, potassium, magnesium, bromine, boron, calcium and strontium in each sample by means of ICP-MS techniques.

Concerning proteomic analysis, we identified expresión proteins that coul act as potential biomarkers in the post-mortem diagnosis of drowning through the application of Mass Spectrometry based technologies. Additionally we carried out a pilot proteomic experiment including two drownings and two forensic control cases, validated in 25 cases, with apolipoprotein A and α -1 antitrypsin determination.



Results: The analysis of differences in blood element concentrations in drowning deaths revealed a higher concentration in all elements but potassium along with higher concentrations at the left ventricle level. With regards to vitreous humor, high concentrations were also found in all elements in drowning cases except for calcium. Furthermore, correlation between blood, vitreous and water was evidenced for lithium, calcium and strontium.

No relationship between postmortem interval and trace elements in blood or vitreous humor was found in drowning deaths.

The ROC curves showed the higher discrimination capacity for strontium, lithium and magnesium concentrations in blood; otherwise, in vitreous humor it was found for strontium, lithium, boron, bromine and magnesium concentrations. The multivariate analysis revealed strontium and bromine concentrations in the left ventricle and boron in peripheral blood as predictive factors in drowning death. On the other hand, in vitreous humor bromine was revealed as the first factor associated to drowning death.

Both apolipoprotein A1 and α -1 antitrypsin are independent predictors of drowning death.

The, we showed significant correlations between concentrations of elements in blood and vitreous humor. The proteomic pilot study reveals that both apolipoprotein A1 and α -1 antitrypsin are independent predictors of drowning deaths.

Conclusions: The joint determination of trace elements in blood and vitreous humor together with the proteomic determination of apolipoprotein A1 and α -1 antitrypsin would contribute as complementary tests to the diagnosis of seawater drowning deaths.

Key words: drowning; trace elements in blood; trace elements in vitreous humor; proteomic; apolipoprotein A1; α -1 antitrypsin.





1. INTRODUCCIÓN.



1.1. ASFIXIAS MECÁNICAS.

1.1.1. Concepto.

El término asfixia ha sido utilizado a lo largo de la historia para los casos de insuficiencia respiratoria a consecuencia de un déficit de oxígeno, bien sea en el ambiente o a consecuencia de disminución en el aire respirado. Desde Galeno, cuando se acuñó el término, se conocen las asfixias, aunque eran catalogadas como las muertes ocurridas por paro cardíaco.

Asfixia procede del griego *asphyxia* (ἀσφυξία, a-negativo, *sphyxia*-pulso), definiéndose como falta de pulso en las muertes súbitas (1). Así, todas las muertes se producen por asfixia debido a que la sangre se para, y, por lo tanto, no se oxigenan los distintos órganos del organismo provocando su déficit y la detención de la respiración celular. Aunque el resultado final sea este, la causa que produce el cese en la respiración celular es la que determina la causa fundamental en la muerte de una persona (2). Actualmente se utiliza *anoxia* (como ausencia de total de oxígeno) o *anoxemia* (como disminución de la cantidad de oxígeno) para designar la ausencia de oxígeno en el intercambio gaseoso.

En términos médico legales la asfixia se define como la falta de oxígeno en la sangre o el fracaso de las células para utilizar oxígeno, y un fallo del cuerpo para eliminar el dióxido de carbono de tal manera que lo que ocurre como mecanismo último en el fallecimiento es el déficit total de oxígeno o *anoxia* (2). La falta de oxígeno puede ocurrir por mecanismos distintos, dependiendo del nivel en el que se ocurra (3):

- *Anóxica*: disminución de concentración de oxígeno en la sangre (déficit en aire respirado, obstrucción al flujo de aire o de enfermedad pulmonar).
- *Isquémica* o *circulatoria*: déficit en una dificultad para que la sangre llegue a los distintos órganos y tejidos (a consecuencia de fallo cardíaco o shock).
- *Anémica*: incapacidad de la sangre para transportar el oxígeno (en anemias, intoxicaciones por monóxido de carbono o butano).



- **Histotóxica:** ocurre a nivel celular; aunque llegue el oxígeno del medio exterior, se transporte y llegue al órgano o tejido, las células no son capaces de usarlo por alteración a nivel de la respiración celular (intoxicación por ácido cianhídrico).

De los cuatro tipos de asfixias que se pueden producir son las anóxicas las más frecuentes en el ámbito de la medicina legal. Se reúnen dentro de las asfixias mecánicas, aunque no todas ocurren por un mecanismo anóxico sino como resultado de una isquemia encefálica (3).

1.1.2. Fisiopatología de las asfixias.

Para definir la asfixia hay que tener en cuenta la disminución de oxígeno y el aumento de dióxido de carbono que son los causantes de la anoxia (a-sin y oxia-oxígeno). Las circunstancias que dan lugar a dificultades para la entrada de aire, y consecuentemente oxígeno, en el cuerpo humano, como queda reflejado en la imagen 1, se puede originar por la existencia de (4):

- Obstrucción mecánica a nivel de vía aérea superior (boca y los orificios nasales cubiertos con una almohada), en la laringe o tráquea (por comida, vómito, cuerpo extraño).
- Oclusión extrínseca del cuello (estrangulación a mano, a lazo o por ropa, o bien ahorcadura).
- Déficit de oxígeno respirable (sumersión e inhalación de gases).
- Desplazamiento del oxígeno por fármacos (morfina).
- Compresión torácica (tanto por mecanismo accidental, suicida u homicida).

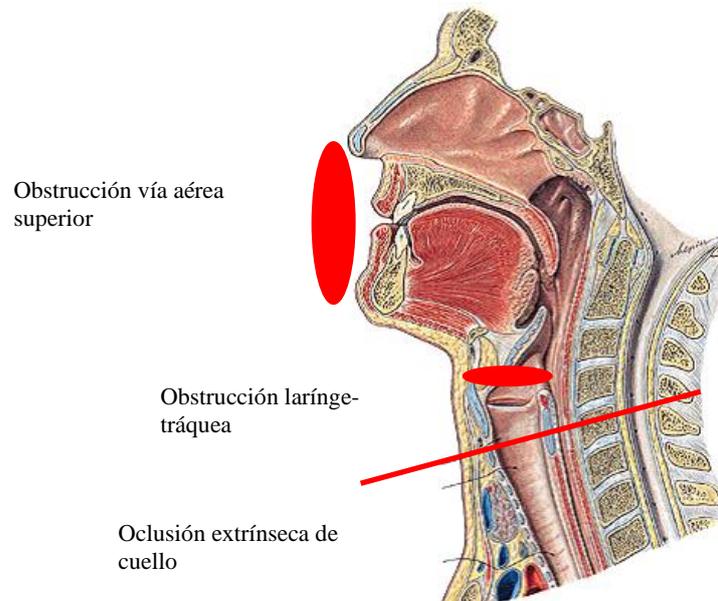


Imagen 1. Sección transversal vías respiratorias. Obstrucciones al paso del aire. Imagen tomada de Sobotta (5).

Cuando disminuye el oxígeno en la circulación sanguínea el metabolismo celular pasa a ser anaeróbico causando la producción de ácido láctico y dando lugar a acidosis metabólica, aumento de dióxido de carbono y dificultad en la eliminación de éste desde las células que va a determinar la producción una acidosis respiratoria. Todo esto conlleva una disminución del pH.

A su vez, el acúmulo de productos derivados en el metabolismo celular alterado da lugar a hipoxia-anoxia, terminando en la muerte celular y daño neuronal como manifestación de encefalopatía hipóxico-isquémica.

1.1.3. Clasificación.

La clasificación de las asfixias a nivel médico legal se puede considerar dependiendo de (imagen 2):

- Naturaleza del medio mecánico que las origina (3):
- ❖ Asfixias por acción mecánica externa:

- Sobre el cuello:
 1. Ahorcadura.
 2. Estrangulación a mano o a lazo.
- Sobre orificios respiratorios: oclusión de los mismos.
- Sobre tórax.

- ❖ Asfixias por penetración de sustancias extrañas en vías respiratorias:
 - Sólidos: enterramiento o aspiración de cuerpos extraños.
 - Líquidos: sumersión.
 - Gases: aire enrarecido, confinamiento y gases inertes.

- Contexto médico forense (6):
 - ❖ Sofocación: por oclusión de orificios respiratorios, oclusión intrínseca de vías respiratorias o carencia de aire respirado.
 - ❖ Estrangulación: por cierre de vasos sanguíneos y/o vías respiratorias en el cuello por su compresión externa. Puede practicarse la presión con manos, antebrazos, banda de constricción en la que no actúe el peso corporal del propio sujeto que la sufre o mediante la constricción en la que actúe el peso corporal (ahorcadura).
 - ❖ Asfixia mecánica: por restricción de movimientos respiratorios bien por compresión externa del pecho o a consecuencia de la posición del cuerpo.
 - ❖ Sumersión: a consecuencia de la introducción de medio líquido en las vías respiratorias.

- Mecanismo asfíctico (7):
 - ❖ Asfixia, entendida como disminución de la cantidad de oxígeno que penetra en vías respiratorias:
 - Atmósfera viciada.
 - Vía aérea externa: sofocación.
 - Vía aérea interna:
 1. Asfixia por aspiración.



2. Inflamación u obstrucción de las vías respiratorias: anafilaxia, infección, química, neoplasia, traumatismo, broncoespasmo.

- ❖ Compresión del cuello:
 - Ahorcadura.
 - Estrangulación: a mano o a lazo.

 - ❖ Compresión torácica.
 - ❖ Asfixia posicional.
 - ❖ Asfixia química: monóxido de carbono y cianuro.
- Etiología (8,9):
 - ❖ Ausencia o reducción de la presión de oxígeno en la atmósfera o sustitución por un gas inerte.
 - ❖ Oclusión de los orificios externos respiratorios.
 - ❖ Bloqueo del tracto respiratorio.
 - ❖ Restricción de los movimientos respiratorios del tórax.
 - ❖ Enfermedades pulmonares que impiden o reducen el intercambio gaseoso.
 - ❖ Reducción de la función cardíaca provocando incapacidad para mantener el flujo circulatorio. Disminución de la capacidad de transporte de oxígeno por la sangre.
 - ❖ Incapacidad de las células para utilizar el oxígeno.



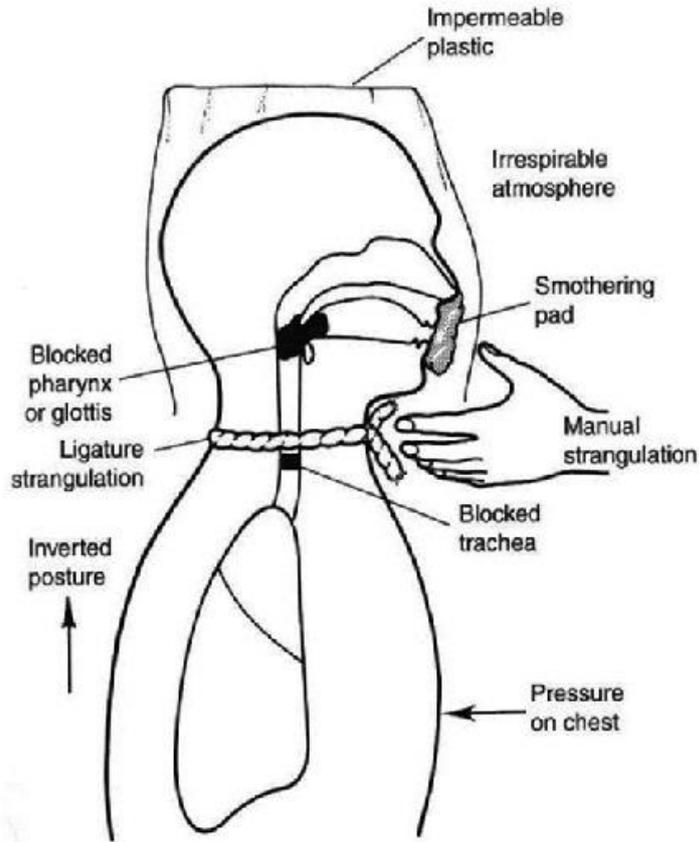


Imagen 2. Tipos de asfixias mecánicas. Tomado de Knights Forensic Pathology (8,9).

1.1.4. Hallazgos patológicos generales en las muertes por asfixia.

Todas las muertes que ocurren por un mecanismo asfíctico muestran características generales similares, sin embargo, se evidencian hallazgos específicos dependiendo del origen fundamental que provocó el cuadro responsable del fallecimiento. El progreso de la medicina legal y el conocimiento profundo de las reacciones que ocurren en el cadáver, han hecho que hallazgos que se consideraban como patognomónicas de un tipo de muerte hayan sido descartadas y se consideran como un hallazgo más en el estudio de la causa de la muerte, siendo inespecíficos.

Así Knight en 1991 (10) señaló los siguientes signos clásicos de las asfixias como “quinteto diagnóstico obsoleto”:

- Hemorragias petequiales.
- Congestión visceral.
- Cianosis.
- Edema pulmonar.
- Fluidez sanguínea.

Todo ello fue el resultado de que no todos los signos pueden ser observados en el cadáver debido a que la duración del proceso y la respuesta individual provocan que alguno de los signos no se observe en la autopsia. Así, por ejemplo, en el caso de un cadáver de un ahogado en el que ha habido un cierre de la glotis no se evidenciaría edema pulmonar en la realización de la autopsia o, en el caso de hallarlo, no sería de entidad suficiente como para el diagnóstico de muerte por sumersión por no haber paso de agua a vías respiratorias.

Se pueden diferenciar en el fallecido por mecanismo asfíctico hallazgos externos y hallazgos internos.

1.1.4.1. Hallazgos externos.

1. Fenómenos cadavéricos: son aquellos que ocurren en el cuerpo sin vida a partir del momento en el que cesan los procesos bioquímicos vitales, quedando a la acción de influencias ambientales (11-13):
 - Enfriamiento cadavérico: el cuerpo pierde temperatura corporal. Se ve influenciado por la causa de la muerte, circunstancias individuales y ambientales. En el caso de las muertes asfícticas suele existir un retardo en el enfriamiento.
 - Livideces cadavéricas (imagen 3): ocurridas por el cese de la circulación y de aparición en los planos declives. En las asfixias son de color rojo oscuro salvo en la sumersión que son más rosadas, de mayor intensidad porque la sangre no coagula con rapidez, más extensas y de aparición



precoz a consecuencia de la liberación de catecolaminas. Son frecuentes las livideces paradójicas (en regiones no declives).

- Rigidez cadavérica: definido por Lacassagne como “*estado de dureza, retracción y tiesura que sobreviene a los músculos después de la muerte*”. Suele ser intensa, tardía y duradera, siguiendo la Ley de Nysten, salvo si existen fenómenos convulsivos en el que sería precoz, intensa y duradera.
- Putrefacción: por la acción de las bacterias, consistiendo en fermentación pútrida. En casos de asfixia suele ser más rápida de lo habitual.



Imagen 3. Livideces rosadas y restos de arena en sumersión en agua salada.

2. Cianosis: procede del griego y significa “azul oscuro”. El color de la sangre depende de la cantidad absoluta de oxihemoglobina y hemoglobina reducida presente en los eritrocitos. El color rosado normal de la piel puede cambiar a púrpura o azulado cuando la cantidad de oxígeno es pobre. Suele ser generalizada y más intensa en cara y cuello (imagen 4).



Imagen 4. Cianosis facial.

3. Equimosis externas: extravasaciones puntiformes de sangre en piel (imagen 5), esclerótica o conjuntiva. Fueron descritas por primera vez por Tardieu en el siglo XIX. Su origen se encuentra en un aumento agudo en la presión venosa que causa sobredistensión y ruptura de paredes de venas periféricas, especialmente en el tejido laxo, dando lugar al paso de los glóbulos rojos a través el endotelio capilar (14). Algunos autores sugieren que son consecuencia de hipoxia junto con un mecanismo de aumento de la presión encefálica en el caso de las petequias conjuntivales (15). Se observan con mayor frecuencia en la cara (imagen 6) y en los ojos. Pueden desaparecer conforme avanza el periodo postmortal. Betz et al (16) demostraron que en la putrefacción y la inmersión en agua dulce las petequias podían desaparecer. Pueden observarse en muertes de origen natural y estar ausentes en muertes asfícticas como la sumersión y en algunos tipos de sofocación. Ely y Hirsch (17) sugieren que dichas petequias son causadas por fenómenos vasculares mecánicos, no estando en relación con mecanismos de hipoxia o asfixia.

Hay que evaluar la presencia de enfermedades médicas que lo justifiquen (meningitis) en el caso de petequias en la superficie corporal, posición en decúbito prono del fallecido en el caso de las petequias conjuntivales o la realización de maniobras de reanimación cardiopulmonar (18).



Imagen 5. Petequias en miembros inferiores.



Imagen 6. Petequias en mucosas.

4. Exoftalmia y protusión lingual (imagen 7): no son constantes en todas las muertes asfícticas, siendo más frecuentes en la ahorcadura. Deben ser inspeccionadas para evitar confundirlas con periodos evolutivos en la putrefacción cadavérica.



Imagen 7. Protusión lingual.

5. Hongo de espuma: se localiza en orificios nasales y en la boca (imagen 8 y 9). Formado por burbujas finas, difíciles de deshacer y que en ocasiones se encuentran teñidas de sangre, aunque usualmente son de color blanquecino; son resultado de la mezcla con la sangre por hemorragia intrapulmonar. Su origen se encuentra en el edema pulmonar y en un exudado proteico. Características de las muertes asfícticas por sumersión, aunque no específicas ya que pueden aparecer en otras muertes asfícticas, en muertes naturales y violentas que conlleven edema agudo de pulmón (muertes cardiacas, reacción adversa a sustancias psicoactivas como la cocaína, barbitúricos, etc).



Imagen 8. Hongo de espuma en cavidad bucal.



Imagen 9. Hongo de espuma en orificios nasales.

1.1.4.2. Hallazgos internos.

- 1) **Fluidez de la sangre:** en autopsias por asfixias ha sido considerado un signo clásico; no obstante, la formación de coágulos tanto en las cavidades cardiacas como en el sistema venoso y su posterior disolución por la acción de enzimas fibrinolíticas es errático (19), por lo que no debe ser considerado patognomónico de las muertes por asfixia. Según Di Maio y Vanezis (1,20) este proceso ocurre siempre que la muerte sea rápida debido probablemente a aumento de catecolaminas y enzimas fibrinolíticas. Para Klaubert (21) la fluidez de la sangre en un cadáver depende de la existencia de activación de la fibrinólisis antes de la coagulación y está relacionado con la existencia de un pH fisiológico.
- 2) **Comportamiento metabólico:** se ha encontrado aumento de los ácidos grasos libres, fosfoglicéridos, fosfolípidos y catecolaminas junto con descenso de triglicéridos (22,23). En líquido pericárdico se ha estudiado la correlación existente entre los

hallazgos histopatológicos en los casos de asfixia con los valores de catecolaminas, adrenalina y noradrenalina (24). Lorente et al. (25) encontraron en estudios experimentales con animales un aumento de catecolaminas, sin embargo, están influenciadas por la autólisis postmortem en la sangre (26).

3) Aumento de las cavidades derechas del corazón: totalmente inespecífico, ocurre en todas las muertes con considerable congestión. Sucede como consecuencia de aumento de la presión venosa intracardiaca (10,27). También podemos encontrar petequias equimóticas en superficie cardiaca además de timo, pericardio, pericráneo, no siendo específicas de las asfixias, sino que se observan en intoxicaciones, infecciones, traumatismos, etc.

4) Pulmones:

a) Congestión e hiperemia: signo clásico de las asfixias, pero tan inespecífico como ocurre con las petequias hemorrágicas. Ocurre a consecuencia de la obstrucción en el retorno venoso y a la vasodilatación. En la sección, los pulmones presentan gran contenido hemático, muy fluido y rojo oscuro (3,10). No debe considerarse patognomónico observándose tanto en muertes naturales como violentas en las que se produce vasodilatación.

b) Enfisema (imagen 10): asociado a dilatación bronquial o broncoconstricción. Es más característico de las muertes por sumersión y de las asfixias por estrangulación (28).





Imagen 10. Enfisema hidro-aéreo pulmonar.

- c) Petequias: se observan en muertes no asfícticas, sobre todo en las cisuras. En el pulmón reciben el nombre de “equimosis de Tardieu”, pequeñas y de color rojo oscuro estando bien delimitadas o formando sufusiones hemorrágicas irregulares, en líneas o estrellas y de tamaño más grande. Están formadas por difusión de sangre coagulada adherida al tejido en toda la superficie pulmonar. Las manchas de Paltauf (imagen 11) son hemorragias petequiales de mayor tamaño, de coloración más clara y mal delimitadas, siendo características de la muerte asfíctica por sumersión. Son manchas asfícticas que se han hemolizado a consecuencia de la entrada de agua en la sumersión (29). Un caso especial son los núcleos apopléticos como consecuencia de la rotura de tabiques interalveolares a consecuencia de los esfuerzos respiratorios (30).

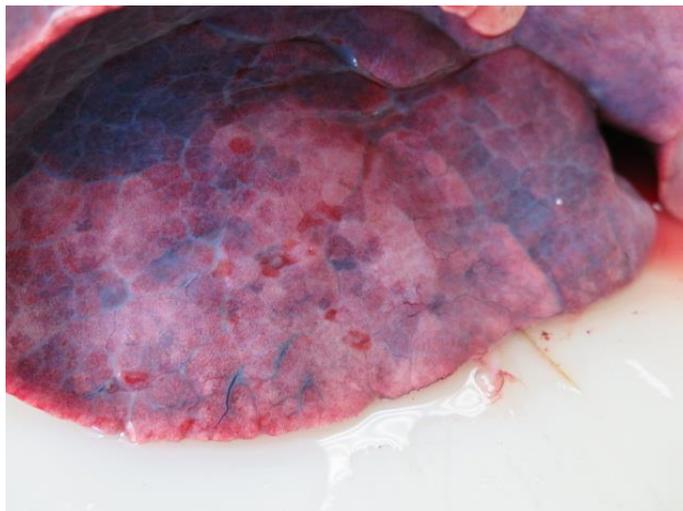


Imagen 11. Manchas de Paltauf.

- d) Edema pulmonar (imagen 12): resultado de la hipoxia y el aumento de presión a nivel pulmonar. No es específico de las muertes por asfixia, hallándose en muertes cardíacas o en intoxicaciones por drogas de abuso o medicamentos.

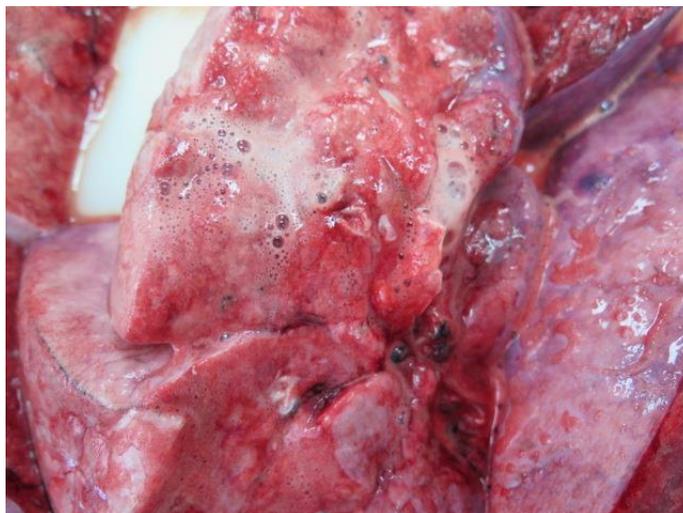


Imagen 12. Edema Pulmonar.

- e) Espuma aireada: de burbujas finas y sanguinolentas en laringe, tráquea y bronquios (imagen 13), a consecuencia del batido de los cilios en un intento por expulsar el agua de los alveolos (31).

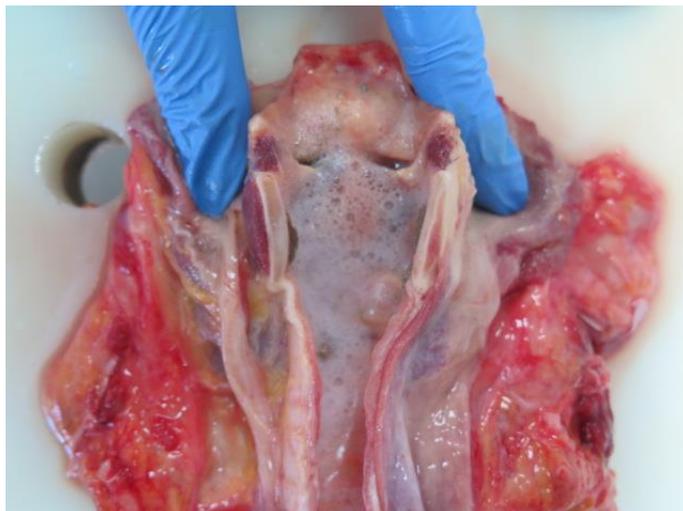


Imagen 13. Espuma en laringe y tráquea.

- 5) Congestión visceral generalizada: por obstrucción al retorno venoso, no siendo específico de las asfixias. Se asocia a edema si la obstrucción venosa es continua; resultado de la trasudación por el capilar y las vénulas.

- 6) Sistema nervioso:
 - a) Edema cerebral (imagen 14): a consecuencia del aumento de presión a nivel de los vasos encefálicos y de las mismas características que el edema pulmonar.

 - b) Hiperemia venosa a nivel de encéfalo y meninges siendo un hallazgo inespecífico (imagen 14).



Imagen 14. Edema cerebral e hiperemia.

- c) Dilataciones vasculares en la sustancia blanca; se conocen como “enarenado hemorrágico” (imagen 15) siendo el resultado de pequeños focos hemorrágicos.



Imagen 15. Enarenado hemorrágico.

- 7) Estasis venosa generalizada: con dilatación venosa capilar. Es un fenómeno general e inespecífico.
- 8) Vísceras abdominales: equimosis subcutáneas similares en forma y patogenia a las equimosis de Tardieu sobre todo en estómago, duodeno y yeyuno. A nivel hepático

da lugar al “hígado en nuez moscada” (imagen 16), con la presencia de dilataciones vasculares (punteado rojo) rodeado de áreas de coloración pálida. Por último, el bazo aparece pequeño, con cápsula arrugada y parénquima escaso en sangre.

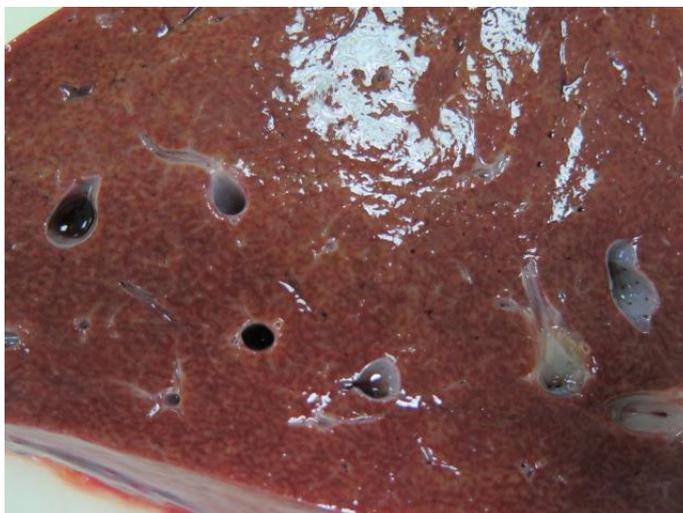


Imagen 16. Hígado en nuez moscada.

1.2. MUERTES POR SUMERSIÓN.

1.2.1. Concepto de sumersión.

Los estudios sobre la sumersión comenzaron a principios del siglo XX y desde ese momento son cuantiosos los estudios con el fin de encontrar tanto a nivel macroscópico, microscópico y biológico un diagnóstico en positivo. A lo largo de esta evolución se han formulado diversas definiciones de la muerte por sumersión.

Dentro de la naturaleza de la muerte es siempre una muerte de origen violento cuya etiología médico legal puede ser tanto accidental (catástrofes naturales, accidentes deportivos, accidentes acuáticos), suicida u homicida. El problema que plantea el diagnóstico es doble: por un lado, obtener un diagnóstico definitivo de la causa de la muerte y por otro lado determinar las circunstancias en las que se hubiera producido. Esto ha llevado al médico forense al estudio minucioso del cadáver en los casos de sumersión pues las lesiones que presenta pueden ser confundidas y llevar a incluir una muerte dentro de una etiología homicida siendo accidental o viceversa y a la realización de estudios complementarios tanto histopatológicos, toxicológicos y biológicos además del estudio de las circunstancias del hecho (32).

Entre las más antiguas (1918) encontramos la definición de Roll (33) como *“el resultado de obstaculizar la respiración por obstrucción de la boca y la nariz por un medio fluido, generalmente agua”*. Model (34) diferenció la sumersión (drowning), entendida como sofocación por sumersión, del *casi ahogamiento* o *near drowning*, en la que existe supervivencia al menos temporal. Thoinot (35) definía la sumersión como asfixia por penetración de materia líquida o semilíquida en vías respiratorias, si bien hallaba casos en los que no había presencia de materia líquida o semilíquida que recaerían en las muertes por inhibición. Simonín (36) define la muerte por sumersión como *mecanismo de muerte por respirar bajo el agua o perder la respiración bajo el agua*.

Como consecuencia del aumento de actividades deportivas en medio acuático, la sumersión ha adquirido gran importancia como causa de muerte violenta, encontrándose 20 definiciones distintas para sumersión entre 43 artículos revisados (37). Así se celebró



el Primer Congreso Mundial sobre asfixia por sumersión en Ámsterdam el 26 de junio de 2002, quedando definida 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*” (38,39) y se acordó eliminar el concepto near drowning como tal (supervivencia inmediata que sigue a la asfixia debida a sumersión en medio líquido y que puede dar lugar a la recuperación completa o a la persistencia de secuelas tanto leves como severas).

Desde un punto de vista médico-legal se definió como el impedimento de la respiración por un impedimento acuoso o semiacuoso que impide la hematosis (40). Concheiro y Suárez (3) la definían como *la muerte o trastorno patológico producidos por la introducción de un medio líquido, habitualmente agua, en las vías respiratorias.*

En estas definiciones se diferencia el mecanismo de muerte de la sumersión de la hidrocución teniendo en cuenta la fisiopatología de la sumersión en sí misma. La introducción de material semiacuoso como mecanismo de muerte producido por sumersión fisiopatológicamente se asemejaría más a una muerte por sofocación por obstrucción intrínseca de la vía aérea que a la sumersión como se explicará más adelante.

1.2.2. Tipos de sumersión (41).

1. Según su curso evolutivo:

- **Primaria:** cuando la muerte sigue inmediatamente a la sumersión.
- **Secundaria:** si el resultado de la penetración líquida es tan solo un trastorno patológico, que puede o no causar la muerte en un momento posterior.

2. Según la superficie corporal incluida en el medio líquido:

- **Completa:** totalidad del cuerpo se encuentra cubierta por el medio líquido.
- **Incompleta:** si sólo la cabeza o en casos extremos solo los orificios respiratorios se encuentran cubiertos por el medio líquido.



3. Según la naturaleza del medio líquido donde ocurre la sumersión.
 - En agua dulce.
 - En agua salada.

4. Según la cantidad de agua hallada en los pulmones:
 - Asfixia por sumersión: cuando se hayan grandes cantidades.
 - Asfixia por inhibición: sin presentar líquido en los pulmones.

5. Según si existen o no testigos del hecho:
 - Con testigos: cuando se observa a la víctima desde el inicio de la sumersión.
 - Sin testigos: cuando la víctima se encuentra en el agua y nadie vio lo que ocurrió.

6. Según la fisiopatología de la muerte (29):
 - Sumersión-asfixia: la víctima fallece directamente por el efecto de la aspiración de agua por las vías respiratorias, produciéndose el choque alveolar.
 - Sumersión-inhibición: el mecanismo inhibitorio se produce por la estimulación de zonas reflexógenas, produciéndose la muerte generalmente de forma instantánea.
 - Sumersión simple: en la que los pulmones se encuentran sin agua, secos, pero existe gran cantidad de agua en estómago y duodeno a consecuencia del cierre brusco de la epiglotis obstruyéndose la entrada de agua en las vías aéreas.
 - Sumersión traumática: el mecanismo de la muerte se produce por la pérdida de conciencia a consecuencia de trauma que provoca que la víctima aspire agua sin percatarse de ello (31).

1.2.3. Datos epidemiológicos.

El ahogamiento se encuentra entre las 10 causas de principales de muerte en niños y jóvenes en todas las regiones del mundo. Más de la mitad de las víctimas tienen menos de 25 años (42). Según la Organización Mundial de la Salud y el European Resuscitation



Council se producen 450.000 muertes al año por ahogamiento, con una tasa de mortalidad de 6.8/100000 habitantes, siendo la segunda causa de muerte accidental, superada por los accidentes de tráfico. Es la tercera causa de muerte accidental en Estados Unidos, alrededor de 8000 personas (50% en piscinas, 20% en el mar y 15% en el hogar) (42); en España y según datos del Instituto Nacional de Estadística ocurrieron 459 casos (última actualización 2014), alcanzando una tasa promedio de 5.757/100000 hab./año según los datos de 2015 (43).

La muerte por sumersión se considera la segunda causa de muerte en niños, después de los accidentes de tráfico, ocurriendo casi el 50% en lagos, estanques y ríos, aunque en piscinas privadas ocurren la mayor parte en algunas regiones. Son más frecuentes los fines de semana durante el verano (44). Según casuísticas de Australia, Finlandia y Reino Unido, es la segunda causa de muerte entre el grupo de edad comprendido entre 1-4 años (45,46). Los niños menores de 15 meses se ahogan en baldes y bañeras, los mayores de 15 meses y hasta los 4-5 años en piscinas privadas, en lagos, ríos y lugares públicos los adolescentes (47).

Se aprecia que la cifra de muertes por sumersión está infravalorada ya que muchos de los casos no son informados (48).

Como factores de riesgo se recogen por DeNicola (48) los siguientes:

- Edad: menor de 20 años y en especial menores de 4 años (49).
- Enfermedades preexistentes: epilepsia, enfermedad coronaria, accidentes cerebrovasculares, hipoglucemia aguda (50-53).
- Consumo de alcohol y drogas (54-56). El alcohol ha sido implicado entre 25-50% de las muertes en adolescentes y adultos relacionadas con actividades acuáticas (57).
- Sexo: predominio en varones (58).
- Falta de supervisión adulta en el caso de niños (59).
- Traumatismo de cabeza y cuello (60,61).

Además, la Organización Mundial de la Salud añade el siguiente:



- Ausencia de barreras para restringir la exposición al agua, no saber nadar y no ser demasiado consciente de los peligros del agua.

Según las regiones mundiales, la Organización Mundial de la Salud encuentra que es más frecuente en varones y mujeres en Asia sudoriental, seguida por región de África en varones y región del pacífico occidental en mujeres (tabla 1).

REGIÓN	HOMBRES	MUJERES
PAÍSES DE ALTOS INGRESOS	26258	8197
REGIÓN DE ÁFRICA	50650	24819
REGIÓN DE LAS AMÉRICAS	14539	3026
REGIÓN MEDITERRÁNEO ORIENTAL	18795	10690
REGIÓN DE EUROPA	8781	2340
REGIÓN DE ASIA SUDORIENTAL	87782	42368
REGIÓN DEL PACIFICO OCCIDENTAL	42978	30476

Tabla 1. Defunciones por ahogamiento según WHO (2012) (42).

1.2.4. Etiología médico legal.

La muerte por sumersión es por definición una muerte de naturaleza violenta (aquella que se produce por causas externas al individuo) cuya etiología médico legal puede ser de tres tipos (tabla 2):

- Accidental: la más frecuente de todas. Tiene una mayor incidencia en los meses de verano (62,63), en menores de 5 años y en jóvenes con edades entre 15-44 años, sobre todo en varones y con gran frecuencia va asociada al consumo de alcohol y otras drogas (37), y en ancianos (64) (siendo el mecanismo de muerte



la hipotensión transitoria al incorporarse el sujeto para salir del baño tras vasodilatación debida a la elevada temperatura del agua). En estos casos se incluyen todos los derivados de accidentes colectivos (naufragios, inundaciones, accidentes aéreos, de automóvil con caída posterior) y deportivos (65).

En relación al consumo de alcohol, Luneta et al. (45) encontraron un 33% de los ahogados en Finlandia con alcohol en sangre superior a 1g por mil, mientras que Driscoll (55) en Australia también encontraron alto porcentaje de casos relacionados con el alcohol (19%).

- Suicida: no suele ser el mecanismo de elección en los casos suicidas si bien existe una mayor incidencia en áreas geográficas costeras, grandes lagos o ríos (66,67). Existe mayor incidencia en mujeres y de grupos de edad avanzada. También se asocia con gran frecuencia al consumo de alcohol y drogas (68-72). La mayoría de los autores coinciden en que representan un 1% de las formas de suicidio (73). En nuestro país, Romero Palanco (37) en una revisión en 2007 establece como conclusiones el paulatino abandono de este procedimiento suicida.
- Homicida: menos frecuente al necesitar gran desproporción, ya sea física o mediante la administración de alcohol o traumatismos, entre víctima y agresor. Por su difícil demostración obliga a aumentar la precaución en la búsqueda de lesiones previas y restos de tóxicos depresores del sistema nervioso central, siendo necesario el diagnóstico diferencial con la etiología suicida (74). Tras revisión de 2617 homicidios (72) Copeland encontró un total de 12 casos por sumersión, constatando su baja frecuencia. Sin embargo, es mayor su incidencia en niños, disminuidos psíquicos y sujetos con vulnerabilidad (75,76).



Tabla II: ETIOLOGÍA DE LAS MUERTES POR SUMERSIÓN					
Autor	N° casos	Accidentes	Suicidios	Homicidios	Indeterm.
Press et al [34]	1.201	84.6%	3.6%	0.33%	11.32%
Wirthwein et al [35]	1.303	90.5%	4%	2.5%	3%
Wintemute et al [36]	137	95%		1%	4%
Gamero et al [37]	314	57%	42.67%	0.33%	
Gorniak et al [20]	187	78%	14%	3%	6%
Lucas et al [38]	123	13%	42.2%	4.06%	40.6%
Davis [29]	267		9.36%		

Tabla 2. Etiología de las muertes por sumersión. Tomada de Romero Palanco 2007 (37).

1.2.5. Data de la sumersión.

Establecer el tiempo que se ha mantenido un cuerpo en el agua presenta gran dificultad debido a que los fenómenos cadavéricos empleados para datar a un cadáver no siguen la misma evolución en medio acuático y presenta múltiples variaciones, así por ejemplo a temperaturas bajas los fenómenos destructivos se enlentecen. También hay que tener en cuenta que se aceleran notablemente una vez que se extrae el cuerpo del agua. Además, la data de la muerte puede no coincidir con la data de la sumersión (debido al periodo de supervivencia que puede ocurrir). Así, según la regla de Casper (12), a igualdad de condiciones de temperatura y en un mismo lugar, una semana de putrefacción en el aire equivale a dos semanas en el agua y a ocho semanas en tierra. Esta diferencia no es absoluta, pero sirve para mostrar la variación de los fenómenos en los distintos medios.

Existen distintas tablas en las que se valoran parámetros a tener en cuenta para datar la permanencia de un cadáver en agua:



a) Tablas de Devergie (77): es la clásica por excelencia y se diferencian por los signos externos del cadáver en meses de verano e invierno, con características diferentes como (30):

- Invierno:
 - De 3-5 días: rigidez, enfriamiento y comienzo de blanqueo cutáneo.
 - De 4 a 8 días: flexibilidad, color natural, blanqueo de cara palmar de las manos.
 - De 8 a 12 días: flacidez, comienzo de blanqueo de dorso de mano, cara lívida y reblandecida.
 - Hacia los 15 días: ligera tumefacción facial, roja en algunas partes, tinte esternal verdoso, toda la epidermis blanca y comienzan a aparecer las arrugas de pies y manos.
 - Al mes: color pardo-rojizo de la cara, placa parecida en el pecho, párpados y labios verdes, manos y pies blancos y arrugas.
 - Hacia los dos meses: cara parduzca y tumefacta; cabellos poco adherentes, epidermis de manos y pies desprendida, permanencia de las uñas.
 - A los dos meses y medio: epidermis y uñas de las manos desprendidas, aunque no las de los pies, matiz rojo de tejido celular del cuello y mediastino, saponificación parcial de cara y mentón.
 - A los tres meses y medio: se destruye parcialmente el cuero cabelludo, párpados y nariz, saponificación en parte de la cara, parte posterior de cuello e ingles, corrosiones cutáneas por todo el cuello, epidermis desprendida por completo de manos y pies, con las uñas caídas.
 - A los cuatro meses y medio: saponificación casi completa de la grasa facial del cuello, ingles y parte anterior de los muslos, comienzo de saponificación de la parte anterior de cuello, desprendimiento de cuero cabelludo y cráneo denudado.



- Verano: en el caso de que el cuerpo haya salido a flotación los siguientes comentarios no serían útiles.
 - De 5 a 8 horas de permanencia en verano corresponderían a 3-5 días de invierno.
 - 24 horas de verano equivaldrían a 4-8 días de invierno.
 - 96 horas en verano equivaldría a 15 días en invierno.

b) Tabla compuesta por Reh (78) a partir de datos tanatológicos después del estudio de 395 cadáveres extraídos del agua, en las que se tiene en cuenta entre otras la temperatura media del agua, red venosa superficial, cadáver hinchado, cambios cromáticos, cabellos y epidermis desprendidos, maceración de manos y pies, uñas sueltas y desprendidas, etc. según cada mes del año. De las tablas propuestas la de Reh es la más precisa.

Otra propuesta se basa en la medir las concentraciones de potasio y cloro en humor vítreo y aplicar la fórmula propuesta por Bray (79):

$$\text{PMI (días)} = 100 \text{mEq/L} + 2 [\text{k}] - [\text{Cl}]/10$$

Es importante conocer que esta fórmula es de aplicación en aguas frías y con intervalo postmortem superior a 1 día; además el propio autor da un margen de error inferior a 0,5 días.

Se han intentado otros métodos como el grado de desarrollo de larvas de mosquitos (80) o la saponificación de los cadáveres sin resultados óptimos debidos a la amplia variación hallada.

1.2.6. Fisiopatología y mecanismos de muerte.

Los primeros informes corresponden a estudios en animales realizados por Brouardel y Vibert (81) y Brouardel y Loye (82) los cuales describieron cinco fases en



la asfixia por sumersión: inspiración forzada, agitación violenta con detención de la respiración, reaparición de respiración con profundas inspiraciones, nueva parada de respiración y tres o cuatro movimientos respiratorios con contracciones en hocico y mandíbula.

La combinación de hipercapnia, hipoxemia y acidosis provoca inspiración involuntaria dando lugar a inhalación e ingestión de líquido hacia vías respiratorias. La estimulación por el dióxido de carbono del centro respiratorio conlleva la inhalación e ingestión de agua hasta que el sujeto no puede inhibir voluntariamente la respiración más de un minuto. Si la persona no es rescatada, la hipoxemia lleva a la pérdida de conciencia y apnea provocando taquicardia seguida de bradicardia, actividad eléctrica sin pulso y asistolia en pocos minutos, pero si la inmersión es en agua helada puede durar hasta una hora (83). Todo esto da lugar a hipoxia cerebral que finaliza con la muerte por anoxia. Pueden producirse alteraciones profundas en la oxigenación arterial cuando se aspiran tan sólo de 1 a 2.2 ml/kg de agua de los pulmones (84,85).

El agua en los alveolos causa un lavado en los alveolos (disfunción y eliminación del surfactante) y el gradiente osmótico destruye la integridad de la membrana alveolocapilar, aumentando su permeabilidad y alterando el flujo de líquidos, plasma y electrolitos; se produce edema pulmonar masivo que disminuye el intercambio de oxígeno y anhídrido carbónico. Esto conduce a una disminución de la distensibilidad pulmonar, atelectasia y broncoespasmo (86).

A consecuencia de mecanismos fisiopatológicos diferentes, se diferencia la asfixia por sumersión de la muerte en agua con pulmones secos.

1. Asfixia por sumersión:

Zangani et al. (87) describen cinco fases en los casos de asfixia por sumersión:

- Fase de sorpresa, en la que se efectúa una profunda inspiración fuera del agua.



- Fase de apnea, para evitar la penetración de agua por el laringoespasma involuntario como consecuencia de la presencia de agua en la vía aérea. Debido al impedimento de la respiración se produce hipoxia, hipercapnia y acidosis.
- Fase de disnea en la que se realiza inhalación de agua seguida de disnea espiratoria por estimulación del agua sobre la mucosa laríngea.
- Fase de convulsiones asfícticas, en la que el agua continúa entrando de forma discontinua en las vías respiratorias.
- Fase terminal en la que se realizan una o más inspiraciones profundas que van precedidas de pausa respiratoria preterminal.

Casi en el 10% de los animales estudiados el laringoespasma inicial continuó hasta la muerte sin que se produjera broncoaspiración de líquidos, produciéndose estas muertes por laringoespasma cursando por tanto sin inhalación de agua (44). Estos casos son catalogados como “ahogados atípicos” (88) en el que el mecanismo de la muerte sería la asfixia secundaria al intenso laringoespasma por la entrada de grandes cantidades de agua a los pulmones. No obstante, Knight (10) considera que la muerte en estos contextos ocurre por paro cardíaco de origen vagal antes que por espasmo laríngeo.

En los alveolos el agua se mezcla con el aire residual y secreciones pulmonares provocando la formación del hongo de espuma que va a invadir las vías respiratorias y puede exteriorizarse por orificios nasales y por cavidad bucal. A consecuencia de la presión que ejerce, el agua va a provocar lesiones en el tejido pulmonar (dilatación alveolar, adelgazamiento y rotura de paredes alveolares, rotura de capilares perialveolares así como el enfisema hidroaéreo).

Con todo esto, se estableció la anoxia anóxica como mecanismo de la muerte, pero los trabajos de Swann (89) otorgaron importancia a las alteraciones electroquímicas que se producen al penetrar el agua en el torrente circulatorio (90,91), apreciándose que las concentraciones de electrolitos en suero pueden ser muy variadas dependiendo tanto de la cantidad como del tipo de líquido aspirado (92). Así la osmolaridad del líquido aspirado determina diferencias en el caso de agua dulce o agua salada en el siguiente sentido:

- Sumersión en agua dulce: el líquido es hipotónico con respecto al plasma, así el agua es rápidamente absorbida al llegar a los alveolos, pasando a la circulación



pulmonar. Esto conduce a hemodilución e hipervolemia que puede producir un incremento del 30 al 50% (93), pudiendo provocar hiponatremia con sobrecarga circulatoria y facilitar la aparición de insuficiencia cardíaca. También se va a producir hemolisis por la entrada del líquido de sumersión en el torrente circulatorio, dando lugar a hiperkaliemia y arritmias, que pueden provocar la muerte en muy pocos minutos. Además, esta hemolisis puede causar coagulación intravascular diseminada. Por otro lado, esta aspiración de agua dulce afecta a los fosfolípidos del surfactante pulmonar (94) lo que hace inestables a los alveolos y da lugar a atelectasia (95). Los líquidos isotónicos pueden tener efecto citotóxico directo sobre las células endoteliales alveolares y vasculares, conllevando hinchazón de las mismas lo que puede dar lugar a rotura de membranas celulares ayudando a la formación de edema intersticial y alveolar. La certeza de que la sumersión únicamente ocurre por estar las vías respiratorias ocupadas por el líquido de sumersión es hoy errónea. El verdadero motivo es una mezcla de una absorción masiva de agua que causa una hipervolemia brusca y un desequilibrio osmótico y electrolítico (dilución de los electrolitos circulantes y aumento del potasio por la ruptura de los hematíes) (96).

Como consecuencia la causa de la muerte se debe a un fallo cardíaco agudo por incapacidad para impulsar el gran volumen circulante y las alteraciones de la contractilidad cardíaca secundarias a la hiperpotasemia que suelen cursar con fibrilación ventricular (96).

- Sumersión en agua salada: en este caso el líquido es hipertónico respecto al plasma de manera que al ocupar la luz intraalveolar y al sobrepasar la osmolaridad de la sangre en tres o cuatro veces (97) atrae el agua a las vías respiratorias desde la circulación ocasionando hipovolemia, hemoconcentración y edema pulmonar grave. Se produce aumento de la viscosidad en la sangre e hipernatremia aguda. Además, el edema pulmonar aumenta más la situación de hipoxia e hipercapnia dando lugar en el corazón a bradicardia y asistolia (93). El cuadro puede empeorar aún más si el líquido de sumersión está muy contaminado por materias o cuerpos en suspensión pudiendo obstruirse bronquios y bronquiolos (98).



Trabajos experimentales en perros (97) concluyeron que los efectos cardiovasculares observados en la asfixia eran consecuencia directa de la anoxia, así dependían totalmente de la osmolaridad del líquido aspirado. Según Layon y Modell (99), 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, no aspirándose en la mayoría de las víctimas el líquido suficiente para causar cambios potencialmente mortales (100). Se ha estimado que el 85% de los ahogamientos en humanos ocurren por aspiración de menos de 22ml de agua/kg de peso corporal (95) y después de entrar en la circulación el exceso de agua es rápidamente corregido por redistribución y puede ocurrir hipovolemia debido al edema agudo de pulmón (101).

Además, las concentraciones séricas de los electrolitos pueden cambiar después de la sumersión dependiendo de la cantidad y el tipo de líquido aspirado. Así, las alteraciones del ritmo cardíaco y la parada cardíaca derivan de forma fundamental de la prolongada hipoxia (100,102), las alteraciones severas del equilibrio ácido-base, la descarga de catecolaminas y la influencia de la hipotermia por la baja temperatura del agua (103). La disfunción pulmonar debida a las alteraciones del surfactante pulmonar, el colapso alveolar y atelectasia conducen a insuficiencia respiratoria e hipoxia que pueden ser suficientes para provocar una parada cardíaca (3,104,105).

2. Muerte en agua con pulmones secos: entre un 10-15% de los cuerpos recuperados del agua (3) se ha sugerido que un espasmo de glotis podía ser el mecanismo que frenase la entrada de agua en vías respiratorias (106-108). Existen varias explicaciones del mecanismo que produce la muerte en estos casos, como el laringoespasmo (tanto por inhibición cardíaca vagal bien por intenso dolor abdominal al impacto del cuerpo con el agua, shock anafiláctico de origen digestivo en estado postprandial o por reflejo inhibitor cardiorrespiratorio y trastorno vascular central por acción del frío, (109) o la estimulación de los quimiorreceptores carotídeos por la apnea inicial, originando una parada cardíaca de origen vagal (110) o algunos reflejos pulmonares). Al no encontrarse agua en vías respiratorias no serían consideradas como muertes por sumersión según su definición. Estos mecanismos no logran objetivarse en la



autopsia y el diagnóstico se realiza tras analizar las circunstancias y la exclusión de otras causas de muerte. Otros autores hacen referencia a la hipotermia como origen de fibrilación ventricular (111) ya que por debajo de 30° C el ritmo cardiaco se enlentece, disminuye el consumo de oxígeno y la velocidad metabólica provocando bradicardia, asistolia o fibrilación ventricular (112). Ackerman et al, Lunetta et al. y Choi et al. (53,113,114) estudiaron el síndrome del QT largo y sus mutaciones como causa de muerte en agua en nadadores experimentados.

1.2.7. Hallazgos de autopsia.

1.2.7.1. Examen externo.

En el examen externo del cadáver se pueden distinguir signos propios de permanencia del cadáver en agua y signos propios de reacción vital:

1. Signos de permanencia del cadáver en el agua: independientes de la causa de la muerte, inespecíficos y aparecen en el cadáver caído o arrojado al mar después de morir como en el fallecido por sumersión (37,96). Hinojal y Martínez (115) refieren pérdida total o parcial de los vestidos y calzado por acción de las olas, corrientes de ríos, reflujos de mareas y el roce de piedras y rocas.

- Enfriamiento corporal precoz: a consecuencia del contacto entre el agua y la superficie corporal, igualándose la temperatura con el medio.
- Cutis anserina (imagen 17): por retracción de los arrectores pili a consecuencia de la rigidez, con retracción del pene, escroto y pezones. Se ve favorecida por la baja temperatura del medio de sumersión.
- Maceración cutánea: blanqueamiento, engrosamiento y arrugamiento de epidermis (“manos de lavandera” (imagen 18) en el caso de las manos) que acaba por desprenderse de la dermis e incluso arrastrando las uñas, en forma de guante o calcetín.



Imagen 17. Cutis anserina y heridas superficiales.

- Evolución de la putrefacción cadavérica: influenciada por la temperatura, con la salida a superficie de los cadáveres sumergidos a consecuencia de la producción los gases durante la fase enfisematosa (116). Parece seguir un ritmo más lento que si el cadáver se encontrase en el aire y una vez recuperado se acelera notablemente. La mancha verde suele aparecer en la región superior de tórax (96).



Imagen 18. Manos de lavandera.

- Saponificación: por la permanencia del cadáver en agua estancada o con poca corriente.
- Lesiones externas: de origen vital tanto de etiología suicida u homicida previas a la sumersión o por mecanismo contuso al caer sobre fondo o bien lesiones postmortales con ausencia de infiltración hemorrágica en los bordes de las heridas (pueden estar ausentes por el lavado por el agua) a consecuencia de irregularidades del fondo y corrientes de agua, dando lugar a erosiones, excoriaciones o heridas contusas en la región frontal, dorso de manos y pies y rodillas (37). También se pueden observar lesiones de partes blandas producidas por peces, crustáceos y otros animales marinos. Con la realización de examen bioquímico e histológico permitirán el diagnóstico diferencial (117).
- Un hallazgo frecuente es el fenómeno de “diente rosa” descrito por primera vez en 1829 por Bell, quien observó dicha coloración en fallecidos por asfixia por sumersión o ahorcadura. Se asocia a cambios de coloración en la dentina por aumento en la presión intravascular a nivel facial generando hemorragias a nivel pulpar sin afectación del esmalte, observándose en incisivos, caninos y premolares (118). No es patognomónico de asfixias por sumersión u otros tipos de asfixia ya que se ha descrito en cadáveres con antecedentes de endodoncia, lesiones dentales traumáticas, reabsorciones, enfermedades sistémicas e intoxicación por monóxido de carbono (119). Para Gowda et al. (118) la aparición del color rosa se debe a los productos derivados de la hemoglobina al entrar en los túbulos dentinarios.

2. Signos propios de reacción vital:

- Hongo de espuma: indicativo de asfixia por sumersión, aunque puede aparecer en muertes naturales o violentas a consecuencia de edema de pulmón por lo que su ausencia no excluye la sumersión como causa de muerte. Formado por finas burbujas de color blanquecino o rosado en orificios nasales o cavidad bucal y debido al batido de las proteínas y



surfactante pulmonar por los cilios en el alveolo pulmonar ocupado por agua de sumersión (96).

- Espasmo cadavérico: en las manos en las que aparecen los dedos fuertemente flexionados presentando arena o algas del fondo del mar, río o lago (3,93).
- Livideces cadavéricas: de coloración más clara (imagen 19) debidas a la dilución de la sangre o por la baja temperatura del agua. Si el cadáver está en aguas vivas o fuertes corrientes pueden no aparecer de un modo definido (41).



Imagen 19. Livideces rosadas.

1.2.7.2. Examen interno.

Los hallazgos en el examen interno van a depender del mecanismo de la muerte (96):

- Por sumersión-inhibición: en parada brusca de las funciones cardio-respiratorias a consecuencia de reflejo inhibitorio vagal, los hallazgos son escasos, salvo congestión inespecífica generalizada.

- Por sumersión-asfixia simple: no hay paso de agua a los pulmones por probable laringoespasma; se encontrará agua en aparato digestivo y signos inespecíficos de los cuadros de asfixia.
- Por sumersión-ahogamiento: existe penetración de agua en vías respiratorias; se encontrarán lesiones en el aparato respiratorio debido a la acción del líquido de sumersión.

A nivel subcutáneo se pueden encontrar hemorragias intramusculares. Se han descrito a nivel de cuello, tronco y extremidades superiores (120,121) a consecuencia de convulsiones agónicas y sobre esfuerzo muscular durante la anoxia.

I. Aparato respiratorio:

- a. Los pulmones se hayan aumentados de volumen y peso llegando a observarse marcas costales en la superficie de su pleura visceral y uniéndose los bordes anteriores de las lengüetas pulmonares (imagen 20). Thoinot (35) lo refiere como esponja empapada de agua mientras que para Bonet (122) es el resultado de una combinación de edema acuoso y enfisema aéreo.

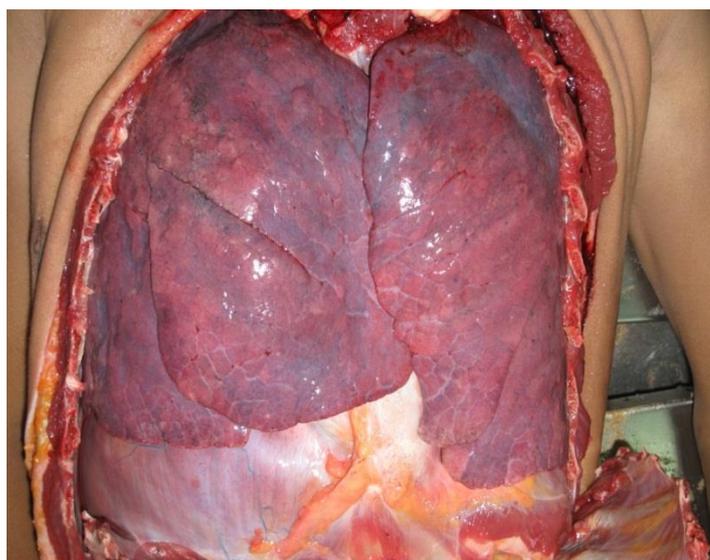


Imagen 20. Solapamiento de bordes pulmonares.

- b. Las manchas de Paltauf (imagen 21) son equimosis de localización subpleural, más clara y de mayor tamaño que las equimosis de Tardieu, por componente asfíctico y traumático a la penetración del agua. Constituyen un signo directo de asfixia por sumersión. La coloración rosa pálida y su localización generalizada en pleura visceral pulmonar indica la vitalidad (28). Se trata en realidad de manchas asfícticas que se han hemolizado por el agua de la sumersión.

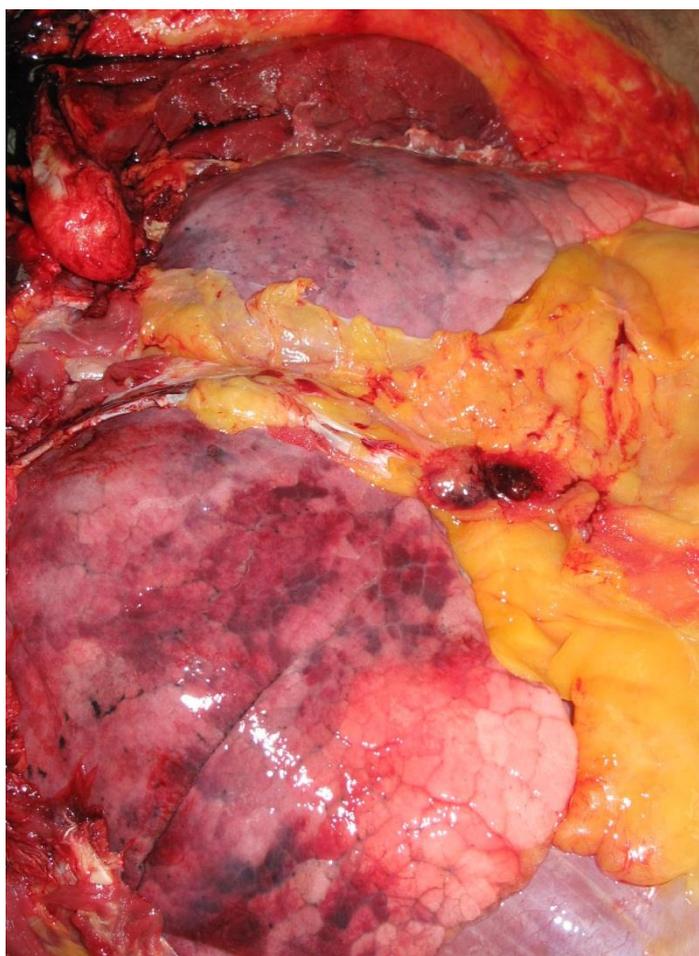


Imagen 21. Manchas de Paltauf.

- c. A la forcipresión se aprecia crepitación característica por enfisema y edema (imagen 22) persistiendo la fóvea. Al corte se encuentran congestionados y con abundante líquido espumoso formado por sangre mezclada con líquido de sumersión.



Imagen 22. Edema pulmonar acuoso.

- d. Tráquea y bronquios están ocupados por espuma blanquecina o sonrosada (imagen 23 y 24) que se continúa hacia el exterior dando lugar al hongo de espuma. En ocasiones pueden observarse restos de vómito y vegetación del medio de sumersión.

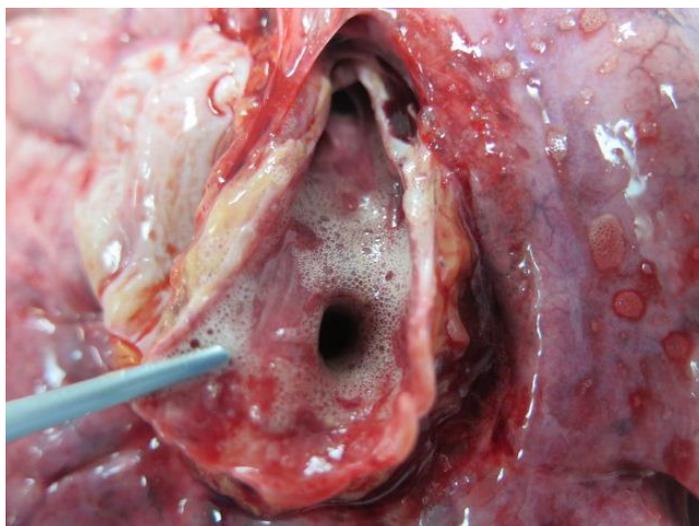


Imagen 23. Espuma en bronquios.

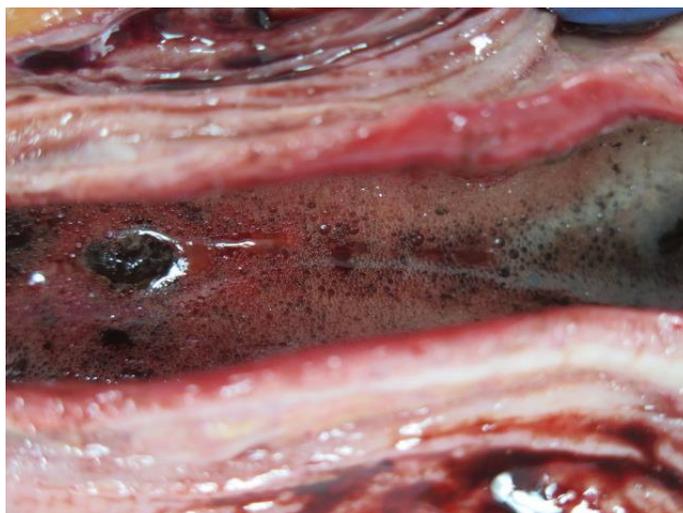


Imagen 24. Espuma rosada en tráquea.

- e. Se ha estudiado el peso de los pulmones (tabla 3, 4 y 5) (29) y se puede afirmar que en el caso de asfixia por sumersión se encuentran elevados con respecto a otro tipo de muertes (123-125), llevando a Shkrum y Ramsay (110) a la conclusión que en adultos mayores de dieciocho años con pesos pulmonares superiores a mil gramos habría que distinguir entre la asfixia por sumersión y otras causas de muerte; no se ha encontrado diferencia significativa de peso entre pulmones de ahogados en agua dulce y agua salada.

PESO DE PULMONES EN LA ASFIXIA POR SUMERSIÓN	
Copeland	1.400 gramos
Kringsholm et al	1.411±396.4 gramos
Lunetta et al	1.391±401 gramos

Tabla 3. Peso de pulmones en las asfixias por sumersión (30).

Causa de muerte agrupada	Peso de Pulmón Derecho	Peso de Pulmón Izquierdo
SUMERSIÓN	794.41	755.41
OTRAS ASFIXIAS	510.00	439.40
OTRAS CAUSAS	672.78	561.67

Tabla 4. Peso de pulmones según causa de muerte (30).

Causa de muerte agrupada	Peso de Pulmón Derecho	Peso de Pulmón Izquierdo
SUMERSIÓN SALADA	839.29 gramos	796.57 gramos
SUMERSIÓN DULCE	595.00 gramos	563.33 gramos

Tabla 5. *Peso de pulmones según sumersión en agua dulce y salada (30).*

- f. No siempre se encuentran estos hallazgos; así Somers et al. (126) tras revisión de casos de sumersión demostraron que incluso periodos cortos de reanimación alteran 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 (imagen 25) y aumento de peso de los pulmones.



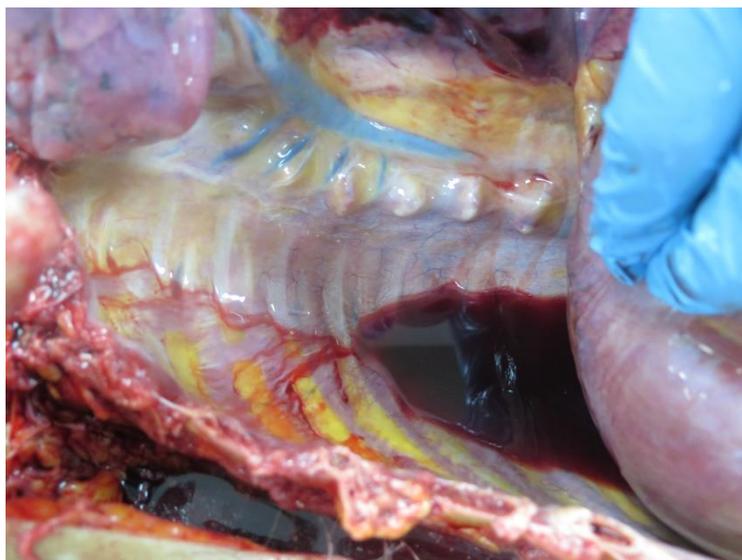


Imagen 25. Líquido en cavidad pleural (efusión pleural).

- II. Corazón: dilatación de ventrículo derecho por hipervolemia y resistencia vascular pulmonar (127). La coloración hemolítica del corazón es una extensión de la coloración hemolítica de la raíz aórtica según Zátopková (128).
- III. Aparato digestivo: a la apertura de estómago e intestino delgado se evidencia líquido de sumersión (imagen 26) y cuerpos extraños que se habrán deglutido en la primera fase de la sumersión (129) aunque pudieran haber penetrado postmortem de forma pasiva en pequeñas cantidades (13) si la presión hidrostática del agua es lo suficientemente alta; también depende del tono muscular del esófago y cardias. Un volumen superior a 500 ml de agua en estómago en sujeto adulto se puede admitir como sumersión intravital (3) teniendo la misma significación la presencia de agua en el duodeno cuando la putrefacción no es evidente. Pueden también observarse desgarros en la mucosa gástrica en el cardias que pudieran ser consecuencia de los vómitos producidos por la deglución de grandes cantidades de agua.

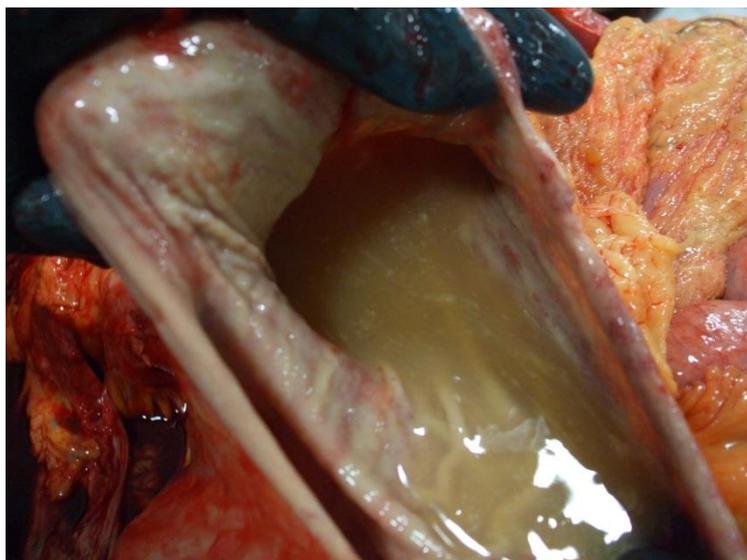


Imagen 26. Líquido de sumersión en estómago.

- IV. Bazo: Reh observó que el bazo se presentaba de pequeño tamaño y anémico (imagen 27) en un 30% de los casos atribuyéndose a la estimulación simpática con vasoconstricción y contracción de la cápsula esplénica y de las trabéculas (130,131). Otros autores piensan que es un fenómeno postmortem en sumersiones prolongadas (125).



Imagen 27. Bazo pequeño y arrugado.

- V. Hígado: aparece congestivo y con pequeños focos hemorrágicos (imagen 28).

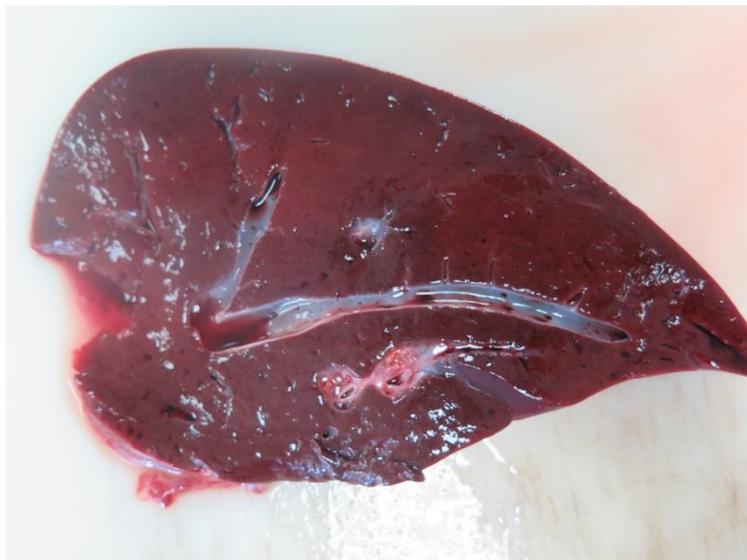


Imagen 28. Hígado congestivo.

- VI. Oído medio: en oído medio y región mastoidea puede encontrarse infiltración hemorrágica que se observa a través del techo del peñasco de color azulado (signo de Nyles, imagen 29). Están localizadas en la mucosa de oído medio y/o celdas mastoideas presentándose con edema submucoso y congestión vascular. Para Knight (132) es un signo poco fiable, pudiendo encontrarse en asfixias mecánicas y muertes naturales.



Imagen 29. Coloración azulada en ambos peñascos (signo de Nyles).

- VII. Hemodilución de la sangre: La sangre de las cavidades izquierdas del corazón que proviene de la circulación pulmonar está más diluida que la de cavidades derechas (133,134). Sin embargo, los resultados pueden estar influidos por la autólisis y la putrefacción e incluso por las maniobras de reanimación.
- VIII. Senos paranasales: por penetración postmortem de agua debido a la permanencia de los cadáveres en agua (130,135,136). Sin embargo, Zivkovic et al. (137) demostraron que el líquido libre en los senos esfenoidales (signo Svechnikow) puede considerarse como reacción vital si no hay muestras de putrefacción en casos de sumersión. En cuerpos putrefactos, una cantidad de 0.55 ml en senos etmoidales puede sugerir que la víctima estaba viva antes del contacto con agua,

pero no demuestra que la sumersión sea vital. Levy et al. (138) aplicaron la Tomografía Computarizada con multidetector bi y tri-dimensional y hallaron líquido espumoso en vías respiratorias y atenuación de la señal en las vías respiratorias por presencia de sedimentos del líquido de sumersión, describen la presencia de líquido en seños paranasales, celdas mastoideas, tráquea y bronquios y opacidad en campos pulmonares.

- IX. Tinción del tronco aórtico (imagen 30): la tinción hemoglobínica de la porción proximal de arco aórtico ha sido considerada como posible marcador de la sumersión en agua dulce (137,139,140) a consecuencia de la hemolisis que se produciría. Byard et al. (141) afirman que, si bien la tinción hemoglobínica de la íntima de la aorta es un signo inespecífico que sólo pone en evidencia la lisis de los hematíes, la tinción de la aorta proximal, pero no del tronco de la arteria pulmonar, sería un signo orientativo de sumersión en agua dulce.

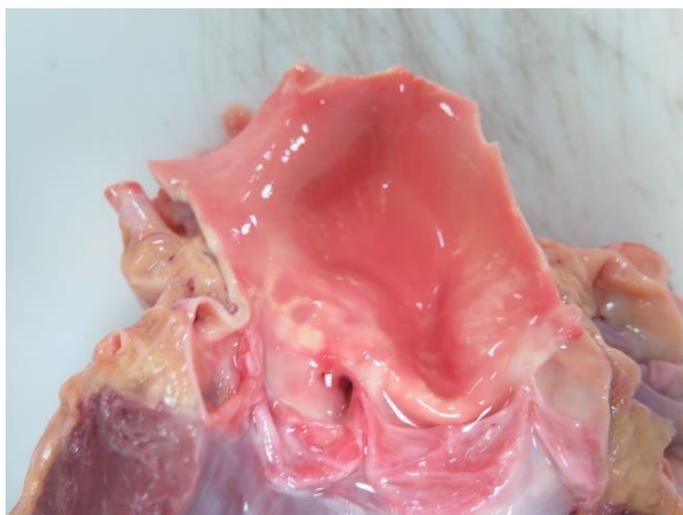


Imagen 30. Tinción de arco aórtico.

1.2.8. Estudios complementarios en caso de sumersión.

El diagnóstico de certeza de la muerte por sumersión sigue siendo complejo hoy en día, de tal manera que no disponemos de una prueba diagnóstica cuyos resultados sean indiscutibles. Nos basamos en estudios histopatológicos, biológicos, químicos y

radiológicos. Papadodima (142) aconseja realizar una meticulosa autopsia, así como estudios histológicos y screening toxicológico en los casos de especial dificultad.

Desde hace más de 20 años el Instituto Nacional de Toxicología y Ciencias Forenses (INTCF) estableció un protocolo para el estudio de las muertes por sumersión, revisado en la Orden JUS/1291/2010, por la que se aprueban las normas para la preparación y remisión de muestras objeto de análisis por el INTCF (143), en la que se contemplan estudios histopatológicos, toxicológicos, determinación de estroncio y el test de diatomeas.

1.2.8.2. Histopatológicos.

1. Pulmones: representan el principal órgano afectado en la sumersión. Se observa distensión pseudoenfisematosa, a consecuencia del estiramiento, dilatación y ruptura de tabiques alveolares dando lugar a cavidades voluminosas a menudo poligonales sin disposición sistematizada. Rhkrum y Ramsay (110) señalan como hallazgos microscópicos:

- Enfisema acuoso: dilatación de alveolos, adelgazamiento de la pared alveolar y compresión de capilares alveolares. La expansión alveolar puede afectarse por el contacto con el aire cada vez que el cuerpo sale a la superficie del agua, la relación entre edad y capacidad pulmonar, patología pulmonar previa tanto asociada a la edad como al hábito tabáquico y el estado de putrefacción (144-146).
- Congestión pulmonar, edema, hemorragia alveolar, ruptura de paredes alveolares.
- Los macrófagos alveolares pueden estar disminuidos en ahogados recientes al ser lavados por el líquido de sumersión. En cadáver en putrefacción puede ser muy variable.
- Hemorragia alveolar: significativa en casos de sumersión sin putrefacción y en muertes asfícticas comparadas con sujetos fallecidos por otras causas.



Martín Cazorla et al. (147) publicaron un estudio realizado entre los años 2004 y 2011 de 78 autopsias de muerte por sumersión en relación al peso de los pulmones, encontrando sólo tres casos con peso inferior a 1000g, ausencia de hallazgos macroscópicos indicativos de entrada de medio de sumersión en vías respiratorias y otra causa que pudiera explicar el fallecimiento; sin embargo, el estudio histopatológico mostró hallazgos propios de sumersión, concluyendo en su estudio que en caso de sumersión con pulmones secos es necesario el estudio molecular para la confirmación de la causa de la muerte por sumersión.

Los estudios a microscopio han demostrado leves diferencias entre la sumersión en agua dulce y agua salada en relación con la reacción inflamatoria aguda de tal manera que la histopatología no es determinante para el diagnóstico diferencial entre agua dulce y agua salada. La infiltración masiva de las células inflamatorias es más severa en los casos de sumersión en agua salada. Además, con la microscopía electrónica de barrido se puede observar en los casos de sumersión en agua salada cambios en el epitelio alveolar con protrusiones, compactación y cambios morfológicos en la membrana basal en eritrocitos (148).

2. Piel: Maceración de los dedos y separación de las uñas (piel de lavandera) con desprendimiento arrugado de la epidermis a consecuencia de la contracción de las fibras elásticas del corion epitelial. Se han intentado relacionar con la data del periodo de sumersión, pero se estima que carece de especificidad.
3. Corazón: se encuentran como marcadores morfológicos de la sumersión:
 - Hipereosinofilia focal de miocitos ventriculares.
 - Contracción en bandas de miocitos ventriculares.

En sumersión y lesión cerebral aguda usando lugol azul rápido como tinción se ha evidenciado degeneración miofibrilar mediante tinción citoplasmática difusa (149). Se han observado alteraciones de la capa media de las arterias coronarias sugiriendo que la sumersión está asociada con una rápida e importante alteración simpática que produce un espasmo de la arteria coronaria y lesión focal de los miocitos (150).



4. Hígado, bazo y riñón: en el hígado se observa extensión de sinusoides hepáticos e incluso necrosis. En el bazo se muestra reducción de número de eritrocitos que parece relacionado con algunos mecanismos fisiopatológicos de la muerte (151). En algunos riñones se ha observado necrosis tubular aguda. Sakurada et al. (152) demuestran que en muertes en hipotermia y sumersión en agua fría existe aumento de la expresión HSP70 en el núcleo de los podocitos glomerulares con un patrón específico.
5. Hueso temporal: se ha observado hemorragia timpanomastoidea, con edema severo de la submucosa y petequias con congestión vascular sin inflamación en la submucosa y hemorragia en el espacio de aire timpanomastoideo (153). Una hemorragia timpanomastoidea en ausencia de patología auditiva, traumatismo craneal, accidente cerebrovascular o diátesis hemorrágica parece ser una fuerte evidencia de apoyo a la muerte por sumersión debido a la creación de una presión negativa en la cavidad del oído medio suficiente para causar ruptura de vasos y hemorragia. A microscopio se observa engrosamiento de epitelio perióstico sobre todo en la bóveda quirúrgica de la cápsula ótica (154).
6. Cuello: Es frecuente encontrar hemorragia intramuscular en cuello, cintura escapular y parte alta de los brazos (imagen 31), sin embargo, hay que tener en cuenta que las lesiones del cuello pueden estar causadas por inadecuada recuperación y transporte de los cuerpos (155,156). Una alteración muscular vital se caracterizará 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.

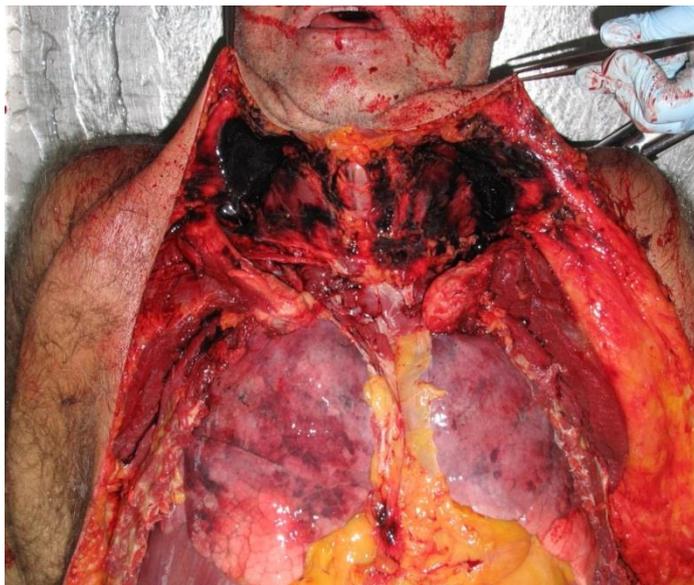


Imagen 31. Hemorragias cervicales y manchas de Paltauf.

7. Dientes de color rosa: a consecuencia de la hemolisis por la exudación de los derivados de hemoglobina a través de los túbulos de dentina.
8. Raíz aórtica: En un 5% de los casos de sumersión en agua dulce se observa decoloración hemolítica de la íntima de aorta que puede ser debido a hiponatremia y hemolisis por hemodilución en el ventrículo izquierdo (134,157).
9. Mucosa gástrica: Se puede observar el signo de Boerhaave (rotura de esófago a consecuencia de vómito) y el signo de Mallory-Weiss (desgarro de la mucosa lineal en unión cardio-esofágica) (158).
10. Músculo esquelético: Girela et al. (159) estudiaron los cambios estructurales que ocurren en el musculo esquelético de ratas inmediatamente después de muerte por sumersión encontrando rbdomiolisis junto con intensa anoxia.

1.2.8.2. Biológicos.

El estudio de las pruebas biológicas complementarias tiene como finalidad poner de manifiesto los cambios fisiopatológicos que ocurren durante el proceso de sumersión. Piette (160) considera que para llegar a un diagnóstico en la asfixia por sumersión se necesitan la presencia de hongo de espuma en nariz y boca, enfisema pulmonar o edema

acuoso, manchas de Paltauf, incremento del peso de los pulmones, pulmones crepitantes al tacto, cuerpos extraños en los bronquios y espuma, acompañado del test de diatomeas y del estudio de estroncio. En las fases iniciales de la sumersión cuando se produce una inspiración bajo el agua se produce el paso tanto de partículas pequeñas como de líquido de sumersión al torrente circulatorio al producirse lesiones en las membranas de los alveolos.

Los primeros trabajos en este campo fueron realizados por Corin y Stockis (161) mediante el estudio de elementos cristalinos que se encuentran presentes en el líquido de sumersión; debido a su dificultad se abandonaron estos procedimientos. Así se dirigió el estudio hacia las diatomeas, si bien hoy en día sigue existiendo gran debate en relación a su validez.

La prueba más importante para el diagnóstico de sumersión es la identificación de diatomeas gracias a la gran estabilidad postmortem que presentan en los tejidos humanos (162).

Las diatomeas son algas unicelulares eucariotas de la clase *Bacillariophyceae* presentes tanto en agua dulce como salada, tierra, mar y aire. Su tamaño varía entre las 2µm a más de 500µm, midiendo la mayoría entre 10 y 80µm de longitud o diámetro. Su pared celular contiene alta cantidad de sílice, denominándose “frútula” a la parte silíceo entera de la diatomea, que presenta las características de dureza, resistencia al calor, a la descomposición y a la acción de ácidos fuertes. Existen diferentes clasificaciones, siendo la basada en la salinidad del medio en el que se desarrollan de especial interés en medicina forense. Es necesario su análisis por un especialista debido a la gran variabilidad que existe.

Su aplicación se basa en que las diatomeas penetrarían junto con el líquido de sumersión, atravesarían las membranas alveolares y se diseminarían por los órganos a través del torrente circulatorio, siendo identificadas en médula, hígado, bazo, cerebro o riñones. Para que esta diseminación tuviera lugar el fallecido objeto de estudio debería encontrarse vivo al caer al agua ya que en el sujeto fallecido al no existir circulación las diatomeas solo se encontrarían a nivel pulmonar y no en el resto de los órganos. Las



partículas cuyo tamaño sea menor de 30 μ podrán potencialmente atravesar la interfase alveolo-capilar e ingresar a la circulación general (163,164).

Sin embargo, no ha sido posible identificar diatomeas en todos los cadáveres que han sufrido sumersión en agua dulce (165,166) extendiéndose por algunos autores que en mar abierto tampoco serían un marcador fiable (167). Además, Tomonaga (168) y Nanikawa y Kotoku (169) han identificado diatomeas en sujetos cuya causa de fallecimiento no ha sido la sumersión pero que habían permanecido en agua, afirmándose que el hallazgo de diatomeas en pulmones es inespecífico (130).

Según Lunetta y Modell (109) las principales causas de error de este test diagnóstico son:

1. Falsos positivos: hallazgo de diatomeas en pulmones y otros órganos de fallecidos por causas diferentes a la sumersión puede tener su origen en:
 - Contaminación antemortem: ingestión de alimentos con alto contenido en diatomeas (vegetales, mariscos, cervezas) o inhalación de diatomeas en fábricas de materiales de construcción y aislantes o al fumar cigarrillos o bien en suspensión en el aire.
 - Penetración postmortem: por sumersión prolongada en agua a alta presión hidrostática, a través de heridas producidas en vida o durante la aplicación de maniobras de reanimación con ventilación artificial en cadáveres recuperados del agua.
 - Contaminación durante la preparación de las muestras: por ropas del cadáver, en la ejecución de la autopsia, a través de instrumental por agua y reactivos o por material de vidrio utilizado.
 - Otras fuentes: inhalación de agua por buceadores o nadadores, paso transplacentario de diatomeas, contaminación de páncreas y vesícula por paso retrógrado desde duodeno o en exhumaciones por contaminación por el serrín que pueda tener el ataúd.



2. Falsos negativos: casos en los que no se identifican diatomeas en muertes por sumersión como puede ser:

- Baja concentración de diatomeas en medio de sumersión: las diatomeas sufren variaciones estacionales, siendo más abundantes en los meses de primavera y otoño.
- Escasa cantidad de líquido inhalado.
- Pérdida de diatomeas durante el proceso de preparación de las muestras: las técnicas de extracción necesitan la destrucción previa utilizándose la digestión química con ácido nítrico o sulfúrico (170,171), solubilizantes como el Solueno-350 (no recomendable para diatomeas en agua salada) (172,173) o enzimas como la proteinasa K con el dodecil-sulfato-sódico (174). La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) constituye un método alternativo para diatomeas en agua salada (175). Zhao et al. (176) han descrito un método cualitativo y cuantitativo más sensible y específico basado en la técnica de digestión por microondas, filtración a vacío y detección mediante microscopio electrónico de barrido automatizado.

Cabe destacar que debe hacerse un estudio comparativo de las diatomeas halladas en el fallecido por sumersión con las diatomeas halladas en el medio de sumersión donde fue hallado el fallecido (13,165,170,177,178).

La toma de muestras debe llevarse a cabo al mismo tiempo que la recuperación del cadáver en recipientes estériles de un litro de capacidad y de agua de superficie y a diferentes profundidades. Deben mantenerse a 4°C hasta su manipulación (37).

Para que los resultados sean aceptables debe existir:

- Concordancia taxonómica, cualitativa y cuantitativa entre las diatomeas encontradas en el cuerpo y en el medio de sumersión.
- Estricto protocolo para evitar la contaminación durante el proceso de preparación de muestras.



- Exclusión de los resultados de diatomeas que potencialmente puedan ser “contaminantes”.

Se ratificará el diagnóstico de sumersión cuando la cantidad de diatomeas en órganos de gran circulación considerados con valor diagnóstico sean elevada y cuando exista coincidencia entre las diatomeas halladas en el líquido de sumersión y las encontradas en el cadáver. En líneas generales, para considerar el test como positivo se deben recuperar más de 5 valvas por cada 10 g de muestra de tejido cadavérico (179). Se considerará resultado inespecífico cuando sólo se hallen diatomeas en los pulmones por no poder excluir la posibilidad de penetración pasiva desde el medio acuoso (162,177).

Zhao et al. (180,181) proponen el uso de un nuevo método por microscopía electrónica de barrido (SEM auto-VF-1500) para el estudio de las diatomeas en tejidos. Además, proponen un análisis cuantitativo en tejido pulmonar combinado con el análisis de diatomeas en el medio de sumersión como método de apoyo para determinar la muerte por sumersión en un cuerpo recuperado del agua (180).

Como método alternativo a la investigación de diatomeas, encontramos:

- Identificación de protozoos ciliados (182) para los ahogados en agua dulce.
- Estudio de algas verdes (183) con Solueno-350 que no digiere las paredes de las células de las algas verdes. También se ha propuesto el análisis de la clorofila del plancton en muestras de pulmón con espectrofluorofotómetro (184).
- Análisis bacteriológico: usando la sangre femoral del cadáver recuperado de agua y comparándolo con la presencia de ciertas bacterias de fallecidos por otras causas:
 - ✓ Mishul'skii (185) comprobó que la *Ps. Putida* y la *Ps. Fluorescens* no estaban presentes en la sangre de sujetos control y sí en ahogados.
 - ✓ Lucci y Cirnelli (186) demostraron la presencia de bacterias típicas de contaminación fecal de las aguas en sangre de ambos ventrículos, arteria femoral y vena femoral en el 100% de ahogados tanto en agua dulce como salada.



- ✓ Kakizaki et al. (187-189) estudiaron crecimientos de bacterias bioluminiscentes sugiriendo sus resultados que la presencia de éstas podría ayudar al diagnóstico de la asfixia por sumersión.
- ✓ Aoyagi et al. (190) por técnicas de PCR en sangre detectaron fragmentos de ADN de *Aeromonas sobria*.
- ✓ Uchiyama et al. (191) detectaron ocho especies de bacterioplancton de agua dulce o salada utilizando PCR, siendo sensibles y específicos, menos laboriosos y de alto rendimiento.
- Estudio de la expresión de genes reguladores de la homeostasis del agua (Aquaporin) para diferenciación de sumersión en agua dulce y salada, observando una disminución en la expresión del gen Aquaporin-5 intrapulmonar en los casos de ahogados en aguas dulces (192-194).
- Identificación genética de algas del fitoplancton mediante PCR, pudiendo detectar nanoplancton, microplancton o picoplancton (195-199).

1.2.8.3. Bioquímicos.

La tanatoquimia o bioquímica cadavérica fue definida por Luna (200) 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*".

En 1902 Carrara (201) comprobó la dilución desproporcionada de la sangre contenida en ventrículo izquierdo de ahogados en agua dulce frente a los ahogados en agua salada y determinó peso específico, punto de congelación y conductividad eléctrica para diferenciar estos tipos de sumersión. Posteriormente Gettler (202) propone la medición de la concentración de cloruros en sangre de cavidades cardiacas izquierdas y derechas cuyas concentraciones varían en caso de sumersión vital en agua dulce y salada. Moritz (203) intenta el uso del magnesio y Freimuth y Sweann (204) proponen la medición de la densidad el plasma en la sangre de cavidades izquierdas y derechas del corazón.



Las muestras deben ser obtenidas durante el periodo postmortem precoz (antes de la instauración de los fenómenos cadavéricos) (205).

Según Maeda et al. (206) los requisitos de los marcadores a estudiar deben ser: respuesta rápida, estabilidad postmortem, 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. Se diferencian 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.

La penetración de agua en el organismo, bien sea dulce (hemodilución) o salada (hemoconcentración) que ocurre en la sumersión en el ventrículo izquierdo y la difusión de sustancias del medio de sumersión a la sangre de dicho ventrículo provocan variaciones en los elementos químicos en la sangre de ventrículo izquierdo que pueden utilizarse en comparación con los elementos químicos de la sangre del ventrículo derecho, que deben permanecer estables, para el diagnóstico de sumersión vital.

La química cadavérica presenta particularidades con respecto al sujeto vivo al estar influidos por factores exógenos y endógenos debidos a la fase de agonía, tratamientos, autólisis y putrefacción, pudiendo ser diagnóstico de sumersión un parámetro que se demuestre que no sufre modificación postmortem. Además, cuanto más precoz sea la autopsia más parámetros bioquímicos se podrán utilizar, pero sobre todo los de mayor valor diagnóstico: glucosa, urea, creatinina, electrolitos, enzimas, antígenos y anticuerpos, etc (207).

La sangre procedente de ventrículo derecho se encuentra influenciada por recibir la sangre de cavas y con ello contaminarse en los procesos agónicos y por autólisis de páncreas y difusión de contenido gástrico (207), de tal manera que se ha investigado en otros fluidos corporales (sangre periférica, líquido cefalorraquídeo, humor acuoso, humor vítreo, etc), así que la muestra para ser útil deber ser de un material biológico anatómicamente bien protegido, carecer de elementos celulares en suspensión para



reducir efectos de lisis celular y debería presentar fácil accesibilidad para obtención rápida y sencilla durante la autopsia (208-213).

Para evitar errores en el diagnóstico por sumersión hay que utilizar muestras de sangre en periodo precoz postmortem (menos de 48 horas) y usar 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 la putrefacción de la sangre (41), entre ellos encontramos:

- Estroncio:

El estroncio es un elemento ampliamente difundido tanto en la corteza terrestre, mar y en los ríos, siendo muy variable su concentración, de tal manera que es muy importante el análisis del agua en la que ha sido hallado el cadáver. La concentración de estroncio en personas sanas varía de 16-43 microg/L (214) pudiendo variar según el agua y los alimentos consumidos y los fármacos con estroncio para el tratamiento de la osteoporosis (215-217), pudiendo alcanzar según Piette et al. (218) en sangre valores de hasta 95 microg/L.

El estroncio cumple con los requisitos para considerarlo como un buen marcador diagnóstico de sumersión (160,219) ya que:

- Atraviesa la membrana alveolo-capilar y penetra en la circulación.
- Está presente en grandes cantidades en el medio de sumersión y en pequeñas cantidades en la sangre de personas sanas.
- No penetra en la circulación a través de aparato digestivo o por fenómenos de difusión postmortem.

Azparren et al. (214,220,221) demostraron que, en los casos típicos de asfixia por sumersión en agua salada, las diferencias en las concentraciones de estroncio entre sangre de ventrículo derecho e izquierdo eran superiores a 70 microg/L y que valores inferiores a 30 microg/L eran indicativos de sumersión atípica (sin aspiración de agua durante el periodo vital por laringoespasma, inhibición vagal



o sumersión postmortem). Posteriormente (221) 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 un marcador poco proclive a experimentar errores analíticos. Se comprobó que los valores medios de estroncio en sangre eran mucho más elevados en fallecidos por sumersión que por otras causas (222). Pérez-Cárceles et al. (223) demostraron que el estroncio era un buen marcador tanto para el diagnóstico de muerte por sumersión como para la diferenciación entre muertes en agua dulce y salada.

Aunque en agua dulce existe gran variación en los resultados de estroncio, comprobaron que en el 32% de los cuerpos hallados en agua dulce la determinación de estroncio podía permitir el diagnóstico por sumersión con cierto grado de confianza (40). En 2007 (224) estudiaron la relación de los niveles de estroncio con la edad y el sexo, la temperatura del agua y el peso de los pulmones no observándose diferencias significativas en las concentraciones de estroncio en sangre de ventrículo izquierdo en función del sexo o la edad pero sí en la cantidad de estroncio absorbido hacia torrente sanguíneo entre la sumersión en agua dulce frente a agua salada y entre ahogamiento en agua fría frente a agua tibia. También realizaron estudios (225) en relación al aumento de peso del pulmón y la cantidad de estroncio absorbido como utilidad diagnóstica de la sumersión encontrando diferencias significativas entre casos de sumersión y no sumersión al comparar el peso de pulmón y corazón en oposición a la relación de peso de pulmones y peso de corazón.

Hay que tener en cuenta que en los casos en los que no se superan los 3 días desde la muerte, existen pocas evidencias que sugieran la difusión postmortem del estroncio del agua a la sangre (40,223).

- Otros marcadores bioquímicos:

1. El boro podría ser útil como marcador de sumersiones en agua de mar, sin embargo, su análisis rutinario es prácticamente imposible ya que resulta difícil



evitar la contaminación de muestras de sangre con el boro de los borosilicatos de los vidrios (162).

2. El magnesio como marcador de sumersión tiene menor sensibilidad en la detección de las aspiraciones de agua salada respecto al estroncio (162).

Lorente et al. (25), estudiaron la osmolaridad del plasma y las concentraciones de cloro, magnesio y potasio. Yu-Chuan et al. (226) estudiaron las concentraciones de flúor. Jeanmondod et al. (227) determinaron los valores del punto de congelación de la sangre contenida en ambos ventrículos.

Se han estudiado con desigual resultado las modificaciones del magnesio, potasio y cloro en humor vítreo y acuoso (228,229) y magnesio en los fluidos cerebrospinales en ahogados en agua salada (230) concluyendo que las modificaciones tienen un significativo valor diagnóstico en las muertes por sumersión.

Zhu et al. (231) estudiaron el comportamiento de las concentraciones de cloro, sodio, calcio, magnesio, urea y creatinina en la sangre de ambos ventrículos en fallecidos en agua dulce y salada, llegando a la conclusión de que dichos resultados son útiles para diferenciar la sumersión en agua dulce y salada siempre que la toma de muestras se realice precozmente. Estudiaron también la troponina T en suero y líquido pericárdico cuyos resultados son de utilidad para diferenciar los cuadros de infarto de los de sumersión y de graves hipotermias. Posteriormente (232) estudiaron concentraciones de urea, creatinina y ácido úrico en sangre y líquido pericárdico encontrando valores bajos en la concentración de urea en sangre de corazón izquierdo y en líquido pericárdico al compararlos con valores obtenidos en corazón derecho y sangre periférica a consecuencia de la dilución de la sangre de venas pulmonares por la entrada de agua. En 2003 (233) estudiaron los pesos de pulmones en relación con los componentes bioquímicos (nitrógeno ureico, sodio, cloruro, calcio y magnesio) tanto de sangre ventricular como de líquido pericárdico evidenciando correlación inversa de los componentes bioquímicos en relación con el peso de los pulmones llegando a la conclusión de que el análisis de marcadores séricos y pericárdicos en relación con el peso de pulmón son útiles para evaluar la composición de la concentración media de aspiración al investigar la muerte por sumersión.



De La Grandmaison et al. (124) estudiaron las concentraciones de hierro en la sangre de cavidades derechas e izquierdas cardíacas encontrando diferencias significativas en sumersión en agua dulce.

Li et al. (234) trabajaron en las concentraciones de calcio y magnesio en líquido pericárdico con el resultado de que las concentraciones eran significativamente superiores en los casos de sumersión en agua salada en relación a otro tipo de muertes.

Matoba et al. (235) estudiaron concentraciones de sodio, cloro, calcio y magnesio en líquido pleural, pudiendo diferenciar entre sumersiones en agua dulce y salada.

Maraschi et al. (236) investigaron el silicio encontrando que la diferencia entre la concentración de ventrículo derecho e izquierdo era significativamente mayor en los casos de sumersión, pudiendo ser utilizado además para la diferenciación entre sumersión en agua dulce y salada. Por su parte Pierucci et al. (237) estudiaron la fracción insoluble de silicio en sangre de ventrículo izquierdo y derecho, llegando a la misma conclusión.

El péptido natriurético auricular (ANP) es un polipéptido secretado por las células del músculo cardíaco, de efecto vasodilatador y relacionado en el control homeostático del agua corporal, potasio, sodio y tejido adiposo. Fue estudiado por Anderson et al. (238) comprobando su elevación plasmática al igual que la eliminación urinaria de sodio durante la inmersión en agua termoneutral en el hombre. Lorente et al. (239) en un trabajo experimental en conejos concluyeron que la determinación del ANP era útil para el diagnóstico de la sumersión vital y para el diagnóstico diferencial entre sumersión en agua dulce y salada. Zhu et al. (240) estudiaron el ANP y el péptido natriurético cerebral (BNP) en líquido pericárdico, encontrando elevación del ANP en contraste con leve aumento de BNP tanto en ahogados en agua dulce como salada. En 2012 Chen et al. (241) utilizaron la patología molecular de ANP y VNP en miocardio para diferenciar la disfunción cardíaca como posible causa de muerte o factor secundario en sumersión o asfixia mecánica, encontrando que la expresión del RNA mensajero de ANP y BNP eran significativamente más bajo en muertes súbitas cardíacas.



Quan et al. (242) estudiaron la ubicuitina en neuronas de sustancia negra por métodos inmunohistoquímicos en diferentes tipos de asfixias mecánicas encontrando una tinción difusa de este marcador más frecuente en asfixia por sumersión que en otros tipos de asfixias.

Pérez-Cárceles et al. (243) estudiaron estroncio, magnesio, sodio, cloro, calcio, hierro, urea, creatinina y troponina cardiaca T tanto en sangre periférica, ventrículo derecho e izquierdo, encontrando concentraciones mayores en ventrículo izquierdo como resultado de la aspiración de agua; niveles más elevados de hierro y urea en ventrículo derecho en sumersión en agua salada y niveles más elevados de magnesio y creatinina en ventrículo derecho en sumersión en agua dulce como consecuencia de la hemodilución y hemoconcentración respectivamente.

Yajima et al. (244) proponen para el diagnóstico diferencial entre sumersión en agua dulce y agua salada la sumación de los iones sodio, potasio y cloro de líquido pleural. Deliligka et al. (245) plantean la determinación postmortem de los niveles de troponina I cardiaca con objeto de la detección de daño miocárdico previo a modo de factor contribuyente a la muerte por sumersión en agua de mar y la medición de los niveles de magnesio y calcio para diferenciar entre sumersión en agua salada y lesión miocárdica previa.

En 2017 (246) se estudiaron 19 elementos traza (aluminio arsénico, bario, boro, bromo, cadmio, calcio, cobre, estroncio, hierro, litio, magnesio manganeso, molibdeno, níquel, plomo, potasio, selenio y zinc) en sangre de ventrículo derecho, ventrículo izquierdo, sangre periférica y humor vítreo, encontrándose que las concentraciones de estroncio, magnesio, boro y calcio en sangre presentaban concentraciones significativamente superiores en las muertes por sumersión frente a otro tipo de muertes y que a su vez permitían diferenciar entre sumersión en agua dulce y salada. Además, la determinación conjunta de estroncio, magnesio, calcio, boro y litio permitían clasificar al 83% los casos de sumersión en agua salada. Las concentraciones de bromo en sangre de ventrículo izquierdo eran superiores en los casos de sumersión en agua salada, mientras que las concentraciones de hierro eran superiores en los casos de sumersión en agua dulce. La determinación conjunta de zinc, bario, estroncio y magnesio permitía mejorar la



capacidad de discriminación para la identificación de muertes por sumersión en agua dulce, aunque con precauciones.

En humor vítreo se ha estudiado la variación de las concentraciones de sodio y cloro para la diferenciación de sumersión en agua dulce y salada (247), encontrando que en los casos de sumersión en agua dulce los niveles de sodio se reducen pero que es debido a una difusión postmortem entre el ojo y el agua circundante.

Por otro lado, en 2017 (246) se confirman las concentraciones de estroncio en humor vítreo como un buen marcador para el diagnóstico de muerte por sumersión, especialmente en agua salada, siendo también buenos marcadores el magnesio, bromo y boro.

1.2.8.4. Radiológicos.

La tomografía axial computerizada (TC) puede resultar de utilidad en los casos en los que por cualquier motivo no se pueda realizar una autopsia convencional. Kawasumi et al. (248,249) hallaron una mayor acumulación de líquido en senos paranasales, senos maxilares y esfenoidales en casos de sumersión. Ambrosetti et al. (250) realizaron mediciones de la diferencia de densidad de la sangre dentro de las cámaras cardíacas mediante tomografía computerizada multidetector. Filograna et al. (251) encontraron en un caso de un niño de 18 meses de edad al realizar una tomografía axial computerizada completa la presencia de fluido espumoso en la vía aérea superior, tráquea y bronquios junto a opacidades pulmonares nodulares de vidrio esmerilado, y con la exclusión de otras causas de muertes, se concluyó el fallecimiento como una sumersión. Sin embargo, para Astrid et al. (252) no es posible distinguir de forma fiable mediante la realización de tomografía axial computerizada signos específicos que diferencien la sumersión de otros tipos de asfixia mecánica.

Rutty et al. (253) proponen el uso de biopsias guiadas por tomografía axial computerizada con el fin de obtener muestras de órganos para realizar muestreo de bacterioplacton en el diagnóstico de sumersión.



1.2.8.5. Componentes alveolares que pueden ser hallados en la circulación general.

Según Piette y De Letter (160), los componentes alveolares presentes en el pulmón van a ser desplazados por el arrastre a consecuencia de la entrada del líquido de sumersión desde su localización hasta la circulación general a raíz de la ruptura de las paredes alveolares.

Reiter (254) puso de manifiesto la presencia de células de fumadores en sangre de ventrículo izquierdo en las víctimas de sumersión, pero solo es aplicable en fumadores, sin proliferar estudios en este campo.

Por otra parte, el surfactante pulmonar ha sido objeto de numerosos estudios. Es un complejo lipoproteínico que recubre la superficie alveolar pulmonar, siendo sintetizado por las células epiteliales alveolares tipo II, cuya función es reducir la tensión superficial en la interfase aire-líquido. Existen cuatro proteínas específicas del surfactante, dos hidrófilas (SP-A y SP-D) y otras dos hidrofóbicas (SP-B y SP-C), cuyo significado funcional no es bien conocido.

SP-A es la proteína más abundante del surfactante pulmonar y en situaciones de asfixia, daño alveolar o síndrome respiratorio agudo cursan con aumento de esta proteína en sangre dando lugar a alteraciones en el patrón inmunohistoquímico del pulmón de tal manera que puede analizarse mediante técnicas inmunohistoquímicas, bioquímicas o por biología molecular.

Giammona y Modell (94) encontraron resultados sobre el surfactante pulmonar en sumersión en agua dulce y salada, siendo estos más intensos y evidentes en los casos de agua dulce.

Lorente et al. (255) estudiaron la estabilidad del surfactante pulmonar y determinaron una estabilidad aceptable las primeras 24 horas, sufriendo deterioro progresivo entre 48-72 horas; estudiaron las modificaciones de las proporciones en los distintos fosfolípidos (fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina y fosfatidilglicerol) en



lavados pulmonares de conejos ahogados (256), demostrando diferencias entre sumersiones en agua dulce, salada y grupo control estableciendo que permitían distinguir entre dichos supuestos.

Kamada et al. (257) estudiaron la proteína D del surfactante pulmonar (SP-D) encontrando niveles elevados en sangre de ahogados, siendo más elevadas en caso de agua salada que agua dulce.

Zhu et al. (258) investigaron la distribución inmunohistoquímica de la proteína A del surfactante (SP-A) y encontraron inmunotinción más intensa y densa de la proteína en ahogados, síndrome de las membranas hialinas y en casos de aspiración perinatal del líquido amniótico. Posteriormente en 2002 (259) evaluaron niveles séricos de SP-A y su distribución pulmonar en ahogados en agua dulce y salada hallando que en sumersiones en agua dulce existía mayor acumulación granular intra-alveolar. En 2003 compararon los niveles séricos de SP-A en sangre de ambos ventrículos en caso de sumersión en agua dulce, salada o por infarto agudo de miocardio, encontrando concentración significativamente elevada de dicho marcador en ahogados en agua dulce, aunque dichos datos se solapaban con los casos de sumersión en agua salada y fallecidos por infarto agudo de miocardio (231).

Pérez-Cárceles et al. (223) estudiaron los hallazgos microscópicos en relación a la expresión inmunohistoquímica de SP-A en lóbulos superiores e inferiores de pulmón en distintas causas de muerte permitiendo diferenciar los casos de asfixia con otros tipos de muerte y los casos de sumersión con otros tipos de asfixia.

Stemberga et al. (260) y Quan et al. (261) encontraron aumento significativo de SP-A con estudios inmunohistoquímicos y bioquímicos en las víctimas por sumersión y en fallecidos con daño pulmonar por insuficiencia respiratoria aguda además de disminución en fallecidos por hipotermia.

Miyazato et al. (262) estudiaron la patología molecular de la lesión pulmonar en muertes por sumersión en comparación con otras asfixias y con muertes por hipotermia mediante 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 ambas proteínas en casos de sumersión y asfixias mecánicas en comparación con los casos de hipotermia. No obstante, los niveles de mRNA de citoquinas fueron más elevados en casos de sumersión. Esto sugiere característicos patrones moleculares del daño pulmonar en casos de sumersión que implican la activación de los reactantes de fase aguda con supresión de los surfactantes pulmonares frente al aumento en la expresión de mRNA en los casos de muerte por hipotermia.

1.2.8.6. Proteómica en patología forense.

La proteómica estudia el conjunto de las proteínas celulares, su función, su estructura y los cambios que ocurren en las proteínas en las diferentes situaciones a las que se pueden ver sometidas las células por acción del entorno (263). El término proteoma fue introducido por Marc Wilkins en 1995 para designar al conjunto de proteínas que una célula contiene y puede expresar (264).

Al ser los marcadores proteicos resistentes al paso del tiempo y a las condiciones físicas y ambientales pueden dar información sobre la fisiología de los fallecidos, microorganismos patógenos, sustancias tóxicas o identificación de insectos o plantas (265).

Con el avance en la genética y la proteómica a nivel de la medicina clínica y sus aplicaciones, se han llevado a cabo estudios a nivel de patología forense como por ejemplo las mutaciones que pueden ocurrir en muertes súbitas en lactantes, evidenciar mutaciones que han dado lugar a muertes violentas de tipo accidental que inicialmente se categorizaron como violentas suicidas o mutaciones que llevan a muerte súbita cardiaca en jóvenes adultos pudiendo asesorar a familiares (266).

Además, la proteómica se ha desarrollado en el estudio de los cambios que se producen en las proteínas para el estudio del intervalo postmortem de muestras de músculo esquelético (267), estudio de sangre venosa de individuos fallecidos por daño cardiaco (268) o estudio de proteínas de pacientes fallecidos por daño cerebral (269,270).





2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS



La sumersión supone unas 360.000 muertes anuales a nivel mundial, representando el 7% de todas las muertes violentas (271). Según la OMS, esta cifra se eleva a 450.000 muertes al año (42). Por el incremento en las actividades lúdicas y deportivas acuáticas ha aumentado en todo el mundo en los últimos años (272) así como por el aumento de catástrofes naturales producidas por el agua (inundaciones, tormentas tropicales, huracanes e incluso tsunamis) (273,274).

El diagnóstico postmortem de la sumersión y las diferentes características relacionadas con el medio ambiente siguen siendo objeto de estudio, con el fin de mejorar su investigación. El diagnóstico se basa en gran medida en los resultados de la autopsia, con la realización de pruebas complementarias y la exclusión de otras causas de muerte, interpretados en el contexto de las circunstancias de la muerte y con la ayuda de la histopatología clásica, reforzada hoy con estudios como la proteína A del surfactante, así como de otros elementos de laboratorio como el estroncio y magnesio. En cadáveres recuperados en avanzado estado de putrefacción se hace aún más difícil el diagnóstico y la data de la misma (160).

Las investigaciones realizadas en el campo de la bioquímica, histología e inmunohistoquímica han revelado resultados de aplicación en el diagnóstico postmortem de la sumersión, contando con métodos útiles para el diagnóstico diferencial entre sumersión en agua dulce y salada (223,243,275-278). La proteómica al permitir la identificación de proteínas asociadas a una patología y su comportamiento podrían ser de utilidad en el campo de la patología forense (279), si bien actualmente se centra en determinar el intervalo postmortem (267,280,281).

Además, el estudio de elementos traza tanto en sangre como en humor vítreo en bajas concentraciones que se hayan presentes en el agua de sumersión pueden contribuir al diagnóstico de sumersión.

El objetivo general del estudio fue analizar elementos traza tanto en sangre como en humor vítreo en distintas causas de muerte y su posible aplicación en el diagnóstico de la muerte por sumersión y la posible aplicación de la proteómica.



Los objetivos específicos en los que se centra este estudio son:

1. Determinar las concentraciones de siete elementos traza en sangre de ventrículo derecho, sangre de ventrículo izquierdo, sangre periférica y humor vítreo en casos de muerte por sumersión y otras causas de muerte.
2. Estudiar si existen diferencias estadísticamente significativas en las concentraciones de estos elementos traza en muertes por sumersión y otras causas de muerte.
3. Analizar si existe correlación significativa entre los elementos traza en sangre, humor vítreo y el medio de sumersión.
4. Analizar si existe correlación significativa entre el intervalo postmortem y los elementos traza en sangre y humor vítreo.
5. Investigar el perfil proteómico en casos forenses como herramienta valiosa para mejorar el conocimiento de la fisiopatología de la sumersión y su posible aplicación para el diagnóstico y tratamiento en los casos de supervivencia.
6. Establecer un posible protocolo diagnóstico basado en el uso de elementos traza y el análisis proteómico como herramientas complementarias en el diagnóstico certero de la asfixia por sumersión.





3. MATERIAL Y MÉTODO



3.1. INVESTIGACIÓN BIOQUÍMICA DE FLUIDOS.

3.1.1. Casos forenses. Diseño del estudio.

La muestra del estudio estuvo formada por 137 autopsias médico legales, siendo 111 (81%) de las mismas muertes por sumersión en agua salada, mientras que los 26 restantes (19%) correspondieron a muertes por otras causas (figura 1) (16 (11,7%) de ellas correspondieron a muertes por otro tipo de asfixias y 10 (7,3%) de ellas a otras causas de muerte).

Los casos fueron clasificados en dos grupos según causa, lugar y circunstancia de la muerte, así como por los hallazgos macroscópicos de autopsia (hongo de espuma en vías respiratorias y cavidad bucal, líquido de sumersión en estómago y duodeno, aumento de peso de pulmones, tamaño de cavidades cardíacas), en dos grupos: muertes por sumersión y otras causas.

En los casos de sumersión en los estudios histológicos (tinción hematoxilina-eosina) se evidenció edema y dilatación intraalveolar de los espacios alveolares, con compresión secundaria de los capilares septales.

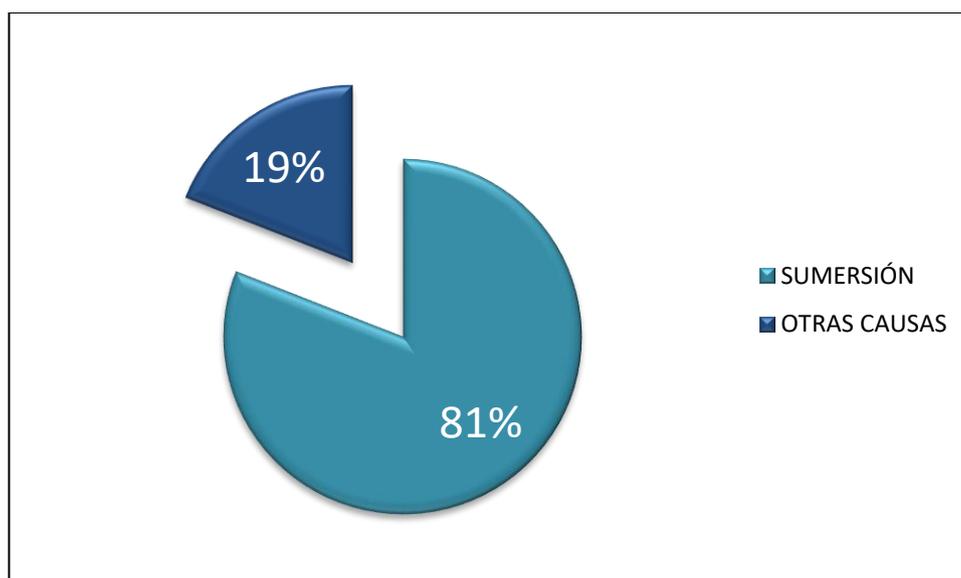


Figura 1. Distribución del total de muestras por grupos diagnósticos.

De las 137 muestras, 115 fueron varones (83,9%) y 22 fueron mujeres (16,1%) (figura 2).

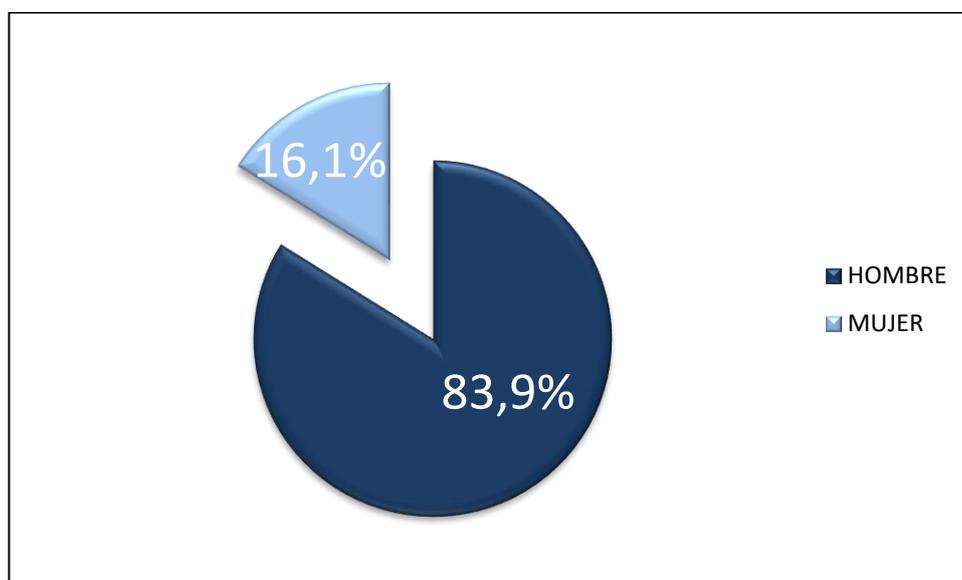


Figura 2. Distribución del total de muestras por grupos de sexo.

Todas las autopsias fueron llevadas a cabo en el Instituto de Medicina Legal y Ciencias Forenses de Cádiz, siendo aprobado el estudio por el Comité de Ética de Investigación de la Universidad de Murcia. (ID: 1898/2018, fecha de aprobación 13/4/2018).

3.1.2. Extracción de las muestras.

Las muestras obtenidas de cada cadáver fueron sangre de ventrículo derecho (VD), sangre de ventrículo izquierdo (VI) y sangre periférica (SP) obtenida de vena femoral y humor vítreo además de agua del medio donde se recogió el cadáver en los casos de muerte por sumersión.

3.1.3. Recogida de muestras.

Se extrajeron 5 ml de sangre de cada una de las localizaciones en un vial con EDTA. Las muestras de ventrículo izquierdo y ventrículo derecho se obtuvieron por punción a través de vena cava o aurícula derecha (sangre de VD) y aorta o ventrículo izquierdo (sangre de VI), en ambos casos por punción intracardiaca una vez retirado el pericardio para evitar contaminación. Las muestras de sangre periférica se obtuvieron por punción de arteria femoral, bien por punción intramuscular o mediante acceso a través de disección del triángulo de Scarpa. Las muestras fueron conservadas a -70°C y transportadas en frío hasta el Área de Medicina Legal y Forense de Murcia para la realización del estudio.

Las muestras de humor vítreo se obtuvieron por punción de globo ocular derecho mediante agujas de calibre 20 por punción en epicanto externo, procediéndose a almacenarlas a -70°C de igual manera que las muestras de sangre. Sólo se analizó el humor vítreo de globo ocular derecho ya que estudios previos señalan la no existencia de diferencias estadísticamente significativas en la concentración de elementos traza entre ambos globos oculares (282-284).

Se obtuvieron muestras de agua (100 ml) del lugar del suceso en el caso de las muertes por sumersión que también fueron conservadas a -70°C .

3.1.4. Análisis químico.

En todas las muestras recogidas se llevaron a cabo procedimientos analíticos para la determinación de 7 elementos traza: Boro (B), Bromo (Br), Calcio (Ca), Estroncio (Sr), Litio (Li), Magnesio (Mg) y Potasio (K). El análisis se llevó a cabo en el Servicio de Apoyo a la Investigación Tecnológica de la Universidad Politécnica de Cartagena.

3.1.5. Preparación de las muestras.

Las muestras fueron preparadas para la determinación de los siete elementos en sangre de ventrículo derecho, sangre de ventrículo izquierdo, sangre periférica, humor vítreo y agua del medio de sumersión usando espectrometría de masa de plasma acoplado inductivamente (ICP-MS).

3.1.6. Plasma de acoplamiento inductivo con espectrometría de masas (ICP-MS).

Una vez se realizó la preparación de las muestras, se procedió a identificación y cuantificación de los siete elementos estudiados mediante el uso de ICP-MS, para determinar la masa de dichos elementos. Esta técnica presenta como ventaja el bajo límite de detección de cantidad de elemento, lo que lo hace muy útil para la detección de elementos traza.

El equipo de ICP-MS fue el modelo Agilent 7500ce que presenta como características: automuestreador integrado (I-AS), cámara de nebulización tipo Scott doble paso refrigerada por Peltier a 2°C, nebulizador concéntrico MicroMist, bomba peristáltica de alta precisión con 3 canales y 10 rodillos, antorcha de cuarzo tipo Fassel con inyector de 2,5 mm de diámetro, conos de níquel, generador de radiofrecuencia de 27,12 MHz y 1600 W, filtro de masas cuadrupolar hiperbólico, detector simultáneo digital/analógico con 9 órdenes de magnitud de intervalo dinámico lineal, celda de colisión-reacción con helio gas de celda y software MassHunter (285).

Se llevó a cabo la optimización para maximizar la señal analítica y minimizar las interferencias con una solución de 1 µg/L de litio, cobalto, yodo, cerio y talio en HNO₃ al 1%. Scandium, galio, rodio y talio se añadieron a todas las muestras, estándares de calibración y blancos a concentración de 40 µg/L tras el análisis de las muestras de sangre en modo semicuantitativo para la selección de los estándares internos. La medición de los elementos se realizó en modo helio mientras que la cuantificación de los isótopos se hizo usando tres puntos centrales de los picos espectrales y el tiempo de integración por punto se ajustó a dos segundos con tres repeticiones para cada una de las determinaciones y una velocidad de la bomba a 0,2 rps tanto en el análisis como en el lavado (285).



La calibración del equipo fue realizada por el método de estándares externos mientras que las curvas de calibración se hicieron con al menos ocho soluciones de calibración multielementales incluyendo el blanco de calibración. Los coeficientes de regresión lineal conseguidos fueron $R^2 \geq 0,999$. Al comienzo de la secuencia analítica se llevó a cabo la recta de calibración; medición de patrones control y blancos cada diez muestras y al terminar el ensayo (285).

Las soluciones utilizadas se prepararon con agua ultrapura (18,2 M Ω -cm de resistividad) con el sistema Elix 3/Milli-Q Element System (Millipore, Billerica, MA, USA), HNO₃ (67% v/v) de Panreac como ácido nítrico, se adquirieron de High Purity Standards (Charleston, USA.) las soluciones estándar de 1000 mg/L de los elementos analizados y se prepararon los patrones de trabajo en HNO₃ al 1%. El instrumento se optimizó usando solución de optimización con 7-Li, 59-Co, 89-Y, 140-Ce y 205-Tl (1 μ g/L) de High Purity Standards (Charleston, USA) al igual que las soluciones de estándares internos de Scandium, galio, rodio y talio de 100 mg/L. Por último, el gas de argón fue de pureza espectral (>99,998%) (285).

Los límites de detección instrumentales (IDL) se obtuvieron calculando 3 veces la desviación estándar del blanco y la concentración equivalente de fondo (BEC) fue la señal del blanco indicada como concentración. Los resultados se muestran en la tabla 6.

Elemento	Isótopo (M7z)	Estándar Interno (m/z)	Rango (μ g/L)	IDL (μ g/L)	BEC (μ g/L)
Litio	7	45	0-200	0,286	0,208
Boro	11	45	0-200	0,687	0,504
Magnesio	24	45	0-10000	0,190	0,621
Potasio	39	45	0-10000	3,957	31,50
Calcio	44	45	0-10000	3,219	15,71
Bromo	79	71	0-2000	0,487	0,718
Estroncio	88	103	0-200	0,030	0,132

Tabla 6. Isótopos monitorizados, estándares internos, rangos de medida, IDL y BEC.



3.2. APROXIMACIÓN PROTEÓMICA

3.2.1. Diseño del estudio.

Para el estudio piloto proteómico, se seleccionaron 4 casos y se emparejaron por edad y género en las muertes por sumersión (un hombre y una mujer) y grupo control con diferente tipo fisiopatológico de muerte (muerte de un hombre por ahorcamiento y muerte de una mujer por politraumatismo). Los cuerpos se mantuvieron refrigerados entre 1-4 °C de temperatura desde su recepción en el Servicio de Patología hasta la realización de la correspondiente autopsia.

3.2.2. Procedimiento de extracción de fluidos biológicos.

Se tomaron muestras de sangre periférica femoral durante la realización de la autopsia mediante jeringa estéril procediéndose a su centrifugación inmediata después de la extracción para la obtención de plasma. Dichas muestras se almacenaron para su conservación a -70 °C hasta la realización del análisis bioquímico.

3.2.3. Extracción de proteínas.

La extracción de proteínas mayoritarias de las muestras de suero con acetonitrilo se realizó de acuerdo con el protocolo descrito por Kay et al. (286). Con este método se agotó un volumen total de 60 µl de suero humano. Cada alícuota se diluyó con 120 µl de agua y se agitó en vórtex para mezclar. Se añadió acetonitrilo (270 µL) a cada alícuota y la muestra se sonicó durante 10 minutos en un baño ultrasónico. Las muestras se sometieron a vórtex brevemente y luego se sonicaron durante 10 minutos más. Las muestras se centrifugaron a 12000xg durante 10 minutos a temperatura ambiente. Los sobrenadantes se recogieron en un tubo Eppendorf limpio y se evaporaron a sequedad en una centrífuga concentradora de vacío. La muestra se reconstituyó en 75 µl de tampón con Tris-HCl 0,2 M (pH = 8,5), SDS al 2% p / v, glicerol al 10% v / v.



La cuantificación de proteínas de todas las muestras se realizó con el kit de ensayo de proteínas BCA Pierce (Thermo Scientific, Rockford, IL, EEUU). La electroforesis en gel de dodecil sulfato de sodio-poliacrilamida (SDS-PAGE) se realizó a temperatura ambiente utilizando un gel hacinador de acrilamida al 50% y un gel de resolución del 10% de acrilamida (287). Las proteínas dentro de las bandas de gel se redujeron primero y fueron alquilados usando DTT y yodoacetamida, respectivamente, y luego se digirieron a péptidos mediante tripsina de grado de proteómica (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EEUU), como se ha descrito previamente (288). Los péptidos trípticos se analizaron por cromatografía líquida capilar de fase inversa acoplada a espectrometría de masas. La columna, BioBasic-18, (Thermo, San José, CA, EE. UU.), se conectó a un espectrómetro de masas con trampa de iones (LXQ, Thermo, San José, CA, EE. UU.). La fase móvil A fue ácido fórmico al 0,1% en agua y B fue ácido fórmico al 0,1% en metanol. La trampa de iones MS operó en un modo MS/MS dependiente de datos donde los cinco iones moleculares peptídicos más abundantes en cada exploración MS se seleccionaron secuencialmente para la disociación inducida por colisión con una energía de colisión normalizada del 34%. Se aplicó exclusión dinámica para minimizar la selección repetida de péptidos previamente seleccionados para la disociación inducida por colisión.

3.2.4. Búsqueda de base de datos.

Todas las muestras de MS/MS se analizaron utilizando Sequest (Thermo Fisher Scientific, San José, CA, EE. UU.; versión IseNode en Proteome Discoverer 2.3.0.523) y X! Tandem (versión 2017.2.1.4). Sequest se configuró para buscar en la base uniprot homo-sapiens (163787 entradas) después de la digestión con la enzima tripsina. Para X! Tandem se hizo una búsqueda con una tolerancia de masa de iones de 1,00 Dalton y una tolerancia de iones parental de 1,00 Dalton. Se buscó Sequest con tolerancia de masa de iones de 1,2 Da y una tolerancia de iones parental de 1,5 Da. Se realizó un ajuste de parámetros para la optimización de la técnica.

3.2.5. Criterios para la búsqueda de proteínas.



Se utilizó Scaffold (versión Scaffold_4.10.0, Proteome Software Inc., Portland, OR) para validar las identificaciones de péptidos y proteínas basadas en MS/MS. Las identificaciones de péptidos se aceptaron si pudieron establecerse con una probabilidad superior al 93,0% para lograr un FDR (tasa falsa de descubrimiento) inferior al 1,0%. Se aceptaron identificaciones de proteínas si podían establecerse con una probabilidad superior al 99,0% y contenían al menos 1 péptido identificado. Las probabilidades de proteínas fueron asignadas por el algoritmo Protein Prophet (289). Las proteínas que contenían péptidos similares y no podían diferenciarse basándose únicamente en el análisis MS/MS se agruparon para satisfacer los principios de parsimonia. Las proteínas que comparten evidencia significativa de péptidos se asignaron a grupos.

3.2.6. Experimento de validación.

Para validar el estudio seleccionamos 25 casos forenses, muertes por sumersión (N=16) y muertes por otras causas (N=9, cardiovasculares, ahorcadura, politraumatizados, arma blanca y reacción adversa a sustancias psicoactivas).

Las muestras de plasma fueron analizadas en el Servicio de Bioquímica Clínica del Hospital Universitario “Virgen de la Arrixaca” para cuantificar los niveles de apolipoproteína A-1 y α -1 antitripsina por inmunonefelometría en un equipo BN ProSpec de Siemens Healthcare Diagnostic (Marburg, Alemania).

El método se basa en el hecho que las proteínas analizadas forman complejos inmunes con anticuerpos específicos que pueden dispersar un haz de luz incidente dentro de una reacción inmunoquímica. La intensidad de la dispersión de la luz es proporcional a la concentración de la proteína analizada en la muestra.

El “N Antiserum to Human Apolipoproteína A-I assay! (Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH Marburg/Germany) fue utilizado para la determinación de apolipoproteína A1, con un coeficiente de variación intra e interensayo de 2.7 y 2.3, respectivamente. Para la prueba de α -1 antitripsina, “el N antiserum for Human α -1 antitripsina (Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH Marburg/Germany), con coeficientes intra e interensayo de variación de 2.7 y 1.9, respectivamente.



3.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico se llevó a cabo con el programa informático SPSS versión 21.0 en el área de Medicina Legal y Forense de la Universidad de Murcia, en el caso de las muestras de sangre y de humor vítreo, mientras que los análisis estadísticos se realizaron con el software SPSS versión 24.0 para Windows (IBM SPSS Statistics, Inc., Chicago, IL, EE.UU) para el estudio proteómico, realizándose los siguientes análisis:

3.3.1. Análisis descriptivo de los datos.

Se realizó un análisis descriptivo con el objetivo de organizar los datos consistentes en parámetros de centralización (media y mediana) y parámetros de dispersión (rango intercuartil, máximo, mínimo y desviación típica).

3.3.2. Análisis de comparación de medias.

Tras la comprobación de que las variables estudiadas no presentaban distribución normal y su comprobación mediante el Test de Kolmogorov-Smirnov, se empleó como test no paramétrico el Test de la U de Mann-Whitney para la comparación de valores de variables cuantitativas de muestras independientes con tamaños distintos que en el estudio realizado se utiliza para la valoración de dos grupos diagnósticos (muerte por sumersión y otras causas).

En relación al análisis proteómico, cada variable categórica se expresa como frecuencia (porcentaje) de casos. Las variables continuas se probaron para determinar la distribución normal mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov. La distribución normal de las variables continuas se muestra como media \pm DE, y las distribuidas no paramétricamente se muestran como mediana (rango intercuartílico). Las diferencias entre los grupos fueron evaluadas por t student no emparejado o U de Mann-Whitney para variables continuas y prueba ANOVA o Kruskal-Wallis (según sea apropiado).



En los test aplicados se han considerado diferencias estadísticamente significativas para una probabilidad $p \leq 0,05$.

3.3.3. Análisis de correlación.

Se aplicó el análisis de correlación para la valoración de asociación entre dos variables cuantitativas. La cuantificación de la fuerza de asociación lineal entre dos variables se realizó mediante el cálculo del coeficiente de correlación de Pearson cuyo valor oscila entre -1 y +1 (1 indica una correlación lineal y perfecta, -1 indicaría una correlación lineal e imperfecta y 0 indicaría una ausencia de relación lineal entre las variables).

En el estudio, las variables no siguieron una distribución normal utilizando para comprobar la asociación entre las variables la Correlación de Spearman (estudia la relación entre variables continuas aleatorias, siendo similar al coeficiente de Pearson).

3.3.4. Curvas ROC (curva de característica operativa para el receptor).

El análisis de las curvas ROC se realizó para determinar la exactitud diagnóstica de los test que utilizan escalas continuas con el fin de determinar el punto de corte de sensibilidad y especificidad más alta, evaluación de la capacidad discriminativa del test diagnóstico y comparación de la capacidad discriminativa de dos o más test diagnóstico expresando sus resultados en escalas continuas.

La curva ROC se construyó en base a la unión de distintos puntos de corte, correspondiente el eje Y a la sensibilidad y el eje X a (1-especificidad) de cada uno de ellos. Ambos ejes incluyeron valores entre 0 y 1 (0% a 100%). El punto de corte que determinó 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-especificidad) fuese 0. Ese punto de corte es en el que la sensibilidad y especificidad del test están equilibradas.

En las gráficas de curva ROC se trazó una línea desde el punto 0,0 al punto 1,1 (diagonal de referencia o línea de no-discriminación) que describe la capacidad discriminativa de un test diagnóstico que tendrá mayor capacidad discriminativa cuando los puntos de corte tracen una curva ROC lo más lejana a la línea de no discriminación. Así cuanto más próxima es una curva ROC a la esquina superior izquierda, más alta es la exactitud de la prueba. Si se dibujan en un mismo gráfico las curvas obtenidas con distintas pruebas diagnósticas, aquella que esté más hacia arriba e izquierda tiene mayor exactitud. Se considera un test diagnóstico no discriminativo si su curva ROC coincide con la línea de no-discriminación, la cual posee un área=0,50.

En el estudio se realizó curva ROC para cada elemento químico tanto en muestras de sangre como humero vítreo y se calculó el área bajo la curva empleando un método no paramétrico. Este análisis ha sido utilizado para evaluar la eficacia diagnóstica de cada elemento traza o su capacidad para discriminar entre sumersión y otras causas de muerte. Superponiendo las curvas a las distintas ecuaciones de regresión se puede identificar los marcadores con mayor sensibilidad y especificidad. Para ello se seleccionaron los elementos traza con áreas bajo la curva mayores de 0,60.

Para las concentraciones a apolipoproteína A1 y α -1 antitripsina, se determinó una curva característica operativa del receptor (ROC) dibujado, y el área bajo la curva se midió utilizando una prueba no paramétrica. La capacidad de una prueba para discriminar entre sumersión y otras causas de muerte se evaluó mediante el análisis de la curva ROC. Este análisis proporciona una excelente vista.

Seleccionamos marcadores con áreas por debajo de la curva superiores a 0,60. El punto de corte se tomó como el punto más cercano al punto “ideal” de la curva ROC con mejor sensibilidad y especificidad.



3.3.5. Análisis de regresión.

El análisis de regresión es una técnica que permitió estimar las relaciones entre las variables a nivel estadístico. Se basa en el análisis del vínculo entre una variable dependiente y una o varias variables independientes y a partir de dicho estudio hallar una relación entre las variables. De esta manera se puede construir una función que permite identificar el valor futuro de la variable del estudio.

En nuestro estudio se tuvo en cuenta una variable independiente, muerte por sumersión, siendo el resto de variables dependiente, y, por lo tanto, un análisis de regresión logística. Se aplicó para estudiar la posible relación entre la muerte por sumersión y los elementos traza en las distintas muestras de sangre y humor vítreo, así como la relación entre muerte por sumersión y edad, sexo, peso de pulmones e intervalo postmortem.

Además, en el estudio proteómico realizamos un análisis multivariado por regresión lineal ajustado por factores de confusión como edad y sexo, para identificar los factores asociados de forma independiente a los biomarcadores.

3.3.6. Análisis discriminante.

Este análisis se realizó para construir un modelo predictivo para predecir el grupo al que pertenece un caso a partir de las características observadas del mismo. Con ello se consiguió identificar las características diferenciadoras entre grupos y se crea una función capaz de diferenciar con mayor exactitud los posibles miembros de un grupo o de otro. La pertenencia a los grupos es conocida de antemano y se utiliza como variable dependiente mientras que aquellas variables que suponemos que se diferencian de los grupos se usan como variables independientes o discriminantes.

El fin es hallar la combinación lineal de las variables independientes que mejor permite diferenciar a los grupos para que pueda utilizarse para sistematizaciones nuevas.



En el estudio realizamos el análisis discriminante en los elementos traza con curvas ROC que mejor discriminaban entre muertes por sumersión y muertes por otras causas, utilizando como variable dependiente el grupo diagnóstico y como discriminante las concentraciones de los elementos traza.

Para el análisis discriminante se probó el punto de corte de apolipoproteína A1 para determinar su capacidad para distinguir entre dos grupos de diagnóstico. Una limitación del método es que no se pueden aplicar múltiples correcciones de prueba.

3.3.7. Análisis de componentes principales.

El análisis de componentes principales (PCA) es uno de los métodos estadísticos de datos multivariantes más populares. La interpretación estadística de datos multidimensionales obtenidos a partir de métodos analíticos es compleja. Actualmente existen herramientas estadísticas que en este campo nos permiten la individualización y separación de elementos (290). El análisis de componentes principales (PCA) es un procedimiento estadístico que permite describir una gran cantidad de conjuntos de datos en un número mucho menor de variables llamadas componentes principales (PC). El objetivo principal del PCA es reducir la información contenida en variables multivariantes continuas (cuantitativas) sin perder información importante y simplificar así su representación e interpretación. Este análisis se basa en las abundancias normalizadas para separar visualmente las muestras de acuerdo con las variaciones en la abundancia de los distintos elementos analizados en cada muestra.

Se aplicó PCA a la concentración de elementos observada en las muestras de humor vítreo y sangre que fueron exportadas a Progenesis mediante el software R, versión 3.4.3, (<http://cran.r-project.org/>) (291), utilizando el paquete FactoMineR (292,293), para estimar una aproximación de la concentración de trazas de elementos y optimizar la caracterización de las muestras en función de estas concentraciones y de la causa de la muerte y obtener una representación simple en relación con las variables (concentraciones de elementos traza) que mejor las discriminan (293).



El primer componente principal describe las características medias brutas del conjunto de datos, mientras que el segundo y los componentes principales siguientes introducen características específicas avanzadas de importancia decreciente. Como resultado, cada muestra puede construirse formando una combinación lineal apropiada de los componentes principales; la consideración de más PC proporcionará una aproximación más cercana a los datos de muestra reales en sí. Este procedimiento promueve la clasificación, y posiblemente la individualización, de conjuntos de datos de una forma objetiva y reproducible (290).

Las dimensiones ofrecidas por PCA representan combinaciones de múltiples variables y modalidades como un método para reducir la información de nuestros datos a un simple método de interpretación. Una dimensión es construida a partir de la combinación de las variables empleadas en el análisis, la posición relativa en el eje indica la correlación en esa dimensión. Utilizamos PCA biplot para visualizar una aproximación de grandes cantidades de datos de forma dimensional. Con esta aproximación bidimensional se pueden realizar consideraciones simultáneas sobre los elementos traza, el tipo de muerte diferenciado por tipo de matriz (sangre o humor vítreo).





4. RESULTADOS



4.1. INVESTIGACIÓN BIOQUÍMICA DE FLUIDOS.

4.1.1. Análisis descriptivo de la muestra y de las diferencias según edad, intervalo postmortem, peso pulmonar y causa de la muerte.

La edad media de los fallecidos fue de 48,24 años (edades comprendidas entre los 15 y los 92 años), presentando un intervalo medio postmortem de 27,87 horas (periodo comprendido entre 11 y 242 horas entre el hallazgo del fallecido y la realización de la autopsia). El peso medio de pulmón derecho fue de 740,77 gramos mientras que el peso medio de pulmón izquierdo fue de 650,19 gramos.

Diferenciando por causas de muerte, en las muertes por sumersión la edad media fue de 48,58 años (figura 3), con un intervalo medio postmortem de 29,01 horas (figura 4) y un peso medio de pulmón derecho de 753,44 gramos mientras que el peso medio de pulmón izquierdo fue de 663,50 gramos (figura 5). En las muertes por otras causas, la edad media fue de 55,07 años (figura 3), el intervalo medio postmortem fue de 23 horas (figura 4) y los pesos medios de pulmón derecho e izquierdo fueron de 678,0 gramos y 584,27 gramos, respectivamente (figura 5).

No hallamos diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos de causas de muerte ni en la edad de los fallecidos, ni en el intervalo postmortem. En relación a los pesos tanto de pulmón derecho como de pulmón izquierdo en las muertes por sumersión fueron significativamente superiores frente a otras causas de muerte (tabla 7).

		Edad	Peso pulmón dcho (gr)	Peso pulmón izqdo (gr)	Intervalo postmortem
Sumersión	Media	46,5888	753,4404	663,5046	29,0180
	Desviación estándar	19,42521	211,40962	193,37172	27,93824
Otra causa	Media	55,0769	678,0000	584,2727	23,0000
	Desviación estándar	18,28863	232,71646	192,37072	8,55102
Total	Media	48,2481	740,7710	650,1985	27,8759
	Desviación estándar	19,43653	216,05610	194,74747	25,50244
Probabilidad*		,054	,049	,043	,251

Tabla 7. Valores descriptivos de edad, peso de pulmones e intervalo postmortem en los casos.

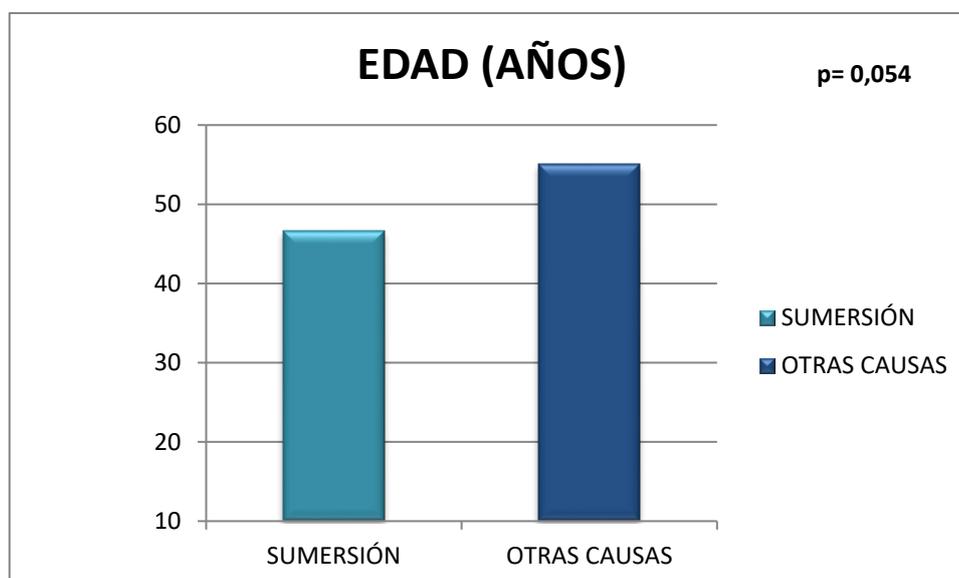


Figura 3. Distribución de la edad en relación a la causa de muerte.

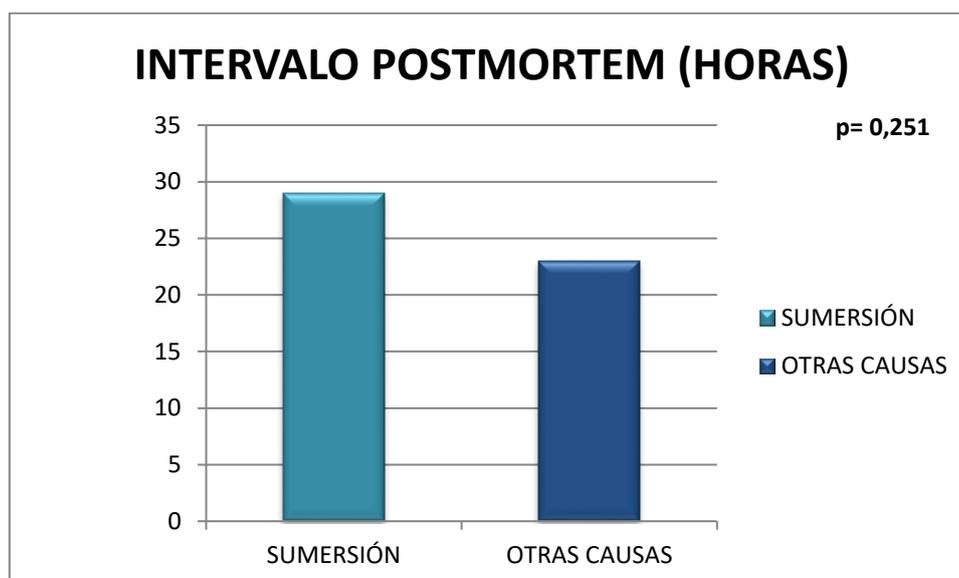


Figura 4. Media del intervalo postmortem según las causas de muerte.

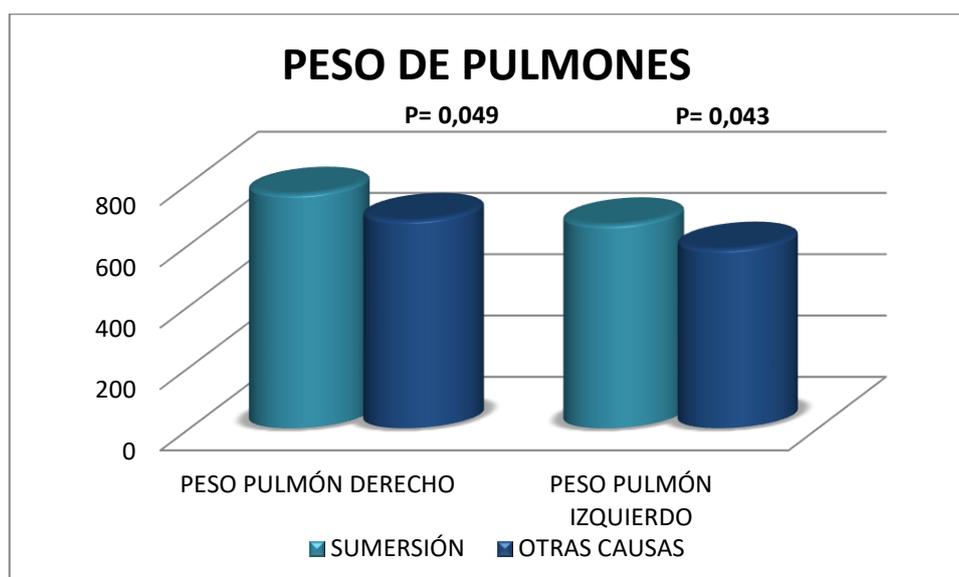


Figura 5. Media de los pesos pulmonares según causa de muerte.

En relación al tipo de muerte, la distribución de los casos fue la siguiente: 81% de muertes por sumersión, 11,7% de muertes de otras etiologías asfícticas (sofocación, ahorcadura) y 7,3% correspondientes a otras causas de muertes no asfícticas (figura 6).

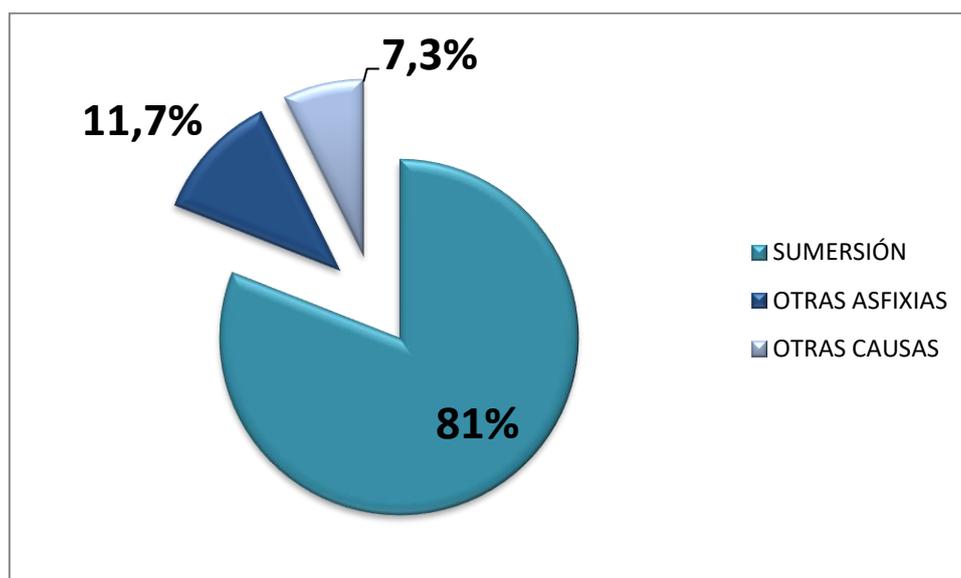


Figura 6. Distribución de las muestras por subgrupos diagnósticos.

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

Las tablas de la 8 a la 14 muestran los valores descriptivos (medias, desviación estándar, mínimo, máximo, mediana y rango intercuartil) además de la significación asintótica (*P*) obtenidos para boro, bromo, calcio, estroncio, litio, magnesio y potasio tanto en sangre de ventrículo derecho, sangre periférica y sangre de ventrículo izquierdo en el grupo de fallecidos por sumersión y en el grupo otra causa de muerte expresadas en mg/l. En la figura 7 se muestran los valores medios de los elementos en las distintas localizaciones en las muertes por sumersión y muertes por otras causas.

El estudio del boro reveló la existencia diferencias estadísticamente significativas entre los casos de sumersión y otras causas de muerte, mostrándose una elevada concentración de boro en las tres localizaciones en el caso de la sumersión, siendo mayor en las muestras de ventrículo izquierdo (VD 264,33 mg/l, SP 161,61mg/l y VI 331,43 mg/l) (tabla 8 y figura 7a).

Causa de la muerte		Boro VD mg/l	Boro SP mg/l	Boro VI mg/l
Sumersión	Media	264,333	161,619	331,430
	Desviación estándar	327,194	111,492	281,818
	Mínimo	,000	,000	,000
	Máximo	2612,500	407,170	1054,413
	Mediana	190,500	145,095	270,242
	Rango intercuartil	157,076	145,884	205,390
Otra causa	Media	123,017	74,837	79,369
	Desviación estándar	115,355	67,376	59,170
	Mínimo	,000	,000	,000
	Máximo	393,671	205,708	214,355
	Mediana	96,950	61,860	75,658
	Rango intercuartil	144,860	129,811	67,322
Total	Media	233,457	142,168	274,933
	Desviación estándar	299,542	109,215	270,871
	Mínimo	,000	,000	,000
	Máximo	2612,500	407,170	1054,413
	Mediana	155,742	133,763	181,506
	Rango intercuartil	160,110	137,716	262,270
P*		,002	,000	,000

Tabla 8. Estadísticos descriptivos de las concentraciones de boro en sangre en las tres localizaciones y diferencias entre muertes por sumersión (n=111) y otras causas de muerte (n=26). VD; Ventrículo derecho, VI: ventrículo izquierdo, SP: sangre periférica. * Probabilidad: Prueba de Mann-Whitney

En el caso del boro hallamos diferencias estadísticamente significativas para las tres localizaciones para las muestras de sangre, siendo más elevadas en sangre de ventrículo izquierdo. Sin embargo, dichas diferencias fueron menores que en el caso del boro además de presentar concentraciones medias menores (VD 15,18 mg/l, SP 14,80 mg/l y VI 15,95mg/l) (tabla 9 y figura 7b).



Causa de la muerte		Bromo VD mg/l	Bromo SP mg/l	Bromo VI mg/l
Sumersión	Media	15,183	14,803	15,951
	Desviación estándar	7,34329995	9,920	7,725
	Mínimo	5,738	3,703	5,961
	Máximo	41,570	48,990	44,510
	Mediana	14,198	10,843	15,470
	Rango intercuartil	8,917	7,934	8,824
Otra causa	Media	11,770	11,713	7,644
	Desviación estándar	7,097	8,290	3,177
	Mínimo	1,849	2,654	2,366
	Máximo	26,140	35,061	15,069
	Mediana	11,687	8,583	7,661
	Rango intercuartil	6,654	5,157	4,207
Total	Media	14,431	14,133	14,121
	Desviación estándar	7,397	9,642	7,780
	Mínimo	1,849	2,654	2,366
	Máximo	41,570	48,990	44,510
	Mediana	12,670	10,736	12,149
	Rango intercuartil	9,614	8,314	7,921
p*		,016	,047	,000

Tabla 9. Estadísticos descriptivos de las concentraciones de bromo en sangre en las tres localizaciones y diferencias entre muertes por sumersión (n=111) y otras causas de muerte (n=26). VD; Ventrículo derecho, VI: ventrículo izquierdo, SP: sangre periférica. * Probabilidad: Prueba de Mann-Whitney

Las concentraciones de calcio en las tres localizaciones sanguíneas fueron significativamente más elevadas en los casos de sumersión que en el grupo de otras causas de muerte, siendo más elevadas a nivel de sangre de ventrículo izquierdo (VD 129,60 mg/l, SP 142,81mg/l y VI 153,98 mg/l). Cabe mencionar que a nivel de sangre periférica la diferencia estadística fue menor (tabla 10 y figura 7c).



Causa de la muerte		Calcio VD mg/l	Calcio SP mg/l	Calcio VI mg/l
Sumersión	Media	129,601	142,813	153,987
	Desviación estándar	33,664	33,601	50,492
	Mínimo	36,657	38,080	34,618
	Máximo	210,830	214,519	345,120
	Mediana	130,532	141,823	145,535
	Rango intercuartílico	54,921	31,692	54,681
Otra causa	Media	103,403	133,151	109,743
	Desviación estándar	17,362	25,293	32,117
	Mínimo	79,435	94,133	44,315
	Máximo	141,477	187,773	161,873
	Mediana	100,841	130,932	108,753
	Rango intercuartílico	24,189	33,452	35,093
Total	Media	123,829	140,720	144,238
	Desviación estándar	32,631	32,136	50,423
	Mínimo	36,657	38,080	34,618
	Máximo	210,830	214,519	345,120
	Mediana	119,750	139,927	135,323
	Rango intercuartílico	45,968	34,743	48,954
p*		,000	,048	,000

Tabla 10. Estadísticos descriptivos de las concentraciones de calcio en sangre en las tres localizaciones y diferencias entre muertes por sumersión (n=111) y otras causas de muerte (n=26). VD; Ventrículo derecho, VI: ventrículo izquierdo, SP: sangre periférica. *

Probabilidad: Prueba de Mann-Whitney

Las concentraciones de estroncio en las tres localizaciones sanguíneas fueron significativamente más elevadas en los casos de sumersión que en el grupo de otras causas de muerte, siendo más elevadas a nivel de sangre de ventrículo izquierdo (VD 444,43mg/l, SP 264,80 mg/l y VI 628,84 mg/l) (tabla 11 y figura 7d).



Causa de la muerte		Estroncio VD mg/l	Estroncio SP mg/l	Estroncio VI mg/l
Sumersión	Media	444,430	264,804	628,844
	Desviación estándar	549,939	287,384	625,303
	Mínimo	31,660	40,65000	32,540
	Máximo	3823,950	1609,915	2355,400
	Mediana	303,078	177,010	404,000
	Rango intercuartílico	361,115	164,152	554,757
Otra causa	Media	71,004	74,691	63,664
	Desviación estándar	50,090	38,075	29,318
	Mínimo	40,640	45,435	30,700
	Máximo	234,955	194,067	136,958
	Mediana	54,022	63,768	53,281
	Rango intercuartílico	19,755	29,783	18,969
Total	Media	362,841	223,267	502,165
	Desviación estándar	510,234	266,314	599,017
	Mínimo	31,660	40,650	30,700
	Máximo	3823,950	1609,915	2355,400
	Mediana	210,996	129,926	246,740
	Rango intercuartílico	258,095	195,006	561,269
p*		,000	,000	,000

Tabla 11. Estadísticos descriptivos de las concentraciones de estroncio en sangre en las tres localizaciones y diferencias entre muertes por sumersión (n=111) y otras causas de muerte (n=26). VD; Ventrículo derecho, VI: ventrículo izquierdo, SP: sangre periférica. * Probabilidad: Prueba de Mann-Whitney

En el caso del litio las concentraciones en las tres localizaciones sanguíneas fueron significativamente más elevadas en los casos de sumersión que en el grupo de otras causas de muerte, presentando mayores concentraciones a nivel de ventrículo izquierdo para las muestras de sumersión (VD 8,90 mg/l, SP 7,60 mg/l y VI 15,97 mg/l) (tabla 12 y figura 7f).



Causa de la muerte		Litio VD mg/l	Litio SP mg/l	Litio VI mg/l
Sumersión	Media	8,909	7,600	15,973
	Desviación estándar	9,635	11,379	20,553
	Mínimo	,000	,000	,000
	Máximo	43,420	58,802	99,950
	Mediana	5,970	4,429	10,345
	Rango intercuartil	8,358	4,897	16,988
Otra causa	Media	,700	,893	,607
	Desviación estándar	1,137	1,418	1,170
	Mínimo	,000	,000	,000
	Máximo	3,523	4,080	3,227
	Mediana	,000	,000	,000
	Rango intercuartil	1,411	1,777	,873
Total	Media	7,211	6,259	12,847
	Desviación estándar	9,212	10,536	19,355
	Mínimo	,000	,000	,000
	Máximo	43,420	58,802	99,950
	Mediana	4,347	3,688	5,430
	Rango intercuartil	9,449	6,165	14,842
p*		,000	,000	,000

Tabla 12. Estadísticos descriptivos de las concentraciones de litio en sangre en las tres localizaciones y diferencias entre muertes por sumersión (n=111) y otras causas de muerte (n=26). VD; Ventrículo derecho, VI: ventrículo izquierdo, SP: sangre periférica. * Probabilidad: Prueba de Mann-Whitney

Los valores de magnesio hallados en las tres localizaciones revelaron altas concentraciones del mismo en las muertes por sumersión en relación a otras causas de muerte, siendo más elevadas a nivel de las muestras de ventrículo izquierdo para los casos de sumersión (VD 115,19mg/l, SP 84,15 mg/l y VI 149,98 mg/l) (tabla 13 y figura 7e).



Causa de la muerte		Magnesio VD mg/l	Magnesio SP mg/l	Magnesio VI mg/l
Sumersión	Media	115,196	84,159	149,987
	Desviación estándar	62,492	34,212	107,568
	Mínimo	35,496	36,946	34,158
	Máximo	280,340	179,800	425,500
	Mediana	100,535	74,097	127,207
	Rango intercuartílico	44,437	32,610	86,223
Otra causa	Media	68,020	52,140	55,378
	Desviación estándar	24,799	21,731	23,094
	Mínimo	37,091	29,080	24,664
	Máximo	111,349	105,214	111,381
	Mediana	62,276	49,573	59,330
	Rango intercuartílico	35,586	29,228	29,641
Total	Media	104,801	77,104	129,141
	Desviación estándar	59,619	34,480	103,268
	Mínimo	35,496	29,080	24,664
	Máximo	280,340	179,800	425,500
	Mediana	94,839	68,988	94,954
	Rango intercuartílico	42,738	39,618	81,291
p*		,000	,000	,000

Tabla 13. Estadísticos descriptivos de las concentraciones de magnesio en sangre en las tres localizaciones y diferencias entre muertes por sumersión (n=111) y otras causas de muerte (n=26). VD; Ventrículo derecho, VI: ventrículo izquierdo, SP: sangre periférica. *

Probabilidad: Prueba de Mann-Whitney

En el caso de potasio no existieron diferencias estadísticamente significativas entre las concentraciones de ambos grupos de causa de muerte y las tres localizaciones sanguíneas (tabla 14 y figura 7g).



Causa de la muerte		Potasio VD mg/l	Potasio SP mg/l	Potasio VI mg/l
Sumersión	Media	1612,303	1479,437	1373,058
	Desviación estándar	418,691	505,954	467,550
	Mínimo	897,422	639,034	693,656
	Máximo	2885,127	2769,254	2432,099
	Mediana	1561,532	1417,403	1262,087
	Rango intercuartílico	640,276	778,857	773,835
Otra causa	Media	1670,055	1257,743	1348,526
	Desviación estándar	681,983	400,008	576,092
	Mínimo	566,938	544,362	656,042
	Máximo	3007,285	1931,589	2879,031
	Mediana	1670,651	1245,116	1367,606
	Rango intercuartílico	950,545	552,992	736,609
Total	Media	1625,028	1431,404	1367,653
	Desviación estándar	486,112	492,022	490,962
	Mínimo	566,938	544,362	656,042
	Máximo	3007,285	2769,254	2879,031
	Mediana	1614,696	1402,950	1301,124
	Rango intercuartílico	640,276	631,339	794,368
p*		,622	,129	,436

Tabla 14. Estadísticos descriptivos de las concentraciones de potasio en sangre en las tres localizaciones y diferencias entre muertes por sumersión (n=111) y otras causas de muerte (n=26). VD; Ventrículo derecho, VI: ventrículo izquierdo, SP: sangre periférica. *

Probabilidad: Prueba de Mann-Whitney

En la figura 7 (a-boro, b-bromo, c-calcio, d-estroncio, e-magnesio, f-litio y g-potasio) se muestran los valores de cada uno de los elementos traza comparando las muestras de sumersión y otras causas de muerte. Los valores más elevados tanto a nivel de ventrículo derecho, ventrículo izquierdo y sangre periférica fueron para boro, estroncio y potasio, con una mayor diferencia entre sumersión y otras causas de muerte para el estroncio en todas las muestras de sangre. Sin embargo, las diferencias estadísticamente mayores han sido para litio, magnesio y estroncio (tablas 11, 12 y 13).



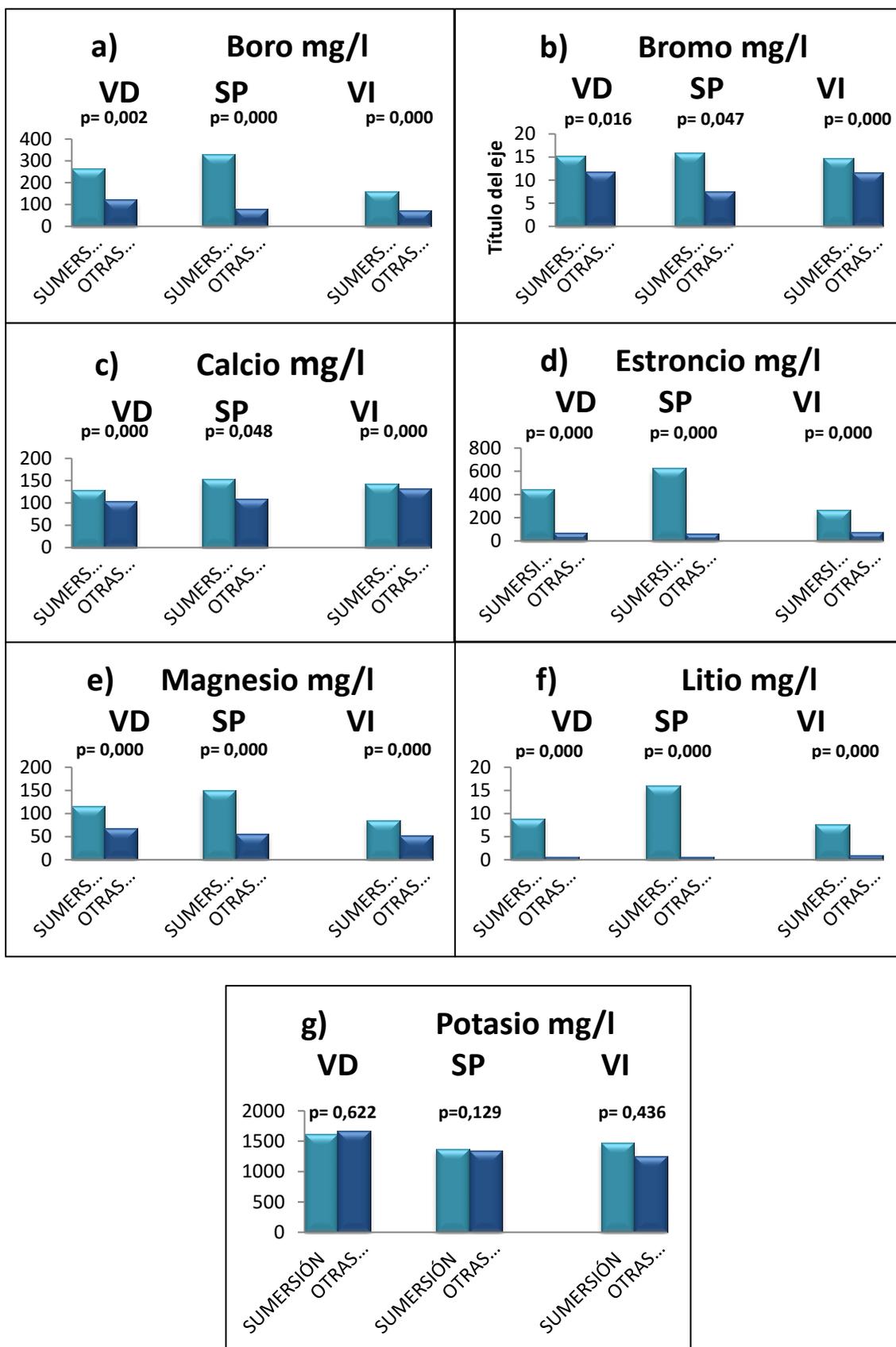


Figura 7. Valores hallados en VD, SP y VI de B (a), Br (b), Ca (c), Sr (d), Li (e), Mg (f) y K (g) en muertes por sumersión y otras causas de muerte.



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

Con respecto a las muestras de humor vítreo, el estudio reveló diferencias estadísticamente significativas en las concentraciones de bromo, litio, boro, estroncio, magnesio y potasio, siendo más elevadas en los casos de litio, boro y estroncio. No se mostraron diferencias significativas para las concentraciones de calcio (tablas 15 y 16 y figura 8).



Causa de la muerte		Bromo HV ng/l	Litio HV ng/l	Boro HV ng/l	Estroncio HV ng/l
Sumersión	Media	5,802	6,871	102,324	101,695
	Desviación estándar	6,797	13,234	165,048	207,216
	Mínimo	1,499	,000	,000	12,303
	Máximo	29,721	51,732	839,769	1055,333
	Mediana	3,254	2,021	45,284	55,190
	Rango intercuartílico	1,297	2,249	87,267	27,204
Otra causa	Media	2,880	4,582	35,064	37,058
	Desviación estándar	,524	18,661	53,430	10,308
	Mínimo	2,022	,000	,000	25,124
	Máximo	3,713	83,768	160,273	64,253
	Mediana	3,050	,000	9,827	35,902
	Rango intercuartílico	,586	,739	49,526	8,679
Total	Media	5,163	6,394	86,972	86,941
	Desviación estándar	6,125	14,449	149,625	183,839
	Mínimo	1,499	,000	,000	12,303
	Máximo	29,721	83,768	839,769	1055,333
	Mediana	3,228	1,837	43,290	48,071
	Rango intercuartílico	1,093	2,976	93,911	27,538
P*		,013	,000	,004	,002

Tabla 15. Estadísticos descriptivos de las concentraciones de bromo, litio, boro y estroncio en humor vítreo y diferencias entre muertes por sumersión (n=111) y otras causas de muerte (n=26).



Causa de la muerte		Magnesio HV ng/l	Potasio HV ng/l	Calcio HV ng/l
Sumersión	Media	41,308	506,995	61,579
	Desviación estándar	57,415	219,481	40,695
	Mínimo	11,699	65,975	5,183
	Máximo	296,877	1053,705	195,344
	Mediana	25,708	436,075	62,947
	Rango intercuartílico	6,928	177,760	45,517
Otra causa	Media	23,318	385,073	63,309
	Desviación estándar	2,142	96,126	17,965
	Mínimo	18,475	176,582	31,836
	Máximo	26,109	539,988	83,299
	Mediana	24,419	347,926	75,141
	Rango intercuartílico	2,846	115,693	33,809
Total	Media	37,331	480,869	61,957
	Desviación estándar	51,160	205,369	36,857
	Mínimo	11,699	65,975	5,183
	Máximo	296,877	1053,705	195,344
	Mediana	24,419	431,552	64,025
	Rango intercuartílico	4,481	176,293	39,392
P*		,022	,024	,142

Tabla 16. Estadísticos descriptivos de las concentraciones de magnesio, potasio y calcio en humor vítreo y diferencias entre muertes por sumersión (n=111) y otras causas de muerte (n=26).

En la figura 8, se muestran las concentraciones medias de los 7 elementos traza en humor vítreo en los casos de sumersión y otras causas de muerte. Con excepción de las concentraciones de calcio, el resto de los elementos son significativamente superiores en los casos de sumersión.



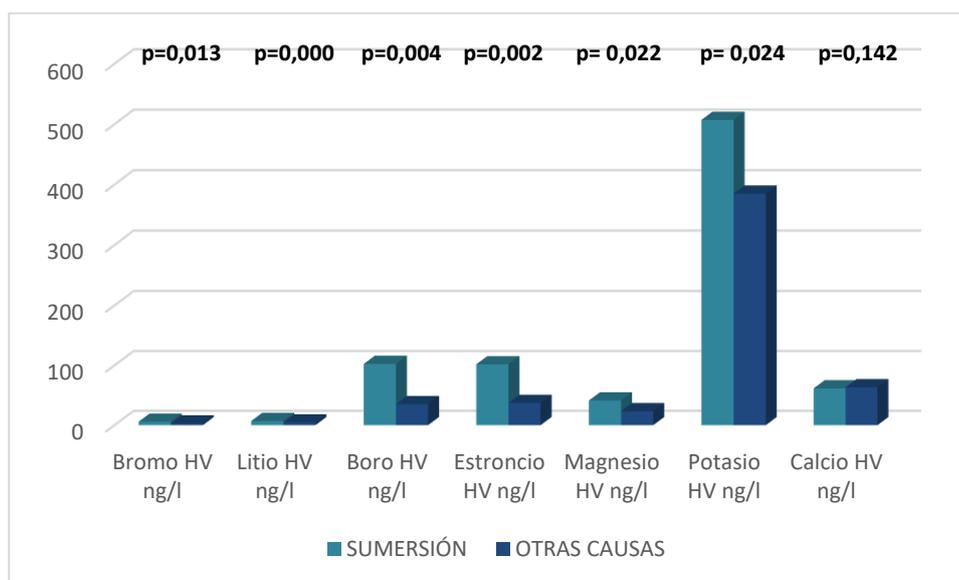


Figura 8. Concentraciones Br, Li, B, Sr, Mg, K y Ca en humor vítreo en muertes por sumersión y otras causas de muerte.

4.1.4. Análisis de las diferencias entre las concentraciones de elementos traza en agua de sumersión.

Con respecto a las concentraciones halladas de los elementos traza estudiados en el agua de sumersión, hallamos altas concentraciones para bromo, magnesio, potasio y calcio expresadas en mg/l, mientras que para litio, boro y estroncio las concentraciones halladas fueron menores ($\mu\text{g/l}$) (tabla 17 y figura 9).

	Br mg/l	Li µg/l	B µg/l	Sr µg/l	Mg mg/l	K mg/l	Ca mg/l
Media	60,147	134,22 5	3029,798	7096,525	1051,294	380,263	401,452
Desviación estándar	43,446	88,269	2086,975	4886,564	765,504	240,141	251,453
Mínimo	,05	,21	39,03	6,88	,54	2,11	5,34
Máximo	110,44	245,02	5090,89	12510,96	2047,34	788,31	677,78
Mediana	72,725	160,46 8	3930,879	8300,493	1223,063	430,600	477,706
Rango intercuartil	102,43	207,09	4893,16	11376,68	1777,22	416,45	571,36

Tabla 17. Concentraciones de elementos traza en el agua de sumersión (n=111).

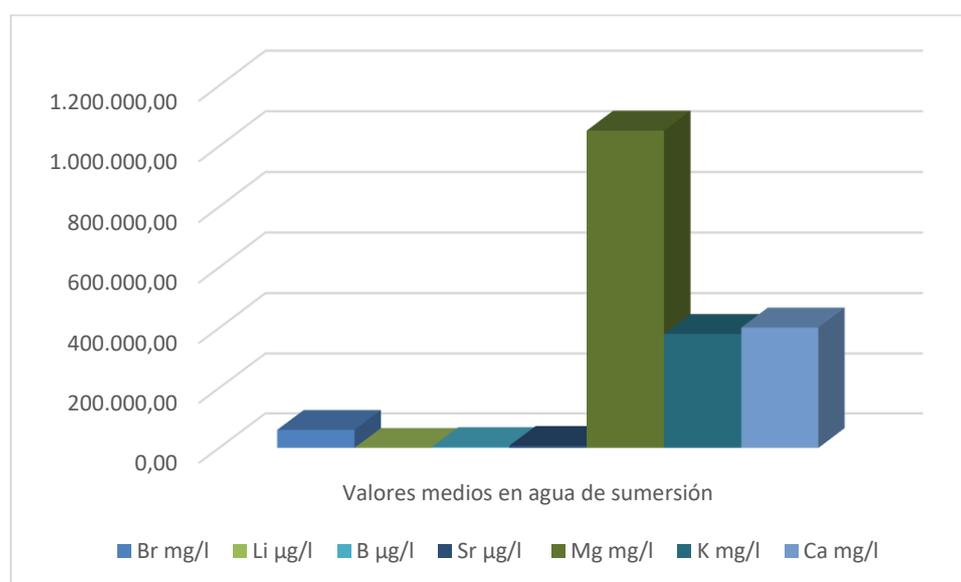


Figura 9. Valores medios de elementos traza hallados en agua de sumersión.

4.1.5. Análisis de correlaciones de elementos traza en humor vítreo, sangre y agua en muertes por sumersión.

En el análisis de correlaciones de los elementos traza entre humor vítreo, sangre y agua de sumersión, encontramos una fuerte correlación estadísticamente significativa en el caso de litio entre todas las localizaciones (tabla 18). Las correlaciones de bromo entre



agua de sumersión - sangre de ventrículo derecho y agua de sumersión – sangre de ventrículo izquierdo no fueron significativas (tabla 19). Las correlaciones para el magnesio entre humor vítreo y agua de sumersión no mostraron ser significativas (tabla 20). Calcio y estroncio mostraron también fuertes correlaciones significativas (tabla 21 y 23). Potasio no mostró buena correlación entre el agua de sumersión y las concentraciones en humor vítreo, ventrículo derecho y sangre periférica (tabla 22). Las correlaciones no fueron significativas para boro entre agua de sumersión- humor vítreo y agua de sumersión – sangre periférica (tabla 24).

Hallamos correlaciones estadísticamente significativas de los 7 marcadores analizados entre sus concentraciones en sangre entre las distintas localizaciones y las concentraciones en sangre con las encontradas en humor vítreo. Las concentraciones en agua de sumersión litio, calcio y estroncio correlacionaron significativamente con las halladas en humor vítreo y sangre en las tres localizaciones analizadas (tablas 18, 21 y 23).



		Li HV ng/l	Li VD mg/l	Li SP mg/l	Li VI mg/l	Li Agua µg/l
Li HV ng/l	Coeficiente de correlación	1,000	,672**	,739**	,626**	,503**
	Sig. (bilateral)	.	,000	,000	,000	,000
Li VD mg/l	Coeficiente de correlación	,672**	1,000	,851**	,898**	,770**
	Sig. (bilateral)	,000	.	,000	,000	,000
Li SP mg/l	Coeficiente de correlación	,739**	,851**	1,000	,787**	,630**
	Sig. (bilateral)	,000	,000	.	,000	,000
Li VI mg/l	Coeficiente de correlación	,626**	,898**	,787**	1,000	,631**
	Sig. (bilateral)	,000	,000	,000	.	,000
Li Agua µg/l	Coeficiente de correlación	,503**	,770**	,630**	,631**	1,000
	Sig. (bilateral)	,000	,000	,000	,000	.

Tabla 18. Correlaciones de las concentraciones de litio entre humor vítreo, sangre y agua en los casos de sumersión. **. La correlación es significativa en el nivel 0,01 (bilateral). *. La correlación es significativa en el nivel 0,05 (bilateral). Correlación de Spearman. HV: humor vítreo, VD: sangre ventrículo derecho, VI: sangre ventrículo izquierdo; SP: sangre periférica



		Br HV ng/l	Br VD mg/l	Br SP mg/l	Br VI mg/l	Br Agua mg/l
Br HV ng/l	Coefficiente de correlación	1,000	,237*	,300**	,538**	,450**
	Sig. (bilateral)	.	,022	,003	,000	,001
Br VD mg/l	Coefficiente de correlación	,237*	1,000	,377**	,436**	,007
	Sig. (bilateral)	,022	.	,000	,000	,962
Br SP mg/l	Coefficiente de correlación	,300**	,377**	1,000	,341**	,483**
	Sig. (bilateral)	,003	,000	.	,000	,000
Br VI mg/l	Coefficiente de correlación	,538**	,436**	,341**	1,000	,228
	Sig. (bilateral)	,000	,000	,000	.	,095
Br Agua mg/l	Coefficiente de correlación	,450**	,007	,483**	,228	1,000
	Sig. (bilateral)	,001	,962	,000	,095	.

Tabla 19. Correlaciones de las concentraciones de bromo entre humor vítreo, sangre y agua en los casos de sumersión. **. La correlación es significativa en el nivel 0,01 (bilateral). *. La correlación es significativa en el nivel 0,05 (bilateral). Correlación de Spearman. HV: humor vítreo, VD: sangre ventrículo derecho, VI: sangre ventrículo izquierdo; SP: sangre periférica



		Mg HV ng/l	Mg VD mg/l	Mg SP mg/l	Mg VI mg/l	Mg Agua mg/l
Mg HV ng/l	Coeficiente de correlación	1,000	,519**	,397**	,349**	,135
	Sig. (bilateral)	.	,000	,000	,001	,341
Mg VD mg/l	Coeficiente de correlación	,519**	1,000	,816**	,760**	,676**
	Sig. (bilateral)	,000	.	,000	,000	,000
Mg SP mg/l	Coeficiente de correlación	,397**	,816**	1,000	,721**	,330*
	Sig. (bilateral)	,000	,000	.	,000	,016
Mg VI mg/l	Coeficiente de correlación	,349**	,760**	,721**	1,000	,630**
	Sig. (bilateral)	,001	,000	,000	.	,000
Mg Agua mg/l	Coeficiente de correlación	,135	,676**	,330*	,630**	1,000
	Sig. (bilateral)	,341	,000	,016	,000	.

Tabla 20. Correlaciones de las concentraciones de magnesio entre humor vítreo, sangre y agua en los casos de sumersión. **. La correlación es significativa en el nivel 0,01 (bilateral). *. La correlación es significativa en el nivel 0,05 (bilateral). Correlación de Spearman. HV: humor vítreo, VD: sangre ventrículo derecho, VI: sangre ventrículo izquierdo; SP: sangre periférica



		Ca HV ng/l	Ca VD mg/l	Ca SP mg/l	Ca VI mg/l	Ca Agua mg/l
Ca HV ng/l	Coeficiente de correlación	1,000	,361**	,418**	,399**	,425**
	Sig. (bilateral)	.	,000	,000	,000	,002
Ca VD mg/l	Coeficiente de correlación	,361**	1,000	,543**	,715**	,517**
	Sig. (bilateral)	,000	.	,000	,000	,000
Ca SP mg/l	Coeficiente de correlación	,418**	,543**	1,000	,530**	,494**
	Sig. (bilateral)	,000	,000	.	,000	,000
Ca VI mg/l	Coeficiente de correlación	,399**	,715**	,530**	1,000	,482**
	Sig. (bilateral)	,000	,000	,000	.	,000
Ca Agua mg/l	Coeficiente de correlación	,425**	,517**	,494**	,482**	1,000
	Sig. (bilateral)	,002	,000	,000	,000	.

Tabla 21. Correlaciones de las concentraciones de calcio entre humor vítreo, sangre y agua en los casos de sumersión. **. La correlación es significativa en el nivel 0,01 (bilateral). Correlación de Spearman. HV: humor vítreo, VD: sangre ventrículo derecho, VI: sangre ventrículo izquierdo; SP: sangre periférica



		K HV ng/l	K VD mg/l	K SP mg/l	K VI mg/l	K Agua mg/l
K HV ng/l	Coeficiente de correlación	1,000	,558**	,633**	,555**	,168
	Sig. (bilateral)	.	,000	,000	,000	,219
K VD mg/l	Coeficiente de correlación	,558**	1,000	,702**	,579**	,208
	Sig. (bilateral)	,000	.	,000	,000	,136
K SP mg/l	Coeficiente de correlación	,633**	,702**	1,000	,758**	,148
	Sig. (bilateral)	,000	,000	.	,000	,281
K VI mg/l	Coeficiente de correlación	,555**	,579**	,758**	1,000	,390**
	Sig. (bilateral)	,000	,000	,000	.	,004
K Agua mg/l	Coeficiente de correlación	,168	,208	,148	,390**	1,000
	Sig. (bilateral)	,219	,136	,281	,004	.

Tabla 22. Correlaciones de las concentraciones de potasio entre humor vítreo, sangre y agua en los casos de muerte por sumersión. **. La correlación es significativa en el nivel 0,01 (bilateral). Correlación de Spearman. HV: humor vítreo, VD: sangre ventrículo derecho, VI: sangre ventrículo izquierdo; SP: sangre periférica



		Sr HV ng/l	Sr VD mg/l	Sr SP mg/l	Sr VI mg/l	Sr Agua µg/l
Sr HV ng/l	Coeficiente de correlación	1,000	,456**	,402**	,326**	,363**
	Sig. (bilateral)	.	,000	,000	,002	,009
Sr VD mg/l	Coeficiente de correlación	,456**	1,000	,868**	,831**	,665**
	Sig. (bilateral)	,000	.	,000	,000	,000
Sr SP mg/l	Coeficiente de correlación	,402**	,868**	1,000	,744**	,522**
	Sig. (bilateral)	,000	,000	.	,000	,000
Sr VI mg/l	Coeficiente de correlación	,326**	,831**	,744**	1,000	,613**
	Sig. (bilateral)	,002	,000	,000	.	,000
Sr Agua µg/l	Coeficiente de correlación	,363**	,665**	,522**	,613**	1,000
	Sig. (bilateral)	,009	,000	,000	,000	.

Tabla 23. Correlaciones de las concentraciones de estroncio entre humor vítreo, sangre y agua en los casos de sumersión. **. La correlación es significativa en el nivel 0,01 (bilateral). Correlación de Spearman. HV: humor vítreo, VD: sangre ventrículo derecho, VI: sangre ventrículo izquierdo; SP: sangre periférica



		B HV ng/l	B VD mg/l	B SP mg/l	B VI mg/l	B agua µg/l
B HV ng/l	Coeficiente de correlación	1,000	,653**	,795**	,599**	,156
	Sig. (bilateral)	.	,000	,000	,000	,273
B VD mg/l	Coeficiente de correlación	,653**	1,000	,743**	,722**	,488**
	Sig. (bilateral)	,000	.	,000	,000	,000
B SP mg/l	Coeficiente de correlación	,795**	,743**	1,000	,667**	,113
	Sig. (bilateral)	,000	,000	.	,000	,418
B VI mg/l	Coeficiente de correlación	,599**	,722**	,667**	1,000	,551**
	Sig. (bilateral)	,000	,000	,000	.	,000
B Agua µg/l	Coeficiente de correlación	,156	,488**	,113	,551**	1,000
	Sig. (bilateral)	,273	,000	,418	,000	.

Tabla 24. Correlaciones de las concentraciones de boro entre humor vítreo, sangre y agua en los casos de sumersión. **. La correlación es significativa en el nivel 0,01 (bilateral). Correlación de Spearman. HV: humor vítreo, VD: sangre ventrículo derecho, VI: sangre ventrículo izquierdo; SP: sangre periférica

4.1.6. Análisis de correlación entre intervalo postmortem y elementos trazas en humor vítreo y sangre en muertes por sumersión.

En el análisis de correlaciones que se muestra en la tabla 25 evidencia que no existen correlaciones estadísticamente significativas entre el intervalo postmortem con las concentraciones de elementos traza estudiados tanto en sangre como en humor vítreo en los casos de muerte por sumersión.



		Bromo HV ng/l	Litio HV ng/l	Boro HV ng/l	Estroncio HV ng/l
Intervalo postmortem	Coeficiente de correlación	,055	,219	,277	,017
	Sig. (bilateral)	,592	,065	,062	,872
		Magnesio HV ng/l	Potasio HV ng/l	Calcio HV ng/l	
Intervalo postmortem	Coeficiente de correlación	,145	,163	,076	
	Sig. (bilateral)	,161	,109	,461	
		Bromo VD mg/l	Bromo SP mg/l	Bromo VI mg/l	
Intervalo postmortem	Coeficiente de correlación	,176	,055	,041	
	Sig. (bilateral)	,057	,552	,662	
		Litio VD mg/l	Litio SP mg/l	Litio VI mg/l	
Intervalo postmortem	Coeficiente de correlación	-,164	-,252	-,037	
	Sig. (bilateral)	,079	,078	,693	
		Boro VD mg/l	Boro SP mg/l	Boro VI mg/l	
Intervalo postmortem	Coeficiente de correlación	-,165	-,282	-,099	
	Sig. (bilateral)	,073	,080	,289	
		Estroncio VD mg/l	Estroncio SP mg/l	Estroncio VI mg/l	
Intervalo postmortem	Coeficiente de correlación	,035	,020	,060	
	Sig. (bilateral)	,706	,826	,522	
		Magnesio VD mg/l	Magnesio SP mg/l	Magnesio VI mg/l	
Intervalo postmortem	Coeficiente de correlación	-,058	,013	-,021	
	Sig. (bilateral)	,533	,889	,820	
		Potasio VD mg/l	Potasio SP mg/l	Potasio VI mg/l	
Intervalo postmortem	Coeficiente de correlación	,191	,166	,198	
	Sig. (bilateral)	,054	,069	,065	
		Calcio VD mg/l	Calcio SP mg/l	Calcio VI mg/l	
Intervalo postmortem	Coeficiente de correlación	,022	-,082	,069	
	Sig. (bilateral)	,812	,373	,455	

Tabla 25. Correlaciones entre el intervalo postmortem y las concentraciones de los distintos elementos en sangre y humor vítreo. **. La correlación es significativa en el nivel 0,01 (bilateral). *. La correlación es significativa en el nivel 0,05 (bilateral). Correlación de Spearman. HV: humor vítreo, VD: sangre ventrículo derecho, VI: sangre ventrículo izquierdo; SP: sangre periférica.



4.1.7. Análisis de las diferencias en las concentraciones de los elementos químicos en las muestras de sangre entre los casos de muerte por sumersión y no sumersión mediante las curvas ROC.

Realizamos también el estudio de las curvas de características operativas del receptor (ROC) como la expresión de las concentraciones de los elementos traza en sangre de ventrículo derecho, sangre de ventrículo izquierdo y sangre periférica, prestando especial atención al área que representa el diagnóstico correcto entre dos individuos fallecidos, uno de ellos por sumersión y otro individuo por otras causas de muerte, con selección de los elementos traza con áreas bajo la curva mayores de 0,60. Procedimos también a determinar los puntos de corte en las curvas y su sensibilidad y especificidad (tabla 26, figura 10).

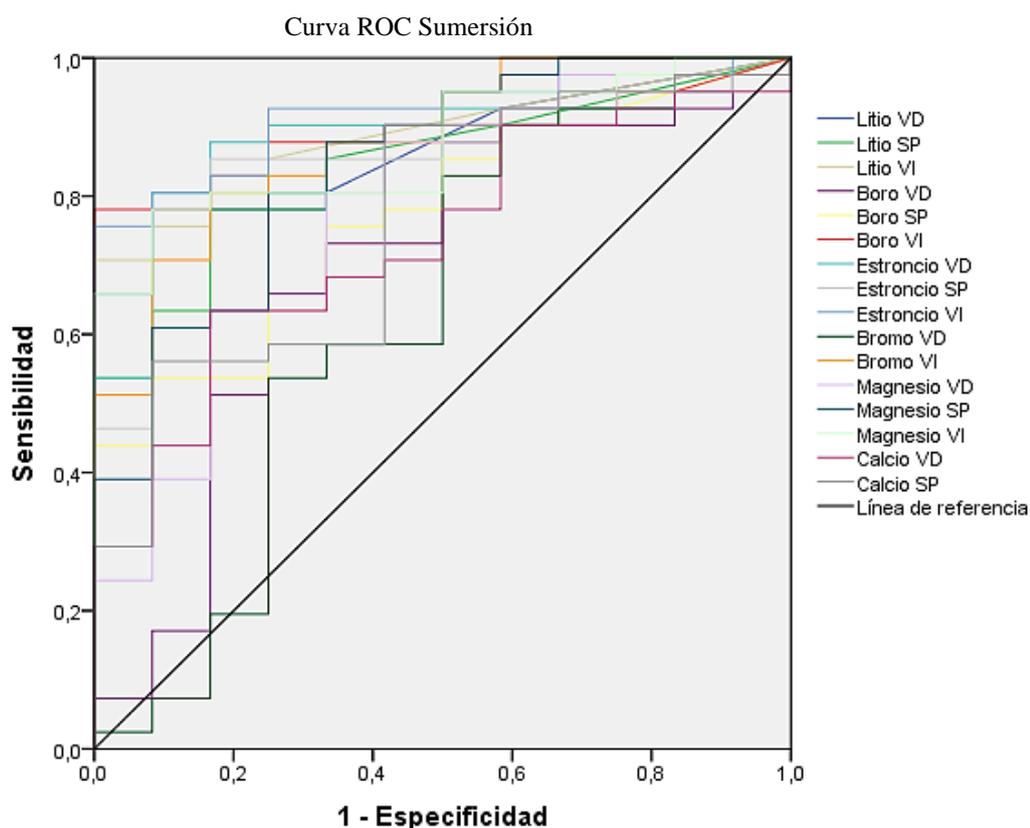


Figura 10. Curva ROC de elementos traza en sangre en casos de sumersión.

La figura 10 muestran las curvas ROC de elementos traza analizados con áreas mayores de 0,60 (en el caso de bromo es de 0,63).

La tabla 26 muestra el valor de las áreas bajo la curva ROC, desviación estándar, probabilidad y límites superior e inferior del área de cada curva en los casos de sumersión. Se muestra también los puntos de corte en las curvas, especificidad y sensibilidad de los puntos de corte.

Los análisis de las curvas ROC pusieron de manifiesto que las concentraciones de litio, boro, estroncio y magnesio en sangre ventricular y periférica y que las concentraciones de bromo y calcio en sangre de ambos ventrículos mostraron mayor capacidad de discriminación en los casos de sumersión.

Variables	Área	Error estándar ^a	<i>p</i> ^b	95% IC		Punto de corte	Sensibilidad	Especificidad
				Límite inferior	Límite superior			
Li VD mg/l	,868	,034	,000	,801	,935	2,385	78%	91,7%
Li SP mg/l	,843	,039	,000	,767	,920	,745	82%	66,7%
Li VI mg/l	,889	,031	,000	,829	,950	1,650	82%	83,3%
B VD mg/l	,698	,065	,003	,570	,826	72,629	85%	50%
B SP mg/l	,771	,048	,000	,677	,866	59,503	82%	50%
B VI mg/l	,892	,030	,000	,833	,952	83,066	87%	75%
Sr VD mg/l	,880	,035	,000	,811	,949	68,868	90%	75%
Sr SP mg/l	,854	,039	,000	,777	,930	87,972	85%	83,3%
Sr VI mg/l	,917	,027	,000	,865	,969	59,764	92%	75%
Br VD mg/l	,632	,075	,050	,486	,778	59,764	92%	75%
Br VI mg/l	,880	,036	,000	,810	,950	9,141	82%	75%
Mg VD mg/l	,776	,055	,000	,669	,884	69,173	80%	66,7%
Mg SP mg/l	,846	,044	,000	,759	,932	55,398	80%	75%
Mg VI mg/l	,874	,034	,000	,808	,940	67,644	80%	83,3%
Ca VD mg/l	,734	,053	,001	,630	,837	105,212	70%	58,3%
Ca VI mg/l	,764	,054	,000	,659	,869	133,858	58%	75%

Tabla 26. Áreas bajo curvas ROC de elementos traza en casos de sumersión, error estándar, probabilidad y límites superior e inferior bajo el área. Puntos de corte establecidos de acuerdo con el uso de la curva de ROC en los casos de sumersión.



4.1.8. Análisis de las diferencias en las concentraciones de los elementos químicos en humor vítreo entre los casos de muerte por sumersión y no sumersión mediante las curvas ROC.

Se procedió al estudio de las curvas de características operativas del receptor (ROC) como la expresión de las concentraciones de los elementos traza en humor vítreo, prestando especial atención al área que representa el diagnóstico correcto entre dos individuos fallecidos, uno de ellos por sumersión y otro individuo por otras causas de muerte, con selección de los elementos traza con áreas bajo la curva mayores de 0,60. Procedimos también a determinar los puntos de corte en las curvas y sensibilidad y especificidad de los puntos de corte (tabla 27, figura 11). En la figura 11 se muestra curva ROC de elementos traza analizados con áreas mayores de 0,60.

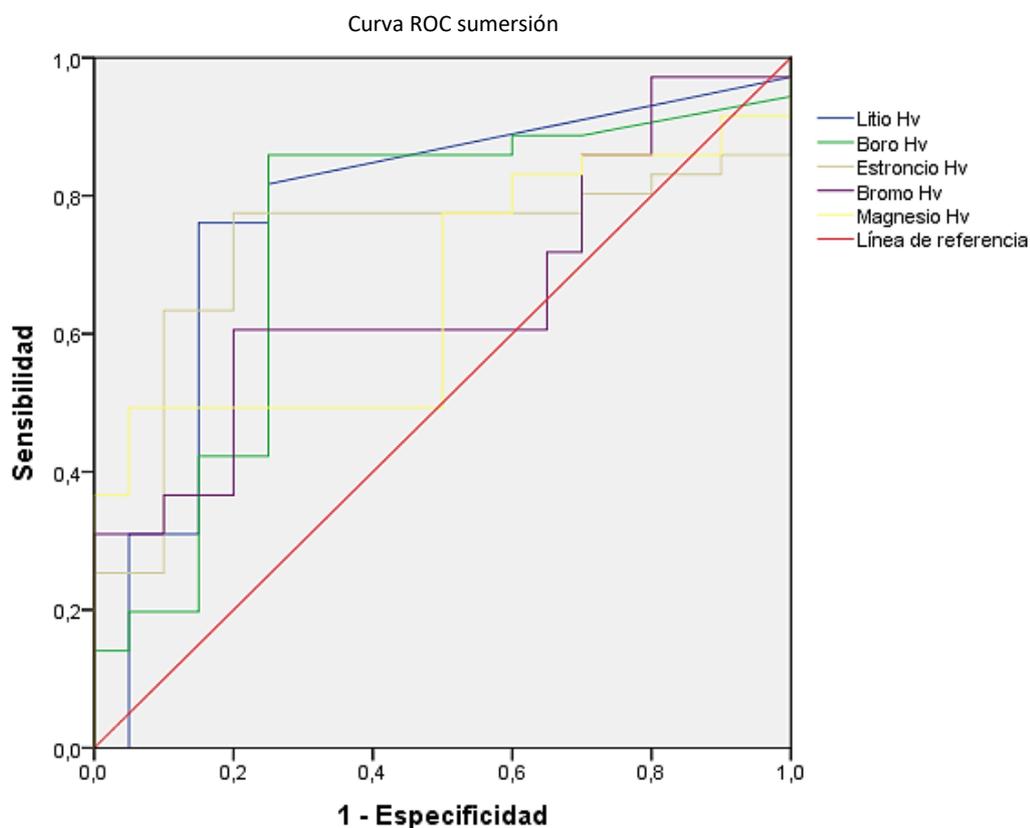


Figura 11. Curva ROC de los elementos traza en humor vítreo en casos de sumersión.

La tabla 27 muestra el valor del área bajo la curva ROC, desviación estándar, probabilidad y los límites superior e inferior del área de la curva en los casos de sumersión. Se muestran también los puntos de corte y especificidad y sensibilidad.

El análisis de las curvas ROC puso de manifiesto que las concentraciones de litio, boro y estroncio en humor vítreo mostraron la mayor capacidad de discriminación en los casos de sumersión, presentando áreas superiores a 0,6 tanto el bromo como el magnesio.

Variables de resultado de prueba	Área	Error estándar ^a	P ^b	95% IC	95% IC	Punto de corte	Sensibilidad	Especificidad
				Límite inferior	Límite superior			
Litio HV ng/l	,778	,064	,000	,653	,903	1,032	76%	85%
Boro HV ng/l	,733	,069	,002	,599	,868	11,611	85%	75%
Estroncio HV ng/l	,725	,057	,002	,614	,837	38,100	77%	70%
Bromo HV ng/l	,656	,062	,033	,534	,778	3,060	60%	70%
Magnesio HV ng/l	,664	,060	,026	,547	,781	22,660	77%	50%

Tabla 27. Área bajo la curva ROC de elementos traza en los casos de sumersión, error estándar, probabilidad y límites superior e inferior del área.

4.1.9. Análisis de regresión logística según edad, sexo, peso de pulmones, intervalo postmortem y de los elementos químicos en sangre y humor vítreo.

Realizamos un análisis de regresión logística para valorar las relaciones entre los distintos parámetros, en el que la variable independiente fue la muerte por sumersión y las variables dependientes la edad, sexo, peso de pulmones, intervalo postmortem y concentraciones de elementos traza en sangre y humor vítreo (tablas 28-32).



En el análisis de regresión logística univariante que se muestra en la tabla 28, no son factores asociados a la muerte por sumersión la edad, el sexo, peso de pulmones, así como en el intervalo postmortem.

							95% C.I.		
		B	Error estándar	Wald	gl	<i>p</i>	OD	Inferior	Superior
Edad		-,023	,012	3,887	1	,049	,978	,956	1,000
Sexo	Hombre	,577	,538	1,151	1	,283	1,781	,620	5,115
	Mujer	Ref.	Ref.	Ref.	Ref.	Ref.	Ref.	Ref.	Ref.
Peso de pulmón derecho (gr)		,002	,001	2,198	1	,138	1,002	,999	1,004
Peso de pulmón izquierdo (gr)		,002	,001	2,958	1	,085	1,002	1,000	1,004
Intervalo postmortem (horas)		,027	,023	1,329	1	,249	1,027	,981	1,076

Tabla 28. Análisis de regresión logística univariante de edad, sexo, peso de pulmones e intervalo postmortem.

En el análisis de regresión logística univariante las concentraciones en sangre de boro en sangre periférica y en sangre de ventrículo izquierdo, estroncio y magnesio en las tres localizaciones, bromo en sangre de ventrículo izquierdo, y calcio en sangre de ventrículo izquierdo y derecho, fueron factores asociados significativamente a la muerte por sumersión (tabla 29).



							95% C.I.	
	B	Error estándar	Wald	gl	p	OD	Inferior	Superior
Li VD mg/l	-,003	,008	,102	1	,750	,997	,981	1,014
Li SP mg /l	-,009	,009	1,013	1	,314	,991	,974	1,008
Li VI mg/l	,003	,009	,141	1	,707	1,003	,986	1,021
B VD mg/l	,005	,002	6,088	1	,014	1,005	1,001	1,009
B SP mg/l	,011	,003	11,309	1	,001	1,011	1,004	1,017
B VI mg/l	,013	,003	15,601	1	,000	1,013	1,006	1,019
Sr VD mg/l	,019	,006	12,002	1	,001	1,020	1,008	1,031
Sr SP mg/l	,025	,007	13,866	1	,000	1,026	1,012	1,039
Sr VI mg/l	,027	,008	11,747	1	,001	1,028	1,012	1,044
Br VD mg/l	,080	,038	4,479	1	,034	1,084	1,006	1,167
Br SP mg/l	,045	,029	2,460	1	,117	1,046	,989	1,108
Br VI mg/l	,387	,090	18,632	1	,000	1,472	1,235	1,755
Mg VD mg/l	,035	,010	12,061	1	,001	1,036	1,015	1,056
Mg SP mg/l	,054	,014	15,303	1	,000	1,056	1,027	1,085
Mg VI mg/l	,044	,011	15,908	1	,000	1,045	1,023	1,068
Ca VD mg/l	,029	,009	11,215	1	,001	1,030	1,012	1,048
Ca SP mg/l	,009	,007	1,820	1	,177	1,010	,996	1,024
Ca VI mg/l	,029	,008	13,892	1	,000	1,030	1,014	1,046

Tabla 29. Análisis de regresión logística univariante de los elementos químicos litio, boro, estroncio, bromo, magnesio y calcio en las muestras de sangre periférica, ventrículo derecho y ventrículo izquierdo.

En el análisis de regresión logística multivariante las concentraciones de boro en sangre periférica y estroncio y bromo en sangre de ventrículo izquierdo permanecen como factores asociados significativamente a la muerte por sumersión (tabla 30).



	B	Error estándar	Wald	gl	p	OD	95% C.I.	
							Inferior	Superior
B SP mg/l	,012	,005	5,790	1	,016	1,012	1,002	1,021
Sr VI mg/l	,033	,012	7,726	1	,005	1,033	1,010	1,057
Br VI mg/l	,379	,132	8,227	1	,004	1,461	1,127	1,892

Tabla 30. Análisis de regresión logística univariante de boro en sangre periférica y estroncio y bromo en sangre de ventrículo izquierdo.

En el análisis de regresión logística univariante las concentraciones en humor vítreo de boro, estroncio y bromo fueron factores asociados significativamente a la muerte por sumersión (tabla 31).

	B	Error estándar	Wald	gl	p	OD	95% C.I.	
							Inferior	Superior
Li HV ng/l	-,003	,014	,047	1	,828	,997	,970	1,025
B HV ng/l	,010	,006	3,438	1	,044	1,010	1,002	1,022
Sr HV ng/l	,043	,016	6,737	1	,009	1,044	1,010	1,078
Br HV ng/l	,691	,381	3,291	1	,040	1,996	1,146	4,212
Mg HV ng/l	,060	,052	1,359	1	,244	1,062	,960	1,175

Tabla 31. Análisis de regresión logística univariante de los elementos químicos litio, boro, estroncio, bromo y magnesio en humor vítreo.

En el análisis de regresión logística multivariante las concentraciones en humor vítreo de boro y bromo permanecen como factores asociados significativamente a la muerte por sumersión (tabla 32).



	B	Error estándar	Wald	gl	p	OD	95% C.I.	
							Inferior	Superior
B HV ng/l	,014	,006	5,729	1	,017	1,015	1,003	1,027
Br HV ng/l	1,207	,543	4,933	1	,026	3,343	1,152	9,696

Tabla 32. Análisis de regresión logística multivariante de boro y bromo en humor vítreo.

4.1.10. Análisis discriminante en elementos traza en muestras de sangre y humor vítreo.

Realizamos un análisis discriminante en las muestras de sangre con los elementos químicos que mostraron las curvas que mejor discriminaban entre casos de sumersión y otras causas de muerte. Como variable dependiente se utilizó el grupo diagnóstico, diferenciándose entre sumersión y no sumersión, y como variable independiente se establecieron las concentraciones de los elementos químicos. En la tabla 33 se muestran los porcentajes correctos de clasificación, tanto de manera individual como conjunta.

El análisis discriminante mostró que la determinación de boro en sangre periférica permitió una correcta identificación del 85,6% de los casos de sumersión, así como las concentraciones de bromo en sangre de ventrículo izquierdo. En el caso del estroncio alcanzó una clasificación correcta del 94,6%, con el análisis de sus concentraciones en ventrículo izquierdo. A su vez, la clasificación conjunta de los tres elementos, boro en sangre periférica y bromo y estroncio en ventrículo izquierdo, permitió alcanzar una clasificación correcta de los casos de sumersión del 96,4%.

	Sumersión (% clasificación correcta)	No Sumersión (% clasificación correcta)	Total (% clasificación correcta)	Punto de corte
B SP	85,6	46,2	78,1	59,503
Br VI	85,6	69,2	82,5	9,141
Sr VI	94,6	76,9	91,2	59,764
B SP Br VI Sr VI	96,4	84,6	92,7	59,503 9,141 59,764

Tabla 33. Análisis discriminante de boro, bromo y estroncio.



También realizamos un análisis discriminante en las muestras de humor vítreo utilizando como variable dependiente se utilizó el grupo diagnóstico, diferenciándose entre sumersión y no sumersión, y como variables independientes los factores asociados significativamente a la muerte por sumersión en el análisis de regresión logística multivariante. En la tabla 34 se muestran los porcentajes correctos de clasificación, tanto de manera individual como conjunta.

El análisis discriminante mostró en humor vítreo los mejores resultados para las concentraciones de boro y bromo. La determinación de boro en humor vítreo permitió una correcta identificación del 91,0% de los casos de sumersión, mientras que en el caso del bromo permitió una clasificación correcta del 74,8% de los casos. A su vez, la clasificación conjunta de los dos elementos, boro y bromo, permitió alcanzar una clasificación correcta de los casos de sumersión del 91,0%.

	Sumersión (% clasificación correcta)	No Sumersión (% clasificación correcta)	Total (% clasificación correcta)	Punto de corte
B HV	91,0	57,7	84,7	11,611
Br HV	74,8	57,7	75,1	3,06
B HV Br HV	91,0	57,7	84,7	11,611 3,06

Tabla 34. Análisis discriminante en humor vítreo de boro y bromo.

4.1.11. Análisis de componentes principales en los tres grupos diagnósticos y todos los elementos químicos analizados en las muestras de sangre.

Realizamos un análisis de componentes principales (PCA) para clasificar las muestras en función de los 7 elementos trazas (variables) que se analizaron realizando combinaciones entre sí para hacer distintos grupos de causas de muerte, sumersión (n = 111) y otras causas (n = 26), para lograr un "alto nivel de evidencia".

Un análisis preliminar de los datos mediante PCA reveló una amplia separación entre el grupo de sumersión y otras causas de la muerte. Las variables (elementos traza) que se dibujan están representadas por sus proyecciones en el espacio de componentes



utilizando su contribución como coordenadas. Cuanto más cerca esté un elemento traza (variable) del círculo de correlaciones, mejor podremos reconstruir esta variable a partir de los dos primeros componentes; cuanto más cerca del centro de la gráfica está una variable, menos importante es para los dos primeros componentes (294). Este mapa factorial presenta las dos primeras dimensiones del PCA, siendo el Mg, Sr, Li, B, y K los elementos que más contribuyen a la varianza (figura 12). El primer eje principal explicó el 37,1% de la varianza, el segundo eje principal explicó el 14,4% de la varianza (por lo tanto, el 51,5% en total) y todas las demás dimensiones explicaron menos de la variación (tabla 35).

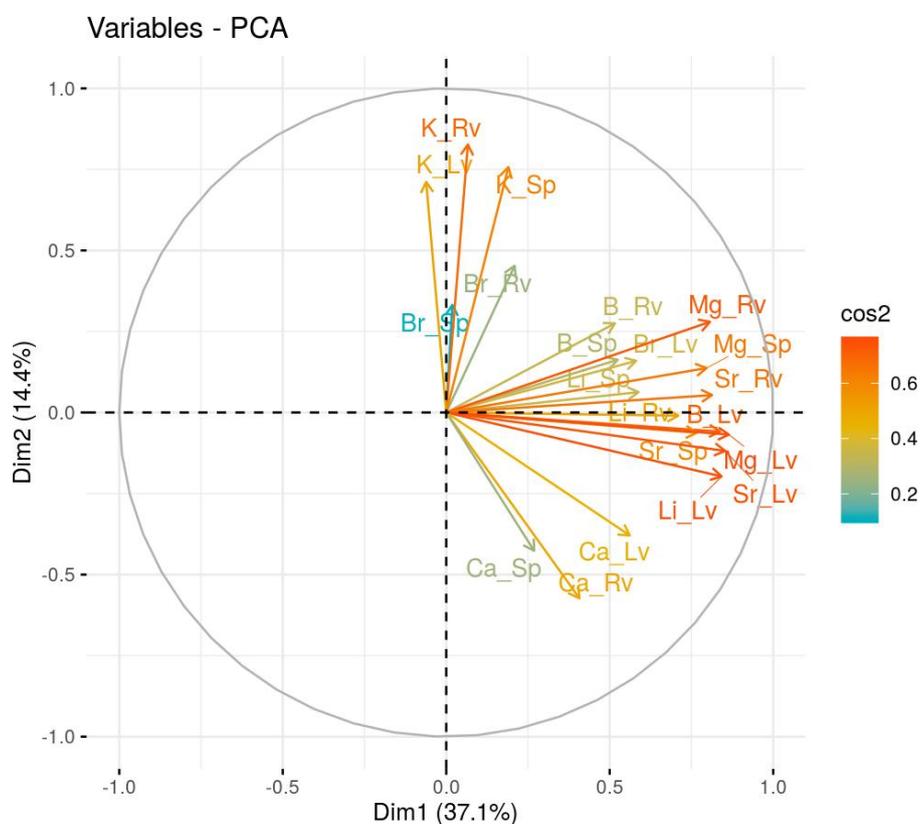


Figura 12. Relación entre variables en muestras de sangre.

	Valor propio	% de varianza	% acumulado de varianza
Dim. 1	7.79	37.09	37.09
Dim. 2	3.03	14.42	51.52
Dim. 3	1.77	8.44	59.96



Dim. 4	1.63	7.75	67.71
Dim. 5	1.40	6.67	74.38
Dim. 6	1.23	5.86	80.24
Dim. 7	0.91	4.33	84.57
Dim. 8	0.69	3.31	87.87
Dim. 9	0.60	2.84	90.72
Dim. 10	0.53	2.54	93.26

Tabla 35. Proporción de variables retenidas por las diferentes dimensiones en muestras de sangre.

Esto sugiere que una solución de PCA bidimensional da una buena aproximación de la causa de muerte a partir del Mg, Sr, Li, B, y K. En la primera dimensión los elementos que más contribuyen a la discriminación entre causas de muerte son (n = 4): Mg, Sr, Li, B (figura 13). Para la segunda dimensión son (n = 3): Br, Ca y K (figura 14). En la tercera dimensión son (n=2): Sr y Ca (figura 15).



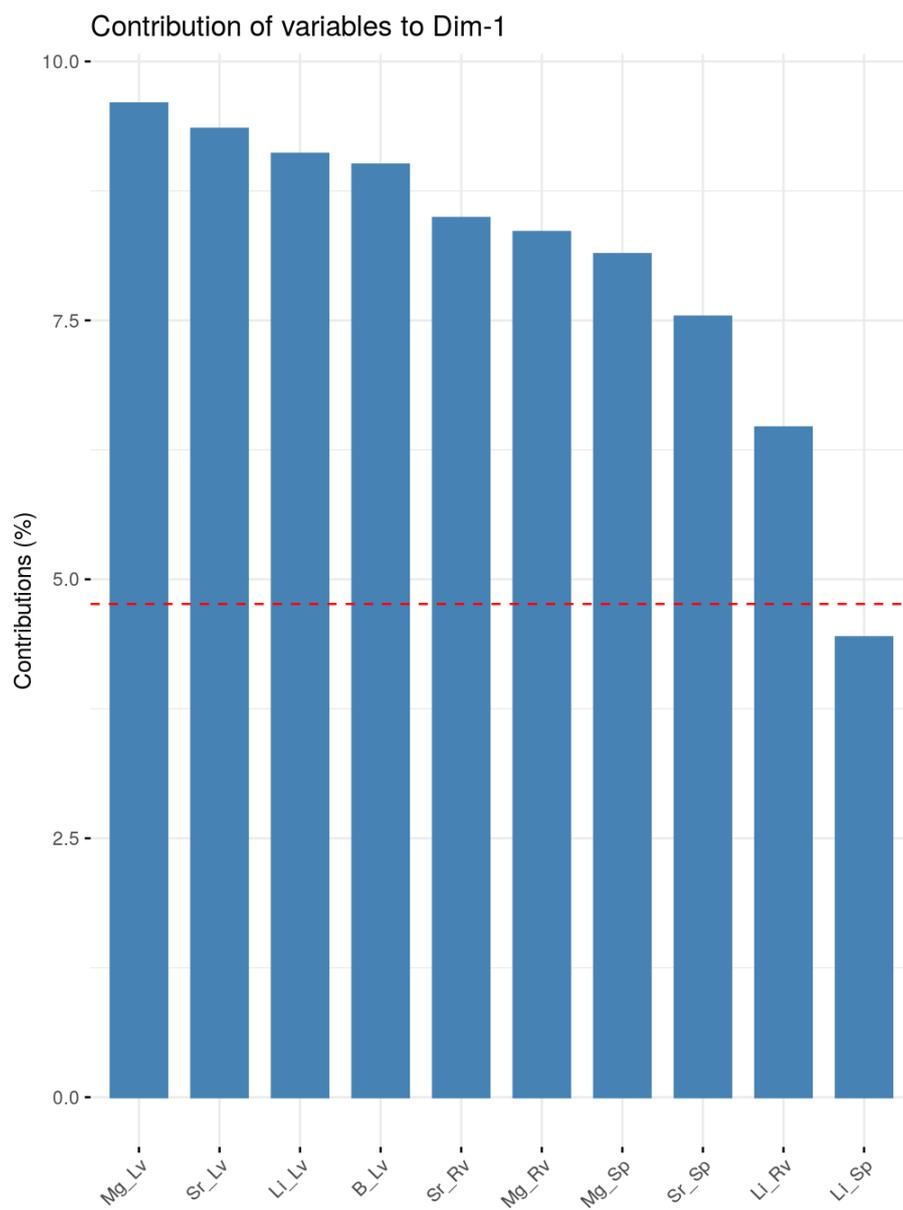


Figura 13. Discriminación de elementos en la primera dimensión en muestras de sangre.

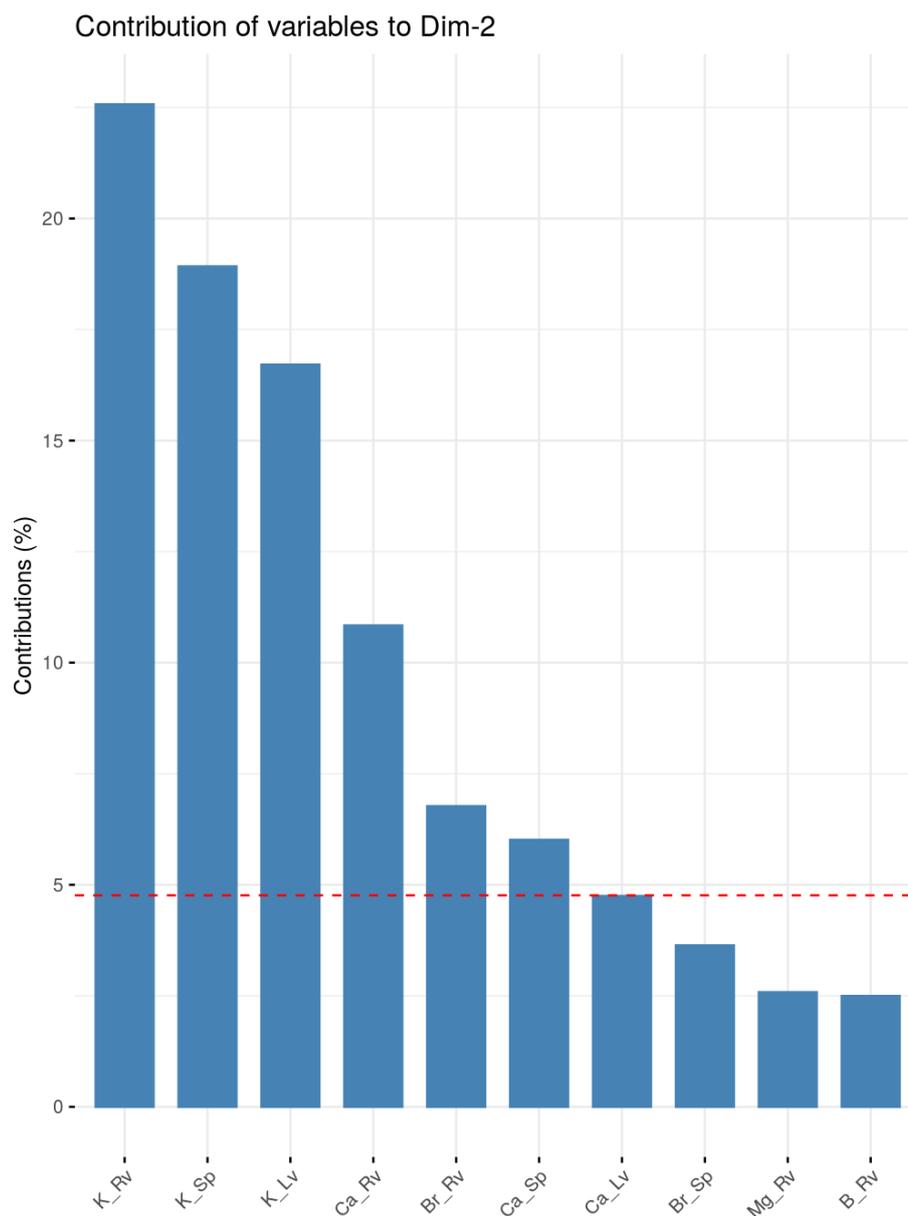


Figura 14. Discriminación de elementos traza en segunda dimensión en muestras de sangre.

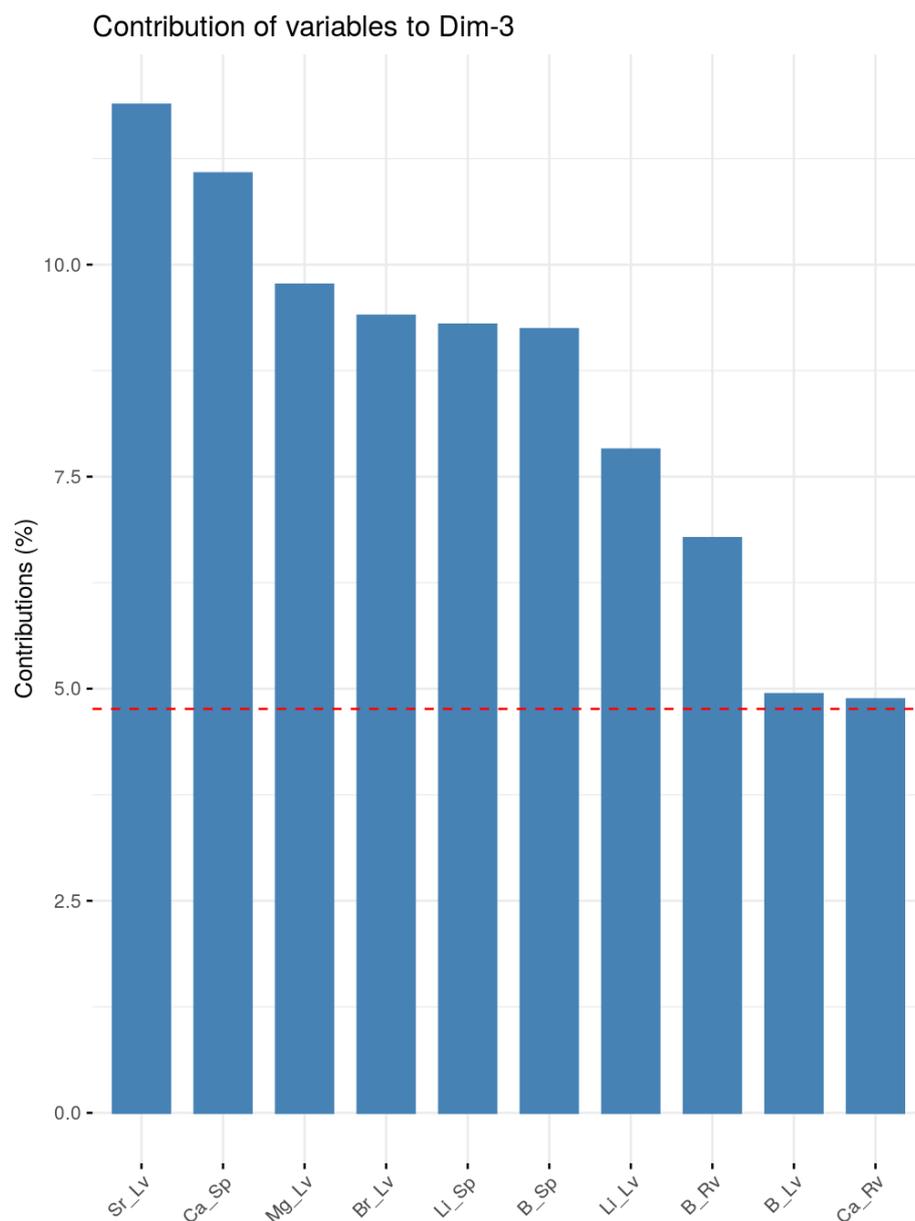


Figura 15. Discriminación de elementos traza en tercera dimensión en muestras de sangre.

En total hay 5 elementos traza que contribuyen a discriminar entre la sumersión y otras causas de muerte. La interpretación se observa más fácilmente desarrollando un biplot (figura 16). Esta representación muestra que la muerte por sumersión está caracterizada por valores en la dim 1, mientras que otras causas de muerte están más distribuidas a lo largo de la dim 2. Todas las muestras muestran una clara diferenciación por estos elementos traza, y muestran un poder de discriminación del 100% utilizando análisis multivariante.



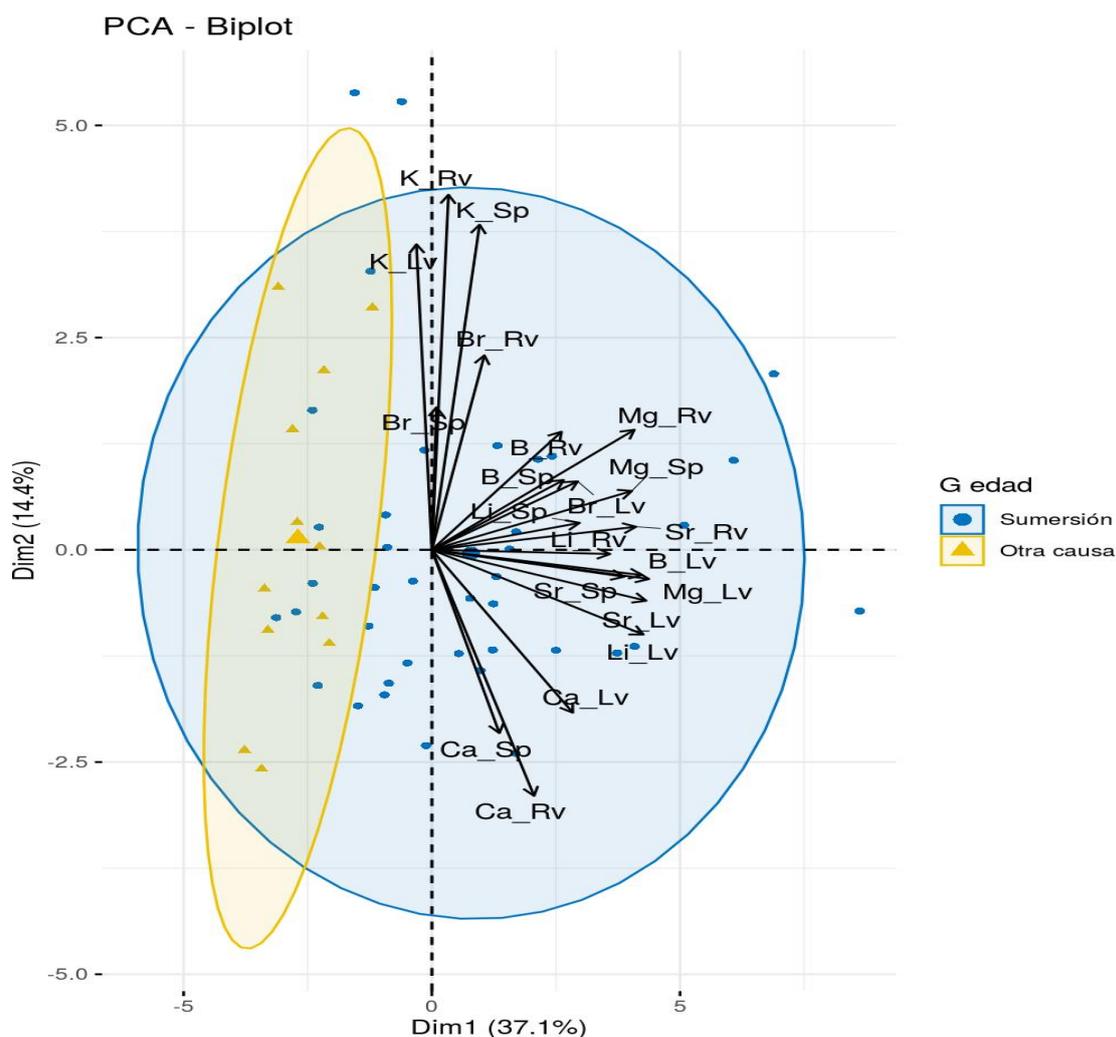


Figura 16. Discriminación entre sumersión (Dim 1) y otras causas de muerte (Dim 2) en muestras de sangre.

4.1.12. Análisis de componentes principales en los tres grupos diagnósticos y todos los elementos químicos analizados en las muestras de humor vítreo.

Del mismo modo, realizamos un análisis de componentes principales (PCA) en las muestras de humor vítreo para clasificar las muestras en función de los 7 elementos trazas (variables) que se analizaron realizando combinaciones entre sí para hacer distintos grupos de causas de muerte, sumersión (n = 111) y otras causas (n = 26), para lograr un "alto nivel de evidencia".

Un análisis preliminar de los datos mediante PCA reveló una amplia separación entre el grupo de sumersión y el otro grupo de causa de la muerte. Este mapa factorial presenta las dos primeras dimensiones del PCA, siendo el Mg, Sr, Li, B, Ca y K los elementos que más contribuyen a la varianza. (figura 17). El primer eje principal explicó el 37,4% de la varianza, el segundo eje principal explicó el 15,7% de la varianza (por lo tanto, el 53,1% en total) y todas las demás dimensiones explicaron menos de la variación (tabla 36).

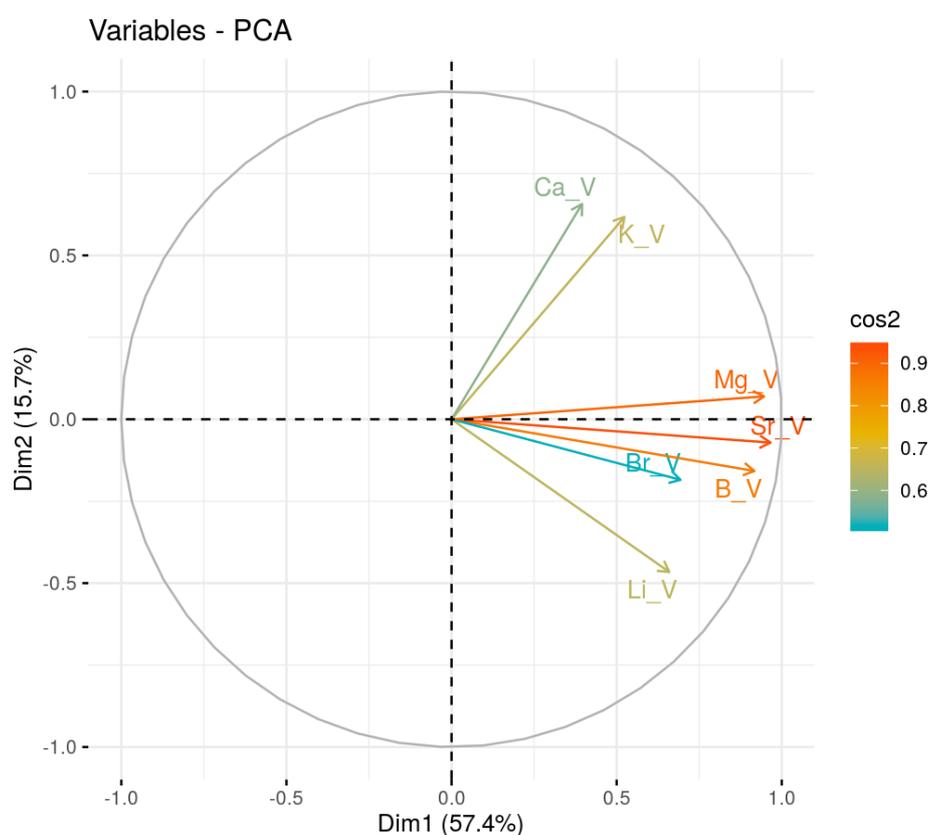


Figura 17. Relación entre variables en muestras de humor vítreo.

	Valor propio	% de varianza	% acumulado de varianza
Dim. 1	4.02	57.36	57.36
Dim. 2	1.10	15.70	73.06
Dim. 3	0.74	10.54	83.61
Dim. 4	0.64	9.14	92.75
Dim. 5	0.34	4.83	97.58

Tabla 36. Proporción de variables retenidas por las diferentes dimensiones en muestras de humor vítreo.



Esto sugiere que una solución de PCA bidimensional da una buena aproximación de la causa de muerte a partir del Mg, Sr, Li, B, Ca y K. En la primera dimensión los elementos que más contribuyen a la discriminación entre causas de muerte son (n = 4): Sr, Mg y B (figura 18). Para la segunda dimensión son (n = 3): Ca, K y Li (figura 19). Para la tercera dimensión son (n=2): Ca y K (figura 20).

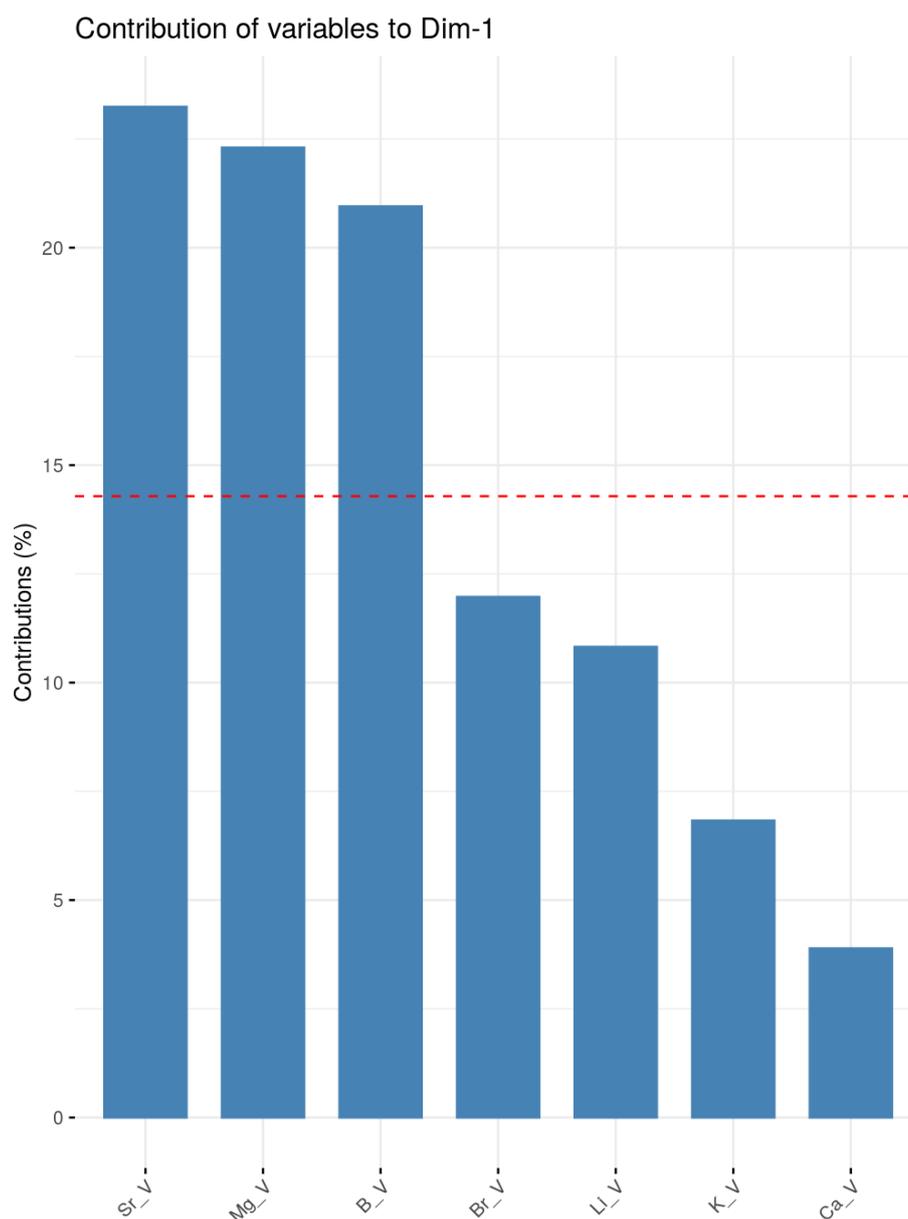


Figura 18. Discriminación de elementos en la primera dimensión en muestras de humor vítreo.



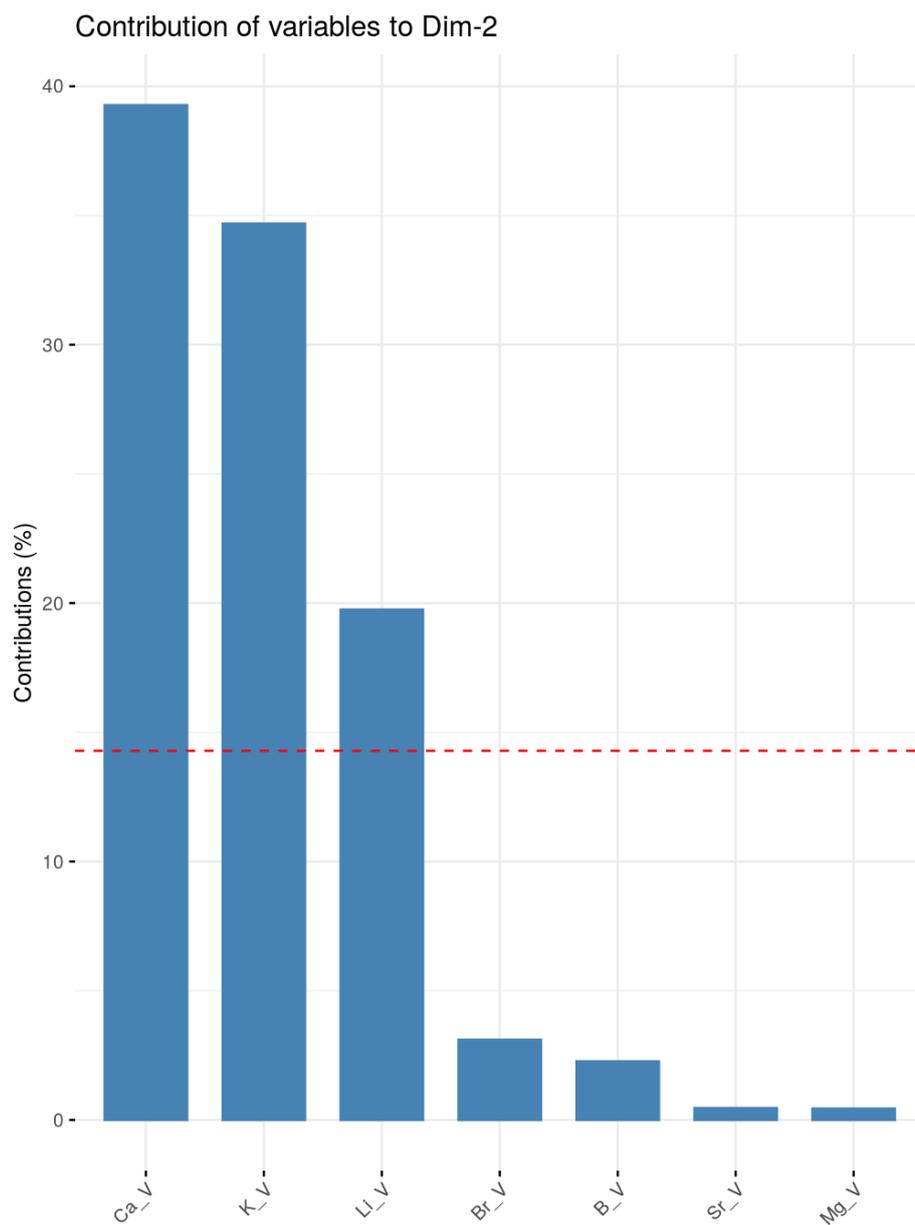


Figura 19. Discriminación de elementos traza en segunda dimensión en muestras de humor vítreo.

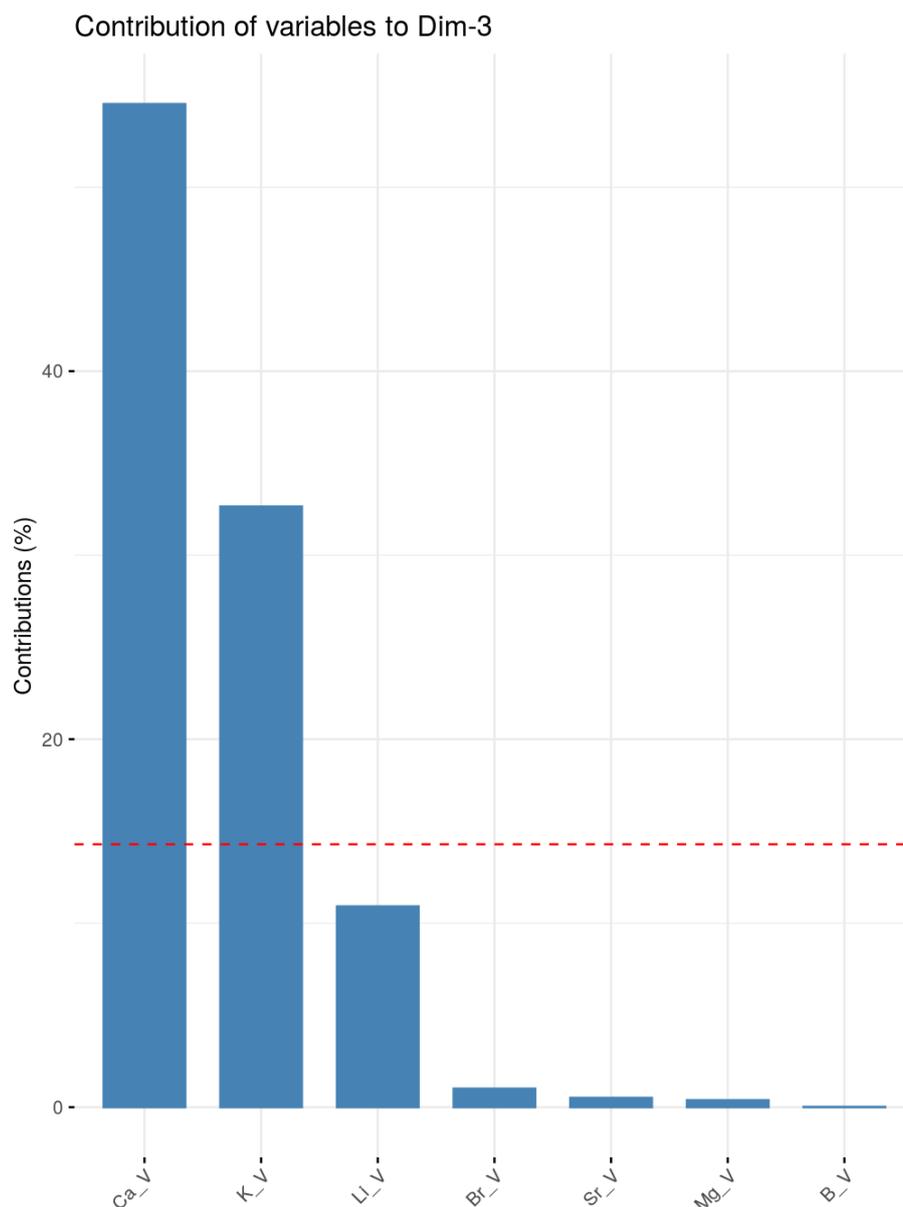


Figura 20. Discriminación de elementos traza en tercera dimensión en muestras de humor vítreo.

En total hay 6 elementos traza que contribuyen a discriminar entre la sumersión y otras causas de muerte. La interpretación se observa más fácilmente desarrollando un biplot (figura 21). Esta representación muestra que la muerte por sumersión está caracterizada por valores en la dim 1, mientras que otras causas de muerte están más distribuidas tanto en la dim 1 como en la dim 2. Todas las muestras muestran una clara diferenciación por estos elementos traza, y muestran un poder de discriminación del 100% utilizando análisis multivariante.

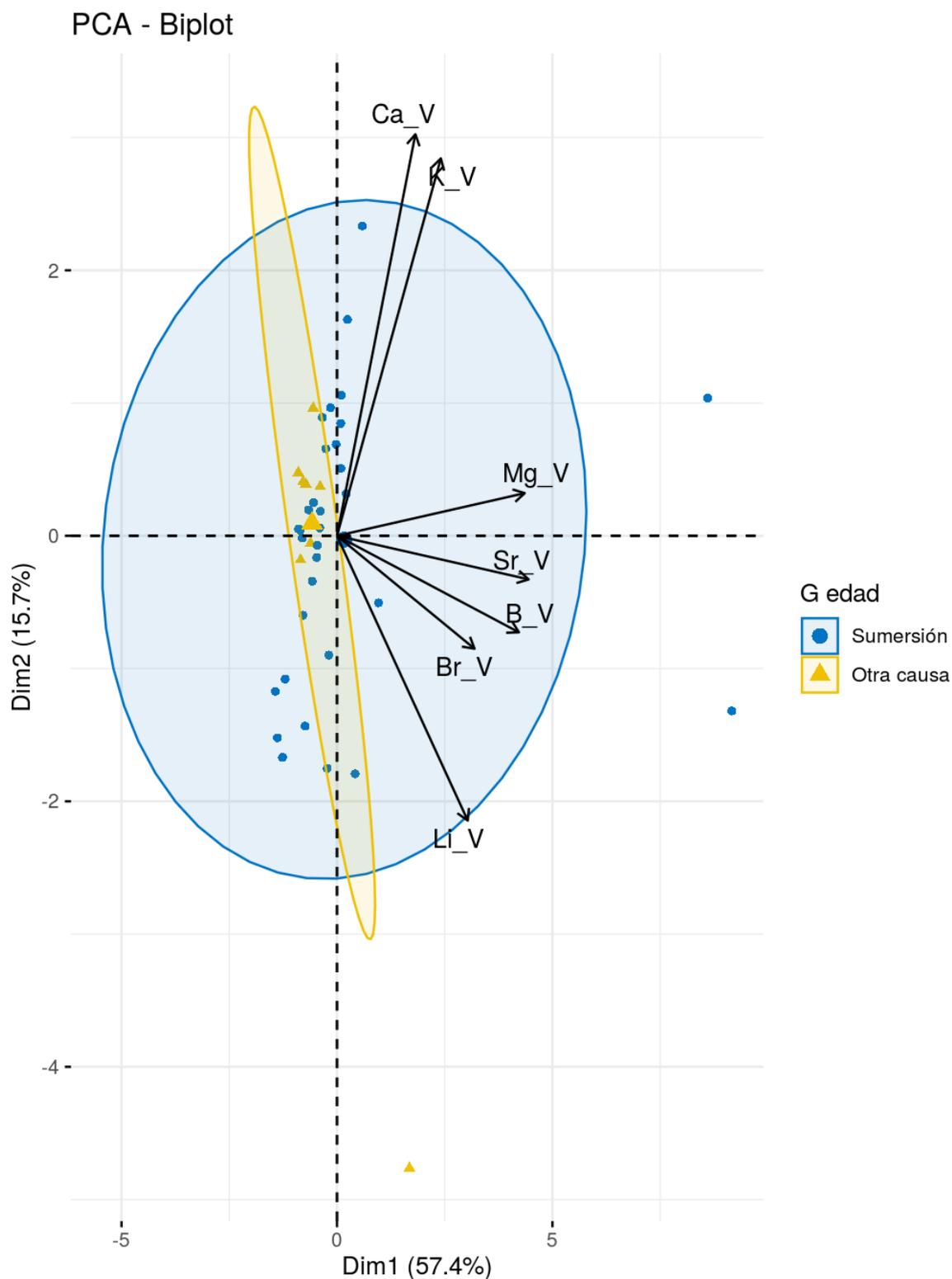


Figura 21. Discriminación entre sumersión (Dim 1) y otras causas de muerte (Dim 2) en muestras de humor vítreo.

4.2. APROXIMACIÓN PROTEÓMICA

4.2.1. Identificación y cuantificación de proteínas en las muestras de plasma en casos de muerte por sumersión y otras causas de muerte.

Diseñamos un experimento proteómico piloto con muestras de plasma de cuatro casos forenses (50% hombres). Se identificaron un total de 343 proteínas a partir de las muestras de plasma empobrecidas en proteínas. Todas las muestras se analizaron según la causa de la muerte: se detectaron 2097 espectros con un umbral del 88%, para una tasa de FDR de 0,43%; se identificaron 51 proteínas con un umbral del 99,0%, con un mínimo 1 péptido, para una tasa de FDR de 6.2%.

Después de la cuantificación de la muestra de estas 51 proteínas, 28 eran proteínas comunes, 16 proteínas sólo aparecieron en el grupo control y 7 en muertes por sumersión (figura 22).

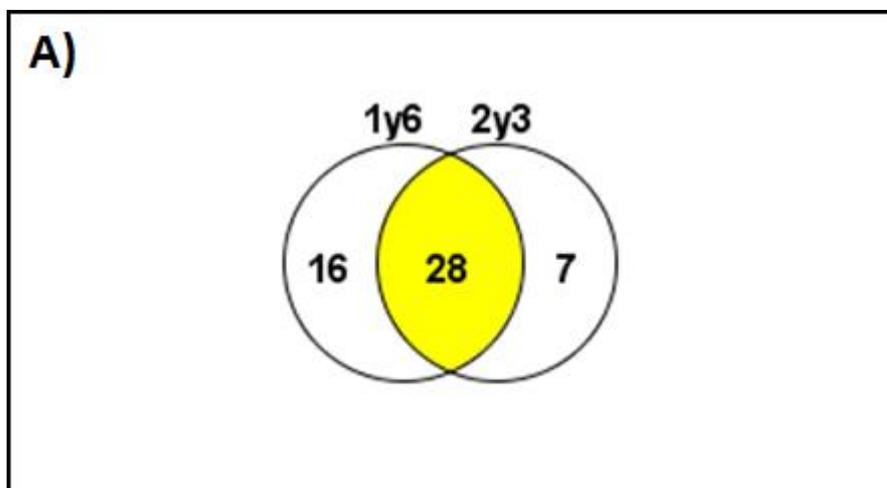


Figura 22. Diagrama de Venn de proteínas agrupadas por causa de muerte (obtenido de Scaffold viewer).

Todas las proteínas identificadas fueron estudiadas atendiendo a su función biológica registrada, patrón de expresión relativa y vías fisiopatológicas publicadas. La figura 23 muestra el número de proteínas agrupadas por sus funciones biológicas.

Apolipoproteína A1 y α -1 antitripsina resultaron expresarse de manera diferente, siendo menos abundante en sumersión, mientras que la apolipoproteína A-1 parecía expresarse más en sumersión (figuras 24 y 25).

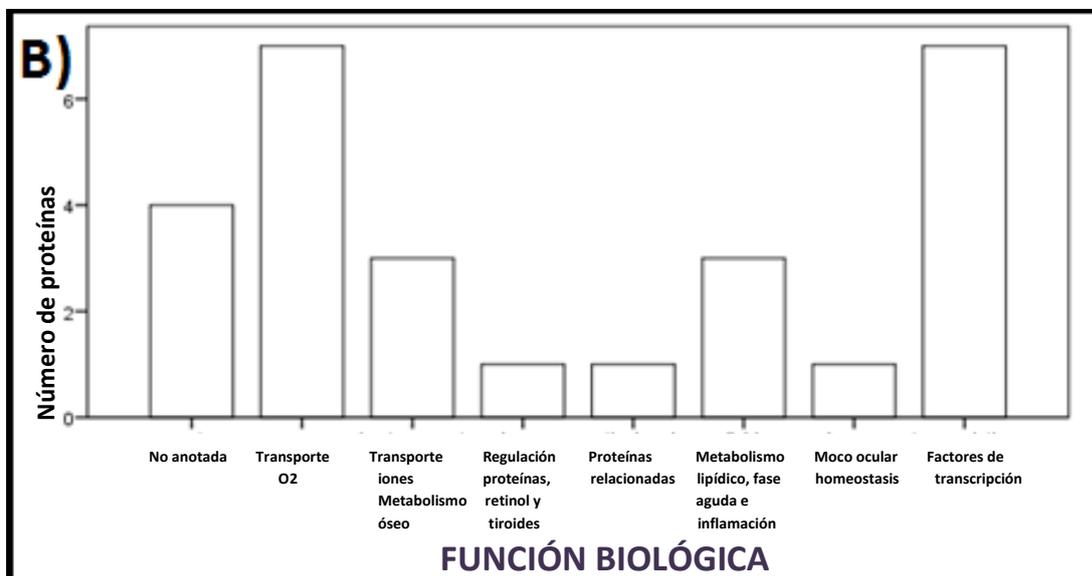


Figura 23. Número de proteínas expresadas tanto en sumersión como en grupo control, agrupadas por su función biológica.

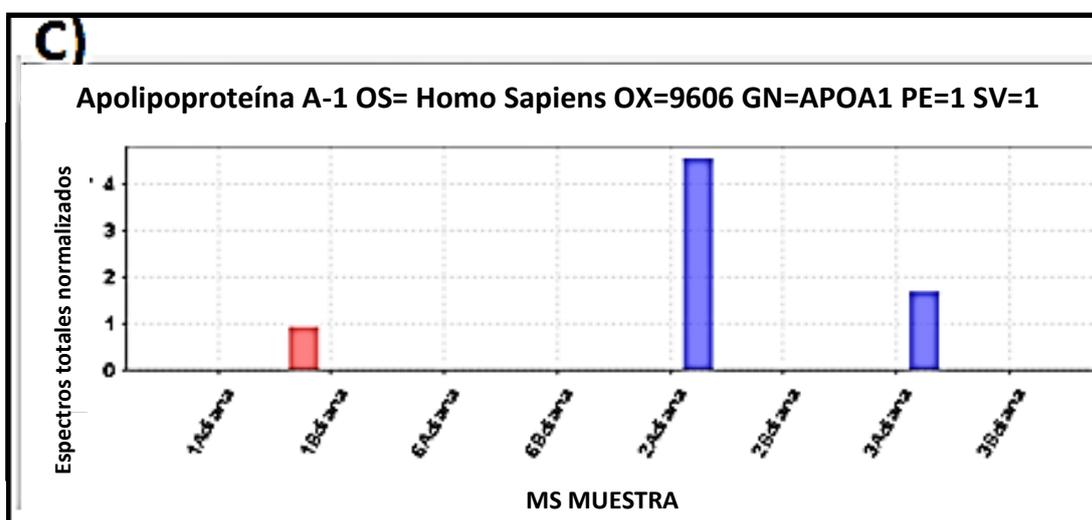


Figura 24. Visión cuantitativa de la normalización de la diferencial expresión de Apolipoproteína A-1 (obtenido de Scaffold viewer).

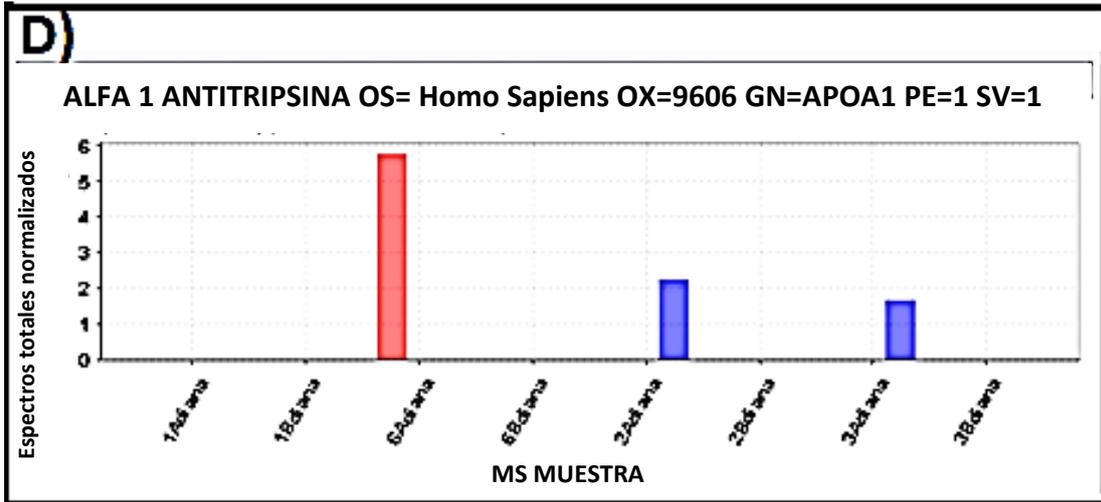


Figura 25. Visión cuantitativa de la normalización de la diferencial expresión de α -1 antitripsina (obtenido de Scaffold viewer).

Al realizar subanálisis de las muestras de casos y controles, analizamos un caso de sumersión vs. una muerte por ahorcamiento, 905 espectros se identificaron al umbral de 99,0%, para una tasa de FDR del 0,12%. Se identificaron 19 proteínas al 99,0%, umbral con un mínimo de 1 péptido para una tasa de FDR del 5,6%.

Después de la cuantificación de la muestra, observamos nueve proteínas compartidas, ocho en la muerte por ahorcadura y solo dos en la muestra de sumersión (figura 26). Nuevamente identificamos apolipoproteína-A1 y α -1 antitripsina expresadas diferencialmente en sumersión y muerte por ahorcadura (figuras 27 y 28) pero con niveles más bajos de α -1 antitripsina en ahorcadura.

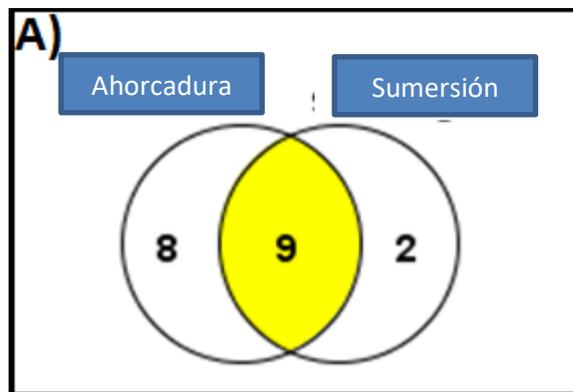


Figura 26. Diagrama de Venn de proteínas en los casos vs. subanálisis de control de varones (1 varón fallecido por ahorcadura y 2 fallecidos por sumersión).

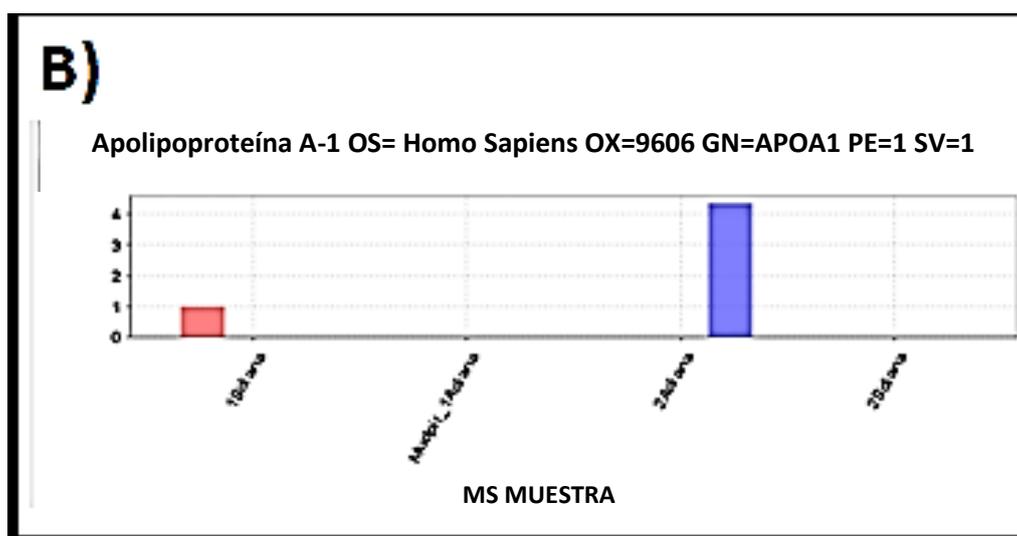


Figura 27. Visión cuantitativa de la normalización de la apolipoproteína A1 expresada diferencialmente en el subanálisis de casos frente a controles en varones.

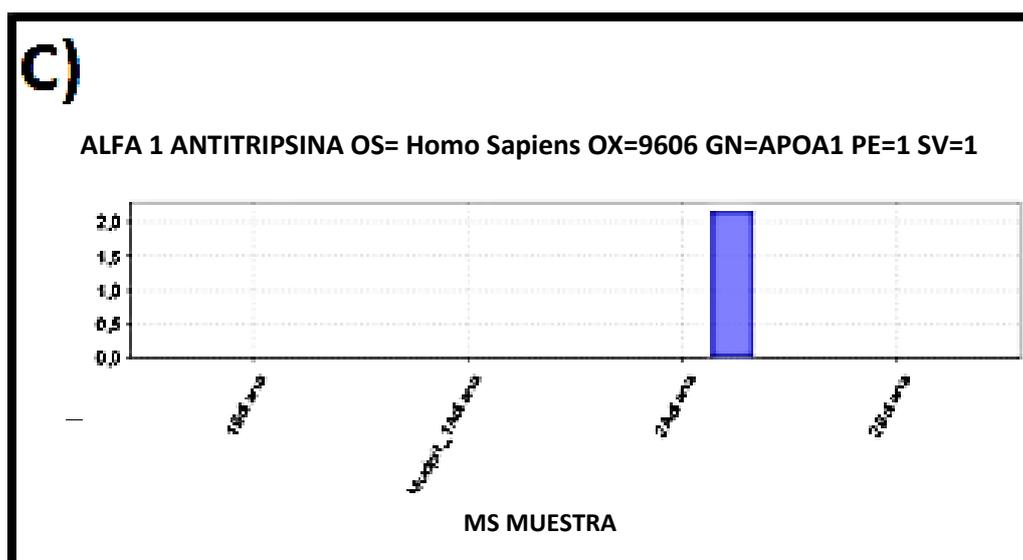


Figura 28. Visión cuantitativa de la normalización de α -1 antitripsina expresada diferencialmente en el subanálisis de casos frente a controles en varones.

Por otro lado, al comparar la sumersión vs. politraumatismo, 1325 espectros se detectaron en el umbral de 83,0%, con una tasa de FDR de 0,80%; se identificaron 37 proteínas en el umbral del 99,0% con un mínimo de 1 péptido y una tasa de FDR de 5,7%. De estas 37 proteínas, se observaron 18 compartidas. Solo se identificaron 4 proteínas en el caso de sumersión y 14 en el caso de muerte por politraumatismo (figura 29).

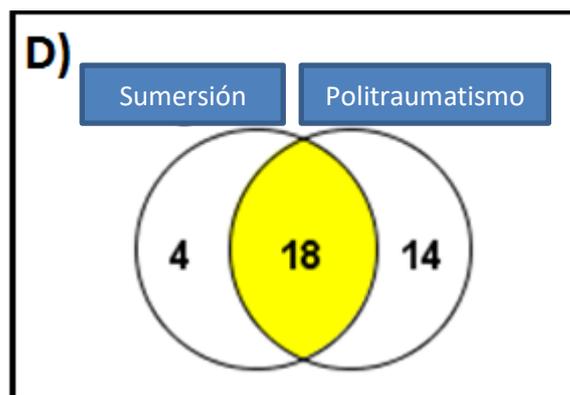


Figura 29. Diagrama de Venn de proteínas en los casos vs. subanálisis de control de mujeres (6 mujeres fallecidas por accidente de tráfico y 3 mujeres fallecidas por sumersión).

Además, apolipoproteína A1 resultó estar más expresada en la muerte por sumersión (figura 30). En comparación, la α -1 antitripsina apareció más expresada en las muertes por politraumatismos (figura 31).

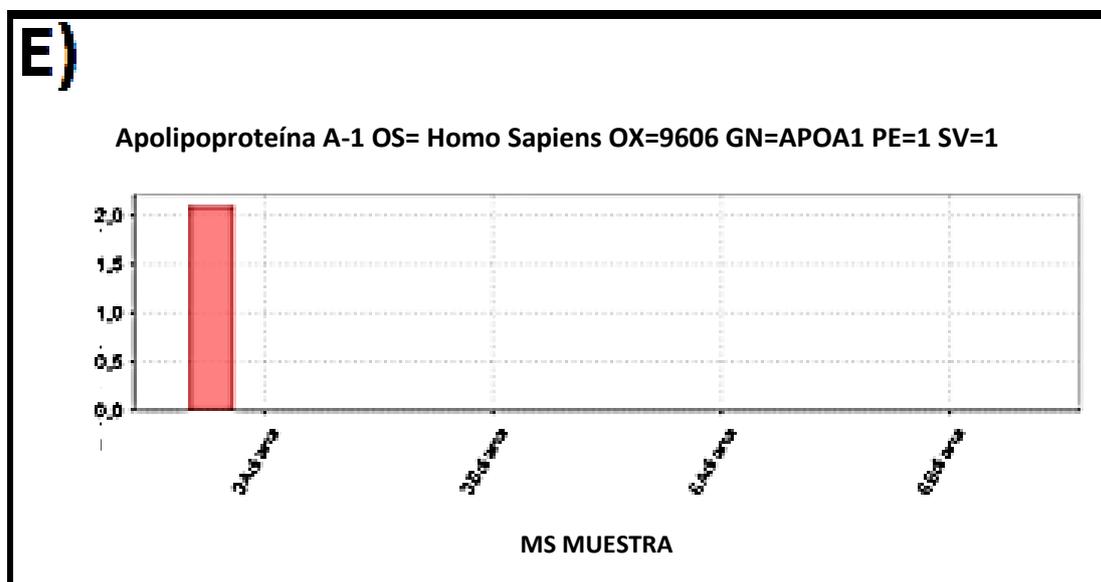


Figura 30. Visión cuantitativa de la normalización de la apolipoproteína A1 expresada diferencialmente en el subanálisis de casos frente a controles en mujeres.

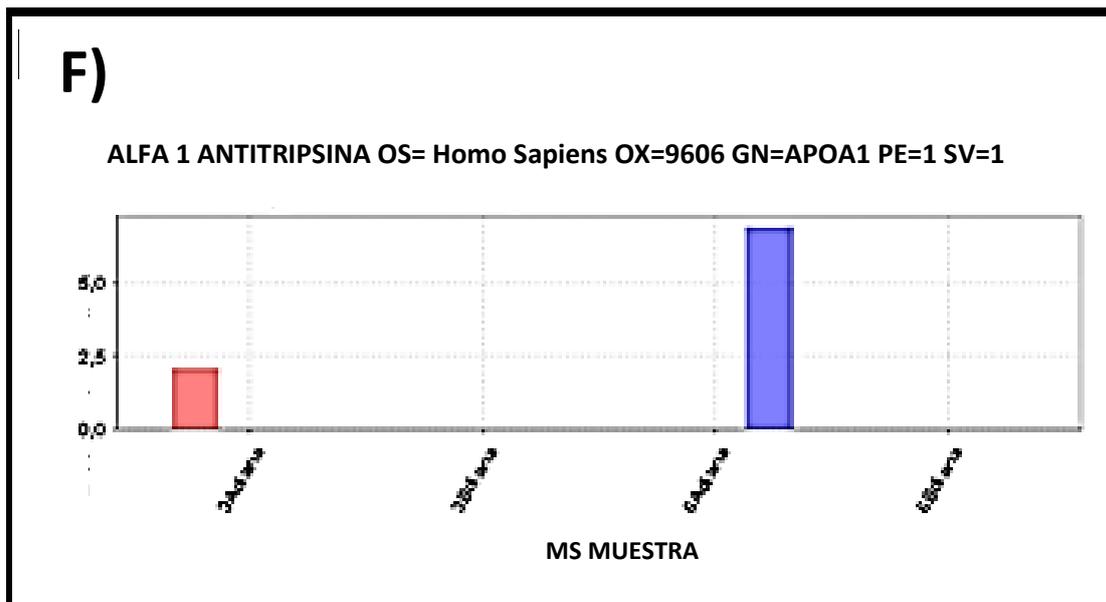


Figura 31. Visión cuantitativa de la normalización de α -1 antitripsina expresada diferencialmente en el subanálisis de casos frente a controles en mujeres.

4.2.2. Evaluación cuantitativa de apolipoproteína A1 y α -1 antitripsina en casos de muerte por sumersión y otras causas de muerte.

Para validar los resultados obtenidos en la expresión de proteínas, analizamos en 25 casos las concentraciones en sangre de ambas proteínas. Incluimos 25 casos forenses 16 fallecidos de muerte por sumersión y 9 por otras causas de muerte. El 72% de los casos fueron hombres, con edad media $58 \pm 18,2$ años y con un intervalo postmortem de $23,0 \pm 15,0$ horas. El intervalo postmortem superó las 72 horas solo en un caso de sumersión. Evaluamos las concentraciones obtenidas en el grupo de casos por sumersión vs control para apolipoproteína A1, siendo $141,21 \pm 40,52$ vs $87,58 \pm 38,37$ mg/dl, y α -1 antitripsina, siendo $108,73 \pm 50,08$ vs $173,62 \pm 75,76$ mg/dl, obteniendo diferencias estadísticamente significativas para ambas proteínas (figura 32).

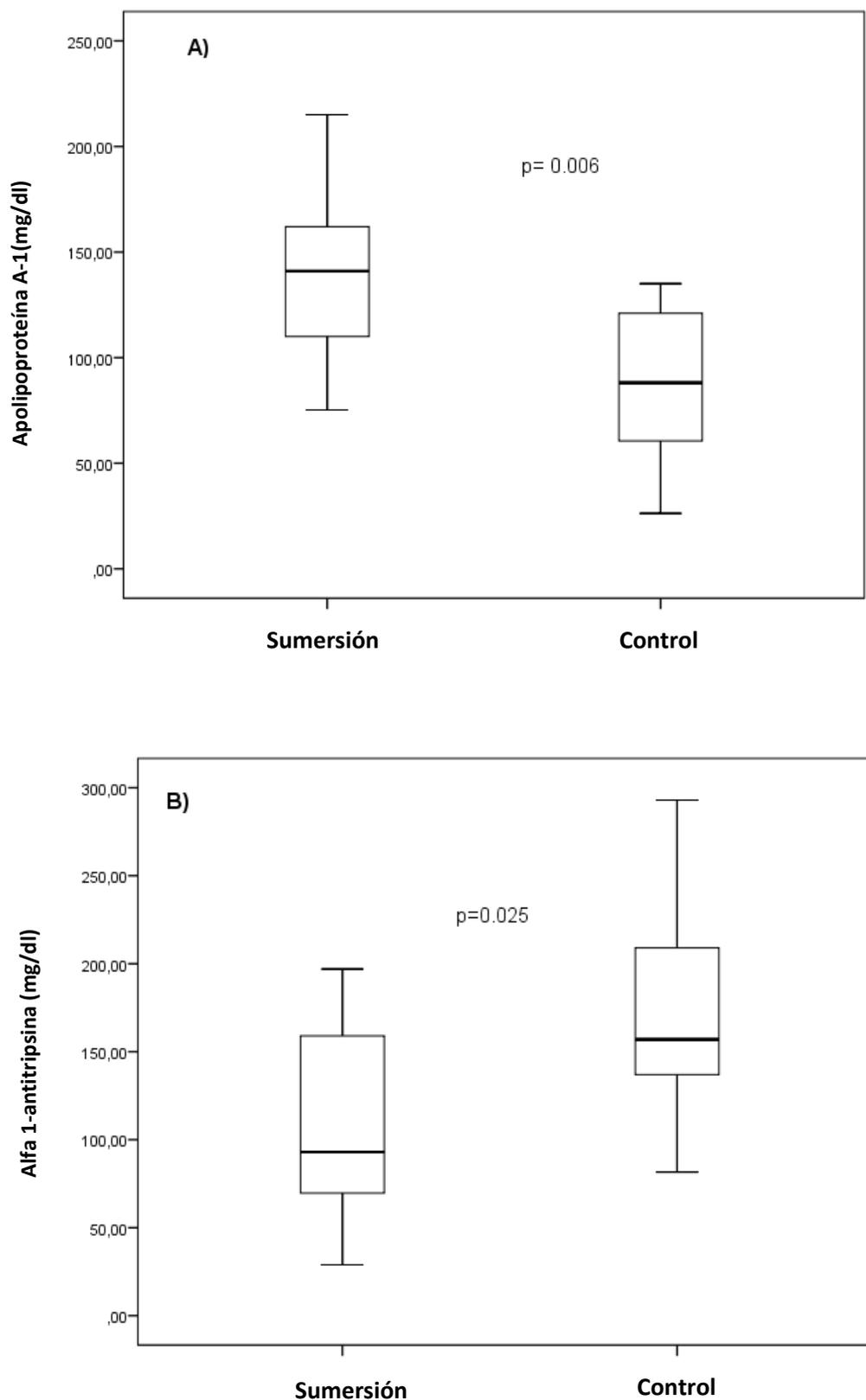


Figura 32. Niveles plasmáticos de apolipoproteína A1 (A) y α -1 antitripsina (B) comparados en sumersión vs. muestras controles (T-student no apareados).

A continuación, analizamos si los biomarcadores eran factores predictivos para diagnosticar la muerte por sumersión, y tanto la apolipoproteína A1 (tabla 37) como la α -1 antitripsina (tabla 38) resultaron estar asociadas con la muerte por sumersión. Cuando se ajustaron por factores de confusión, ambos permanecieron como factores predictivos independientes ($p=0,010$ y $p=0,022$, respectivamente).

Variable dependiente	Coefficientes desestandarizados		Coefficientes estandarizados	T	Valor p
Univariable	B	95%CI for B	β		
Sumersión	-53.75	-90.0-(-17.49)	-0.56	-3.08	0.006
Multivariable					
Sumersión	-54.69	-3.82-(-14.26)	-0.56	-2.84	0.010
Edad	0.13	-0.96-(1.21)	0.05	0.24	0.811
Sumersión	-9.40	-49.89-31.18	-0.09	-0.48	0.633

Tabla 37. Análisis de asociación (regresión lineal) de los niveles de apolipoproteína A1 con muerte por sumersión. B: Coeficiente de regresión; 95%CI: 95% intervalo de confianza.

Variable dependiente	Coefficientes desestandarizados		Coefficientes estandarizados	T	Valor p
Univariable	B	95%CI for B	β		
Sumersión	64.90	9.13-120.66	0.48	2.43	0.025
Multivariable					
Sumersión	-68.54	-10.88-126.19)	0.50	2.45	0.022
Sumersión	-0.69	-2.36-0.98	-0.18	-0.87	0.395
Edad	30.62	-30.0-91.22	0.21	-1.06	0.303
Género					

Tabla 38. Análisis de asociación (regresión lineal) de los niveles de α -1 antitripsina (b) con muerte por sumersión. B: Coeficiente de regresión; 95%CI: 95% intervalo de confianza.



4.2.3. Análisis de las diferencias de concentraciones plasmáticas de apolipoproteína A1 y α -1 antitripsina en los casos de muerte por sumersión y otras causas de muerte mediante curvas ROC y análisis discriminante.

Construimos curvas de características operativas del receptor (ROC) para los niveles de biomarcadores según causa de la muerte. En el caso de las muertes por sumersión, los niveles de apolipoproteína A1 mostraron un área bajo la curva de 0.85, $p < 0,010$, mientras que los valores de α -1 antitripsina no alcanzaron una diferencia estadísticamente significativa (figura 33, tabla 39). El punto de corte con mejor especificidad y sensibilidad en el caso sumersión para apolipoproteína A1 fue de 100 mg/dl (tabla 40).

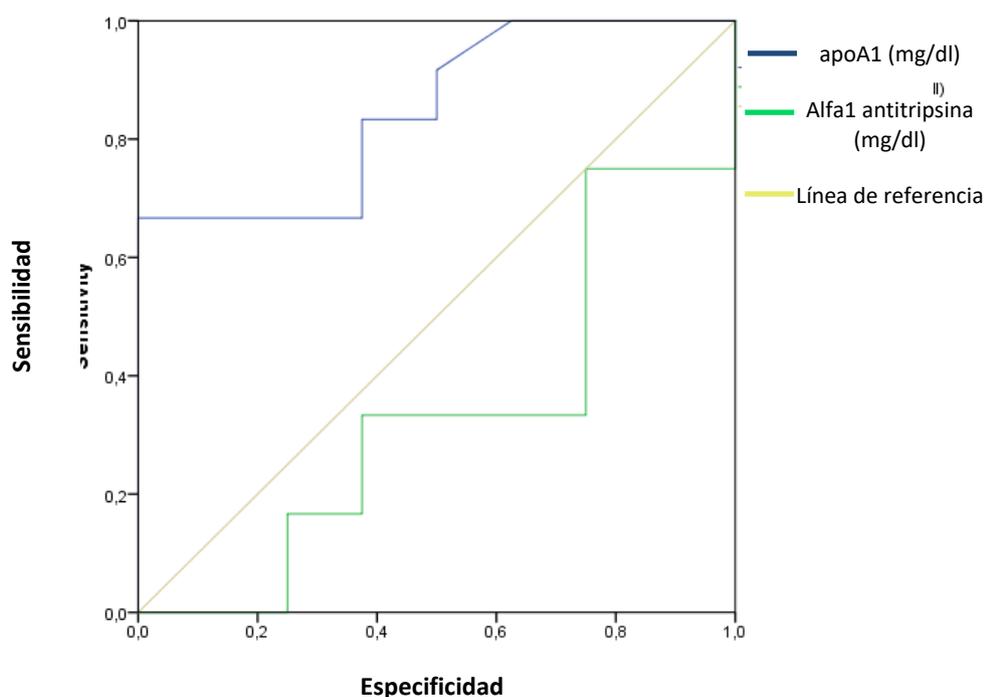


Figura 33. Curvas ROC de niveles de apolipoproteína y α -1 antitripsina en la predicción de muerte por sumersión.

Realizamos un análisis discriminante con el punto de corte que mostró las mejores curvas de discriminación entre sumersión y no sumersión. Usamos el grupo diagnóstico



como variable de agrupación, estableciendo dos grupos: muertes por sumersión y casos control. Se alcanzó una clasificación correcta mediante el punto de corte de apolipoproteína A1 del 73,9% de los casos (tablas 39, 40 y 41).

Variable	Área	Error estándar	Valor p	Límite inferior	Límite superior	Punto de corte
Apolipoproteína A1	0.85	0.09	0.010	0.68	1.0	100
α-1 antitripsina	0.33	0.13	0.217	0.08	0.58	

Tabla 39. Áreas por debajo de las curvas ROC, error estándar y límites inferior y superior del área. Puntos de corte establecidos según el uso de una curva característica del operador del receptor.

Variable	Sensibilidad del punto de corte	Especificidad del punto de corte
Apolipoproteína A1	0.89	0.50
α-1 antitripsina		

Tabla 40. Análisis discriminante usando apolipoproteína A1 sumersión.

Variable	Sumersión (% clasificación correcta)	No sumersión (% clasificación correcta)	Total (% clasificación correcta)
Apolipoproteína A1	86.7	50.0	73.9
α-1 antitripsina			

Tabla 41. Análisis discriminante usando apolipoproteína A1 sumersión.





5. DISCUSIÓN



La muerte por sumersión continúa siendo uno de los problemas de difícil resolución dentro de la medicina legal y forense, no existiendo en la actualidad una prueba inequívoca y específica para su diagnóstico positivo. Según la Organización Mundial de la Salud se producen 450.000 muertes al año por ahogamiento siendo la segunda causa de muerte accidental después de los accidentes de tráfico (43), aunque estos datos están infravalorados por las dificultades en la comunicación de muertes por sumersión (49).

El aumento de las actividades recreativas en medio acuático (38), así como la acción de la naturaleza en forma de inundaciones, tsunamis, etc. ha dado lugar a un auge en el número de fallecidos a consecuencia de la sumersión, además de la necesidad de diferenciar si la sumersión fue vital de los casos en los que el cuerpo sin vida fue arrojado al agua. Demostrar la sumersión como causa de la muerte sigue siendo un problema de difícil resolución en la práctica forense ya que los signos macroscópicos y microscópicos no son específicos y la prueba diagnóstica ideal todavía no está establecida (160).

En el estudio forense de muertes violentas, en algunos casos es difícil determinar un diagnóstico inequívoco solo basado en los hallazgos histopatológicos. Por este motivo se ha desarrollado un importante campo de investigación en los ámbitos forenses en la búsqueda de pruebas complementarias que faciliten el diagnóstico postmortem, investigaciones que pueden tener implicaciones en la práctica clínica, para aquellos sujetos que han sobrevivido a un proceso de sumersión.

En el examen médico forense de las muertes por sumersión se realizan estudios complementarios amplios (histopatológicos, toxicológicos y biológicos) y se han llevado a cabo numerosos estudios en diferentes áreas para conseguir un diagnóstico positivo.

Los hallazgos histopatológicos a nivel del pulmón que es el principal órgano afectado, tales como el aumento del peso pulmonar (147), enfisema acuoso, congestión pulmonar, edema, hemorragia alveolar, ruptura de paredes alveolares señalados por Shkrum y Ramsay (110), no son específicos y no permiten un diagnóstico positivo.

El estudio de diatomeas a nivel biológico presenta limitaciones, como indican Lunetta y Modell (109) pudiendo dar lugar a falsos positivos (contaminación antemortem



o postmortem) y a falsos negativos (baja concentración de diatomeas, escasa cantidad de líquido inhalado).

A nivel radiológico, aunque se han realizado tomografías computarizadas en las que se ha evidenciado acumulación de líquido a nivel de senos craneales (248,249), para Astrid et al (252) no es posible diferenciar de forma fiable la muerte por sumersión de otras muertes por otros mecanismos de asfixia.

Piette y De Letter (160) señalaron el desplazamiento de componentes alveolares a la circulación general por la ruptura de las paredes alveolares, y en este sentido se estudiaron la proteína A y D del surfactante (94,223,258-261), la estabilidad del surfactante pulmonar (255) y Miyazato et al. (262) se centraron en la expresión del RNA mensajero de las proteínas del surfactante. Todo ello sin concluir como prueba diagnóstica definitiva ninguno de los estudios realizados.

En el campo de la bioquímica se han realizado estudios en relación a la variabilidad de los elementos químicos como consecuencia de la penetración de agua en el organismo en la sumersión desde principios del siglo pasado (201-204), existiendo un auge en estos estudios a principios de este siglo y gracias al avance en las técnicas de detección de elementos traza (ICP-MS y ICP-OES). Las alteraciones electrolíticas que se producen como consecuencia del ingreso del agua en el torrente circulatorio en la sumersión dependen de la cantidad y del tipo del líquido aspirado, así como de la concentración de los elementos químicos presentes en dicho líquido.

Los cambios electrolíticos en la sumersión han sido ampliamente estudiados como métodos complementarios para el diagnóstico de la causa de la muerte basándose en el estudio de sustancias químicas en la circulación sanguínea presentes en el organismo en bajas concentraciones y que además se encuentran en el agua de sumersión.

En este sentido y según Maeda et al. (206), los marcadores bioquímicos deben ser de respuesta rápida, tienen que tener estabilidad postmortem, especificidad y sensibilidad y realizarse por técnicas analíticas rápidas y fiables para la detección, entre otras características. Dentro de los de mayor valor diagnóstico se encuentran los electrolitos



(207). El estroncio ha sido ampliamente estudiado como marcador (40,160,214,218,221,223-225,243) con resultados positivos para la diferenciación entre sumersión en agua dulce y agua salada. Su concentración en sangre se encuentra entre 16-95 μ g/L, siendo dicha variación consecuencia de la alimentación, el tipo de agua y el uso de fármacos (215), con concentraciones en agua de mar de hasta 13000 μ g/L, siendo un marcador potencial de muertes por sumersión (218).

No hallamos correlaciones estadísticamente significativas de los elementos traza analizados en humor vítreo con el intervalo postmortem, siendo nuestros hallazgos concordantes con los estudios previos (295).

En nuestro estudio procedimos a analizar los niveles de boro, bromo, magnesio, litio, calcio, estroncio y potasio en muestras de sangre de cadáveres en el marco de la rutina médico-legal en tres localizaciones (ventrículos y sangre periférica) y en humor vítreo en casos de muertes por sumersión como en otras causas de muerte, así como en el medio de sumersión en aquellos casos en los que se confirmó como causa de muerte la sumersión.

Encontramos que tanto boro como litio mostraron ser buenos marcadores en el caso de muertes por sumersión, siendo sus concentraciones significativamente superiores en muertes por sumersión en las tres localizaciones sanguíneas y una fuerte asociación estadística en todas las muestras de sangre.

Otros elementos que se encuentran en elevada concentración tanto en agua de mar como en sangre humana son el magnesio y el calcio. Zhu et al. (231) en 2003 observaron niveles de calcio y magnesio elevados en sumersión en agua salada en sangre cardiaca, mientras que en 2005 (232) encontraron niveles significativamente más elevados en sangre central y periférica de calcio y magnesio en las muertes por sumersión en agua salada, no existiendo un aumento significativo dependiente del tiempo en periodos postmortem tempranos.

En nuestro estudio, los niveles tanto de magnesio como de calcio mostraron diferencias estadísticamente significativas entre las concentraciones en los casos de



muerte por sumersión y otras causas de muerte en relación a las muestras de sangre de ventrículo derecho y sangre de ventrículo izquierdo; a su vez, Las concentraciones de magnesio en las tres localizaciones sanguíneas fueron significativamente más elevadas en los casos de sumersión frente a otras causas de muerte, mostrándose también como buen marcador de la muerte por sumersión. Sin embargo, el calcio no mostró diferencias estadísticamente significativas en las muestras de sangre periférica, con bajas diferencias de concentraciones en el caso de las muertes por sumersión y otras causas de muerte, lo que lo hace un marcador relativamente poco útil de manera aislada.

Con respecto al bromo, en nuestro estudio encontramos mayores diferencias de concentración a nivel de sangre de ventrículo izquierdo. En las correlaciones entre las distintas localizaciones y el agua de sumersión mostró buenos resultados en relación a las concentraciones de humor vítreo y sangre periférica, no existiendo diferencia significativa entre el agua de sumersión y las concentraciones de sangre de ventrículo izquierdo y ventrículo derecho. Esto indicaría que el bromo podría ser un potencial marcador de sumersión a partir de las muestras de humor vítreo (296).

Potasio no manifestó correlación significativa de las muestras de sangre en las tres localizaciones y de las muestras de humor vítreo con el agua de mar, así como tampoco una diferenciación significativa con las muestras de humor vítreo, de tal manera que el potasio no sería un buen marcador para el diagnóstico de muerte por sumersión.

El estroncio ha sido estudiado ampliamente como marcador en el diagnóstico de la muerte por sumersión, siendo actualmente en la práctica forense uno de los estudios de electrolitos usado como método complementario especialmente en el caso de la sumersión en el agua salada, y con mayor precaución en el caso de sumersión en al agua dulce. Para ello en la práctica forense se utilizan muestras de suero de sangre de ventrículo derecho, ventrículo izquierdo y sangre periférica y se compara con las concentraciones de estroncio halladas en agua de sumersión (Orden JUS/1291/2010, de 13 de mayo). En el caso de sumersión en agua salada las diferencias de concentración son más elevadas que en el caso de sumersión en agua dulce; en relación a los niveles de estroncio en sangre de ventrículo derecho e izquierdo en casos de sumersión en agua dulce, Azparren et al. (40) llegaron a un 32% de diagnóstico de sumersión; Pérez Cárceles et al. (41,246)



confirmaron los resultados de Azparren, con valores muy superiores para las concentraciones de estroncio probablemente debido a las diferencias de concentraciones de estroncio en el agua de sumersión de los casos estudiados, estando dichos casos localizados en el norte de España en el estudio de Azparren et al. y en el sur de España en los estudios de Pérez Cárceles et al.

En el año 2000, Azparren et al. (221) concluyeron que valores superiores de estroncio a 172 $\mu\text{g/L}$ en sangre de ventrículo izquierdo eran indicativos de muerte por sumersión. En nuestro estudio obtuvimos resultados análogos en relación al estroncio y concordantes con los estudios previos realizados, confirmándose como especialmente útil para el diagnóstico de sumersión.

En los análisis de humor vítreo que realizamos se mostraron altos niveles de bromo, estroncio, litio, boro, magnesio y potasio en los casos de sumersión frente a las muertes por otras causas, con diferencias estadísticamente significativas en los seis elementos. Solamente no hallamos diferencias significativas en el caso de las concentraciones de potasio.

Nuestros resultados revelan que los 7 elementos analizados correlacionan sus concentraciones entre las halladas en sangre con las concentraciones en humor vítreo, lo que pone de manifiesto la utilidad de este fluido, como una alternativa a la determinación en sangre de elementos traza para el diagnóstico de la muerte por sumersión. También comprobamos que las concentraciones de todos los elementos traza correlacionan de forma significativa y positiva entre la sangre y el agua de sumersión, lo que orienta a confirmar la aspiración de agua como un proceso vital.

En el caso del litio, bromo, calcio y estroncio también hubo correlaciones estadísticamente significativas entre las concentraciones en humor vítreo y agua de sumersión.

Al realizar los análisis de correlaciones bivariadas de los niveles de los elementos entre la sangre, en las tres localizaciones, el humor vítreo y el agua de sumersión hallamos correlaciones estadísticamente significativas para todos los elementos traza. Todos los



marcadores analizados presentaron correlaciones entre sí en todas las localizaciones sanguíneas.

En el análisis de las curvas ROC en las muestras en sangre las concentraciones de litio, boro, estroncio y magnesio entre tres localizaciones y de magnesio y calcio en sangre de ambos ventrículos tienen un alto poder de discriminación entre muerte por sumersión frente a otras causas. La mayor capacidad discriminante se halló para las concentraciones de estroncio, litio y magnesio con las áreas bajo la curva mayores de 0,70. Para las concentraciones de boro se halló mayor capacidad discriminante en las muestras de sangre de ventrículo izquierdo, mientras que para bromo la mayor capacidad discriminante se comprobó en sangre de ventrículo izquierdo y en el caso del calcio tanto en sangre de ventrículo derecho como izquierdo. Tanto boro, bromo como calcio presentaron sensibilidades y especificidades menores.

En el análisis de las curvas ROC la mayor capacidad discriminante en humor vítreo entre muerte por sumersión frente a otra causa de muerte se halló para las concentraciones de estroncio, litio, boro, bromo y magnesio con las áreas bajo la curva mayores de 0,60, teniendo según los puntos de corte establecidos, la mejor sensibilidad y especificidad el boro, el litio y el estroncio.

Con los elementos traza con capacidad para discriminar muertes por sumersión de otras causas de muerte que fueron identificados con las curvas ROC, realizamos un análisis de regresión logística para conocer los factores asociados a la muerte por sumersión. Las variables edad, sexo, peso de los pulmones e intervalo postmortem no fueron factores asociados a la muerte por sumersión.

Por otra parte, en el caso de la sangre las concentraciones de bromo, estroncio, boro y magnesio en las tres localizaciones y calcio y bromo en ambos ventrículos fueron factores asociados en la muerte por sumersión. Sin embargo, en el análisis multivariante sólo las concentraciones de estroncio y bromo en ventrículo izquierdo y boro en sangre periférica se mantuvieron como factores predictivos en la muerte por sumersión. En el análisis de regresión logística de las muestras de humor vítreo, fueron factores asociados las concentraciones de bromo, boro y estroncio, permaneciendo en el multivariante el



boro y bromo, siendo el primer factor asociado a la muerte por sumersión el bromo. En este sentido, Tanaka et al (296) encontró que el aumento de bromo en el líquido del seno esfenoidal podría ser un marcador bioquímico de apoyo en el diagnóstico de las muertes por sumersión en agua salada ya que el bromo se encuentra en concentraciones más elevadas en agua salada y que el aumento del líquido del seno esfenoidal no se produce a consecuencia de los fenómenos de putrefacción.

Al realizar el análisis discriminante con las variables que han sido factores asociados a la muerte por sumersión en el análisis de regresión logística se obtuvo que la determinación conjunta de boro en sangre periférica y bromo y estroncio en sangre de ventrículo izquierdo permitía una correcta identificación en el 92,7% de los casos, siendo el porcentaje correcto de clasificación de los casos de sumersión del 96,4%. De manera individual, las determinaciones de estroncio en sangre de ventrículo izquierdo constituyeron los parámetros que mejor clasificación consiguieron en los casos de sumersión (identificación correcta de 94,6%.) Estos hallazgos sugieren que las determinaciones de boro, bromo y estroncio en sangre se constituyen como elementos especialmente útiles para el diagnóstico de las muertes por sumersión en agua de mar. En este sentido, los estudios realizados por Pérez-Cárceles et al. en 2012 (243) concluyeron una determinación correcta del 73,2% de los casos con la determinación conjunta de estroncio, magnesio, cloro y sodio en sangre para la identificación de los casos de muerte en agua salada.

El análisis discriminante del humor vítreo reveló que la determinación conjunta de boro y bromo en humor vítreo pueden ser especialmente útiles para el diagnóstico de la muerte por sumersión en agua salada, con una identificación correcta de 91%. De forma individual, la determinación de boro en humor vítreo fue el parámetro que mejor clasificó los casos de sumersión en agua salada (91%). La determinación conjunta de boro y bromo en humor vítreo se elevó la capacidad discriminante para la correcta identificación en los casos de muerte por sumersión en agua salada, llegando al 91%.

El humor vítreo permanece en un compartimento estanco siendo menos susceptible a los efectos de la descomposición o contaminación, pudiendo encontrarse niveles elevados de sodio en los casos de muerte por sumersión en agua salada mientras que serán



bajos en los casos de sumersión en agua dulce (297), aunque pueden ser causados por deshidratación, exceso de sodio en la dieta o por difusión postmortem (298).

En 2016 Garland et al. (299), estudiaron en humor vítreo los niveles de sodio y cloro en sumersión en agua salada encontrando que los niveles eran más elevados cuando el tiempo de sumersión era inferior a 1 hora, con niveles de sodio y cloro postmortem en humor vítreo de 259 mmol/L con una sensibilidad y especificidad de 80% y 90% respectivamente. Zilg et al. (247) estudiaron la relación entre el intervalo postmortem y los niveles de sodio y cloro en humor vítreo llegando a la conclusión que los niveles descienden lentamente con el intervalo postmortem.

En 2017 Tse et al. (300) estudiaron el magnesio en humor vítreo encontrando en los casos de sumersión cuyos cuerpos han sido recuperados del agua en intervalos de tiempo superior a 1 hora, evidencias estadísticamente significativas de que los niveles de magnesio se encontraban más elevados en relación a aquellos que habían permanecido en agua menos de 1 hora y al igual que en otras causas de muerte; también estudiaron los niveles de cloruro de sodio encontrando evidencias estadísticamente significativas de niveles en humor vítreo más elevados en los casos que habían permanecido en agua un intervalo de tiempo inferior a 1 hora.

Así los estudios en humor vítreo para el diagnóstico de muerte por sumersión son escasos y centrados la mayoría en el diagnóstico de la data de la muerte y la relación entre muerte y alcohol, diabetes, reacciones anafilácticas y la hipotermia en el campo de la patología forense (301). Por lo tanto, es difícil comparar nuestros resultados con estudios previos publicados por otros investigadores.

Además del estudio de los elementos traza, realizamos un experimento proteómico piloto con muestras de plasma obtenidas de casos forenses (302). Dado que los patrones de expresión de proteínas pueden estar influenciados por características demográficas interpersonales como edad y sexo (303,304), seleccionamos muestras emparejadas. Por lo tanto, usamos muestras de 4 casos forenses: dos casos de sumersión y dos controles (uno de ahorcadura, que comparte el contexto de asfixia fisiopatológica con la sumersión y un tipo de muerte radicalmente diferente, politraumatismo).



Después de aplicar parámetros restrictivos en el procesamiento de datos para la identificación de péptidos y proteínas, seleccionamos proteínas que mostraban diferentes niveles de expresión en muestras de sumersión y controles.

La apolipoproteína A1 (imagen 32) resultó tener un mayor nivel de expresión en sumersión en comparación con los casos controles, mientras que para α -1 antitripsina (imagen 32), encontramos niveles más bajos en los casos de sumersión, salvo en el caso de muerte por ahorcadura, debido a la etiología común con la muerte por sumersión.

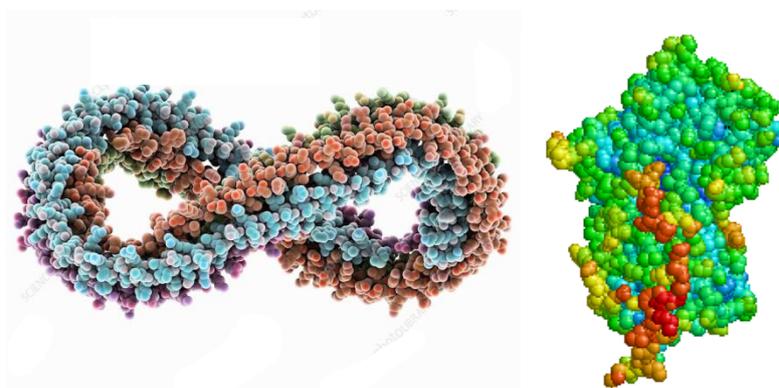


Imagen 32. Apolipoproteína A1 y alfa-1 antitripsina.

Para corroborar mejor nuestros resultados, realizamos un experimento de validación con muestras de plasma de muertes por sumersión y casos controles. Los datos del experimento de validación revelaron, por primera vez, que tanto apolipoproteína A1 como α -1 antitripsina son factores predictivos independientes de muertes por sumersión, incluso después de ajuste por factores de confusión.

Hasta donde sabemos, ninguno de los dos biomarcadores propuestos se ha estudiado en el contexto de la fisiopatología de sumersión previamente. Varios estudios han informado que los pacientes rescatados y que han sobrevivido de un proceso de sumersión comparten características clínicas con aquellos con síndrome de dificultad respiratoria aguda, normalmente mostrando una mejor evolución los pacientes ahogados debido a que estos solo presentan lesiones temporales (305).

Se ha informado de un papel importante para la apolipoproteína A1 en la patogénesis moduladora de muchas enfermedades respiratorias, como inhibición de la inflamación, estrés oxidativo o lavado broncoalveolar (306,307). Investigaciones recientes han indicado que apolipoproteína A1 está involucrada en varias patologías respiratorias como la inflamación neutrofílica de las vías respiratorias, en el asma tipo II (308).

Otras propiedades antiinflamatorias e inmunomoduladoras han sido propuestas para apolipoproteína A1, que pueden ser relevantes para respuestas inmunes en el asma alérgico (309,310). Por tanto, las concentraciones elevadas de apolipoproteína A1 pueden estar relacionados con los procesos de lavado broncoalveolar, inflamación y estrés oxidativo que ocurren en la sumersión.

La α -1 antitripsina es un inhibidor de la serin proteasa que es producido principalmente por los hepatocitos, pero también es producido por células alveolares pulmonares, monocitos y macrófagos (311). Se ha propuesto un papel relevante de esta proteína en la inflamación y en los procesos de infección en el pulmón. La deficiencia de α -1 antitripsina se ha asociado con la destrucción de las paredes alveolares y cambios enfisematosos debido a la degradación de elastina inducida por elastasa en los pulmones (311). La α -1 antitripsina participa en la protección de las células alveolares pulmonares (312). Curiosamente se han identificado niveles reducidos de α -1 antitripsina en el asma y la bronquiectasia (313,314).

Por lo tanto, la disminución del nivel de α -1 antitripsina detectada en el plasma de nuestros casos de sumersión puede explicarse por la presencia de inflamación aguda, estrés oxidativo y actividad proteasa en los pulmones. También encontramos niveles más bajos de α -1 antitripsina en caso de ahorcadura, incluso cuando comparamos con la muerte por sumersión.

Hasta la fecha, el mecanismo exacto que conduce a la muerte por ahorcadura aún no se ha dilucidado. Sin embargo, las principales teorías fisiopatológicas se basan en



mecanismos de asfixia respiratoria, interrupción de flujo sanguíneo debido a la oclusión de los vasos en el cuello e inhibición cardíaca secundaria a la estimulación nerviosa (315).

Dado que las vías fisiopatológicas parecen estar parcialmente compartidas entre los dos tipos de asfixia, no es de extrañar que la α -1 antitripsina apareciera poco expresada en los casos de ahorcadura y sumersión.

Tanto la fisiopatología de la sumersión como la supervivencia tras un suceso de ahogamiento comparten signos de edema pulmonar, pérdida de surfactante y aumento de la permeabilidad del capilar alveolar de la membrana lo que produce a una disminución de la distensión pulmonar, reducción de la perfusión en los pulmones, atelectasia y broncoespasmo (86,316,317). De hecho, tanto en el caso de sumersión con agua dulce como salada, las fuerzas hidrostáticas interrumpen la integridad de la membrana alveolo-capilar y el plasma entra en los alveolos, limitando el intercambio normal de gases y generando espuma. Esto determina una disminución de la eficiencia pulmonar y dificultad respiratoria (109).

Además, en la fisiopatología de la sumersión influye el miedo a ahogarse, con activación simpática, apnea voluntaria para la conservación de oxígeno, aspiración de agua y deglución, que pueden contribuir a la prevención y supervivencia en la sumersión (318).

La aplicación de nuevas tecnologías como la -ómica (genómica, transcriptómica, epigenética/imprintomics, proteómica y metabolómica) auguran una repercusión importante en las ciencias forenses (319).

La información útil derivada de estas nuevas tecnologías puede ayudar en la llamada "autopsia molecular", como herramienta complementaria a la autopsia clásica. Sin embargo, los estudios publicados en la proteómica forense son escasos, y principalmente centrados en la búsqueda de un intervalo postmortem preciso o la estimación de la edad (267,268,320-322). Además, aparte de algunas escasas investigaciones sobre las muertes cardíacas o el síndrome de muerte súbita del lactante,



sólo unos pocos estudios se han dedicado a investigar la causa de la muerte, que en casos forenses añadiría una especial importancia (266,323,324).

La principal limitación de nuestro estudio es el pequeño tamaño de la muestra, con sólo 16 casos en el grupo de ahogados y 9 en el de control, lo que tal vez resulte en una pérdida de significación estadística en algunos de nuestros análisis.

Además, no se incluyeron los cadáveres en estado avanzado de descomposición. Con frecuencia, en la práctica diaria en los casos de muerte por ahogamiento, los sujetos se encuentran en un estado avanzado de descomposición. Por lo tanto, los resultados de nuestro estudio no pueden extrapolarse a cadáveres en avanzado estado de descomposición. Además, hemos incluido casos con un intervalo postmortem < 72 h el cual no influyó en los dos biomarcadores de nuestro estudio; sin embargo, no podemos descartar la posible influencia en futuros estudios similares con cohortes más grandes y/o intervalo postmortem mayor. A pesar de todas estas limitaciones, nuestros resultados son prometedores no sólo para su utilidad en el ámbito forense, sino que también pueden tener importantes repercusiones en el ámbito clínico.





6. CONCLUSIONES



1. Las concentraciones de los elementos traza boro, bromo, calcio, estroncio, litio y magnesio en los casos de muerte por sumersión son significativamente superiores en sangre de las tres localizaciones (ambos ventrículos y sangre periférica) frente a otras causas de muerte.
2. En sangre los elementos predictores de muerte por sumersión son las concentraciones de boro en sangre periférica y bromo y estroncio en sangre de ventrículo izquierdo. La determinación conjunta de estos tres marcadores permite clasificar al 96,4 % de los casos de sumersión en agua salada.
3. Las concentraciones de los elementos traza boro, bromo, litio, estroncio, magnesio y potasio son significativamente superiores en humor vítreo en los casos de sumersión en agua salada frente a otras causas de muerte.
4. En humor vítreo los factores que predicen la muerte por sumersión son las concentraciones de boro y bromo. La determinación conjunta de estos dos elementos traza clasifica correctamente al 91% de los casos de sumersión en agua salada.
5. Las correlaciones estadísticamente significativas entre las concentraciones de los elementos traza en el agua de sumersión con las halladas en sangre y humor vítreo y la ausencia de correlación con el intervalo postmortem sugieren la aspiración vital de agua.
6. Para el diagnóstico de sumersión en agua salada la determinación de estroncio en sangre en las tres localizaciones analizadas (sangre periférica y ambos ventrículos) se confirma como el mejor marcador individual y el análisis de elementos traza en humor vítreo se perfila como una herramienta más en circunstancias en las que la sangre no pueda utilizarse.
7. El análisis de correspondencia múltiple (PCA) muestra que los elementos traza en sangre y en humor vítreo aportan una mejor información sobre el diagnóstico de la muerte por sumersión.



8. El análisis proteómico identifica dos biomarcadores: apolipoproteína A1 y α -1 antitripsina, que pueden contribuir como exámenes complementarios a mejorar el diagnóstico de muerte por sumersión. Proponemos un punto de corte para la apolipoproteína A1 de 100mg/dL para ayudar en la correcta clasificación de las muertes por sumersión.

9. El análisis conjunto de elementos traza en sangre y humor vítreo, junto a la determinación proteómica de apolipoproteína A1 y α -1 antitripsina contribuiría como pruebas complementarias al diagnóstico de muertes por sumersión en agua salada.

10. La investigación forense permite no solamente aportar nuevas herramientas diagnósticas a la muerte por sumersión, sino contribuir a un mejor conocimiento de su fisiopatología con importantes repercusiones en la estrategia terapéutica de pacientes que hayan sobrevivido a un proceso de sumersión.





7. BIBLIOGRAFÍA



- (1) Di Maio DJ, Di Maio VJ. Forensic Pathology. New York: Elsevier; 1989.
- (2) Dolinak D, Matshes E. Asphyxia. Forensic pathology: principles and practice USA: Academic Press; 2005. p. 201-226.
- (3) Concheiro Carro L, Suárez Peñaranda JM. Asfixias mecánicas. En: Villanueva E. Medicina Legal y Toxicología (60ª ed.). Masson: Barcelona, 2004.
- (4) Adelman HC. Asphyxia/Anoxic Deaths. In: Kobilinsky L, editor. Forensic Medicine. 1ª Edición ed. New York: Chelsea House; 2007. p. 50-57.
- (5) Staubesand J. Atlas de Anatomía Humana, Vol 1. 19th ed. Madrid: Editorial Médica Panamericana; 1988.
- (6) Sauvageau A, Boghossian E. Classification of asphyxia: the need for standardization. J Forensic Sci 2010;55(5):1259-1267.
- (7) Dix J, Graham M, Hanzlick R. Asphyxia and Drowning an Atlas. 1ª Edición. ed. Florida.: CRC Press; 2000.
- (8) Saukko P, Knight B. Suffocation and asphyxia. In: Arnold E, editor. Forensic Pathology. 3ª edición ed. London: Hodder Arnold; 2004. p. 352-367.
- (9) Saukko P, Knight B. Fatal pressure on the neck In: Arnold E, editor. Forensic Pathology. 3ª edición ed. London: Hodder Arnold; 2004. p. 368-394.
- (10) Knight B. Immersion Deaths. Forensic Pathology London: Edward Arnold Publ.; 1991. p. 360-374.
- (11) Luna Maldonado A. Diagnóstico de muerte cierta. Medicina Legal y Toxicología. 6ª edición ed. Barcelona: Masson; 2004. p. 177-190.
- (12) Gisbert Calabuig JA, Villanueva Cañadas E, Gisbert Grifo MS. Fenómenos cadavéricos. Medicina Legal y Toxicología. 6ª edición ed. Barcelona: Masson; 2004. p. 191-2013.
- (13) Knight B. Immersion deaths. En: Forensic Pathology (2ª ed.). Arnold: Londres, 1996.
- (14) Jaffe FA. Petechial Hemorrhages A Review of Pathogenesis. The American journal of forensic medicine and pathology 1994;15(3):203-207.
- (15) Rao VJ, Wetli CV. The forensic significance of conjunctival petechiae. The American journal of forensic medicine and pathology 1988;9(1):32-34.
- (16) Betz P, Penning R, Keil W. The detection of petechial haemorrhages of the conjunctivae in dependency on the postmortem interval. Forensic Sci Int 1994;64(1):61-67.



- (17) Ely SF, Hirsch CS. Asphyxial deaths and petechiae: a review. *Journal of Forensic Science* 2000;45(6):1274-1277.
- (18) Hood I, Ryan D, Spitz W. Resuscitation and petechiae. *The American journal of forensic medicine and pathology* 1988;9(1):35-37.
- (19) Mole R. Fibrinolysin and the fluidity of the blood post mortem. *J Pathol* 1948;60(3):413-427.
- (20) Vanezis P. *Pathology of neck injury*. : Butterworth-Heinemann; 1989.
- (21) Klaubert W, Schönbauer R, Gilg T, Gollwitzer R, Hafter R, Graeff H, et al. The role of coagulation, fibrinogenolysis and fibrinolysis in the development of fluid and clotted cadaver plasma. *Thromb Res* 1988;50(1):53-63.
- (22) Hirvonen J, Kortelainen M, Huttunen P. Pulmonary and serum surfactant phospholipids and serum catecholamines in strangulation: An experimental study on rats. *Forensic Sci Int* 1997;90(1):17-24.
- (23) Sawaguchi A, Funao T, Yoshinari K. The behavior of serum lipids in suffocation. With reference to nonesterified free fatty acid, triglycerides and phospholipids. *Jpn J Leg Med* 1974;28:275-280.
- (24) Jiménez-Rios G, Luna Maldonado A, Villanueva E. Etude du comportement post mortem des catécholamines totales, adrénaline et noradrénaline dans le liquide péricardique, en relation avec la cause du décès et la durée de l'agonie. *Journal de médecine légale droit médical* 1988;31(3):251-259.
- (25) Lorente J, 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* 1990;12:803-811.
- (26) Hirvonen J, Huttunen P. Postmortem changes in serum noradrenaline and adrenaline concentrations in rabbit and human cadavers. *Int J Legal Med* 1996;109(3):143-146.
- (27) Solano González É. Asfixias mecânicas. *Medicina Legal de Costa Rica* 2008;25(2):61-68.
- (28) Delmonte C, Capelozzi VL. Morphologic determinants of asphyxia in lungs: a semiquantitative study in forensic autopsies. *The American journal of forensic medicine and pathology* 2001;22(2):139-149.
- (29) Jorge RR. Consideraciones médico legales sobre asfixias mecánicas. *Revista de la Escuela de Medicina Legal* 2009(11):43-49.
- (30) Olano AS. Caracterización bioquímica y estructural de las muertes por asfixias violentas: análisis de la proteína a del surfactante pulmonar y niveles de estroncio. Su aplicación al diagnóstico de sumersión vital 2010.



- (31) Jorge RR, García CR, Zamora NM. Sumersión suicida en un canal de agua. *Medicentro Electrónica* 2010;14(3).
- (32) Esiyok B, Balci Y, Ozbay M. Bodies recovered from wells, sewerage systems and pits: what is the cause of death? *Annals-Academy of Medicine Singapore* 2006;35(8):547.
- (33) Roll HF. *Leerboek der Gerechtelijke Geneeskunde voor de scholen tot opleiding van Ind artsen. Martinus Nijhoff. Gravenhage. 1918.*
- (34) Modell JH. Drown versus near-drown: A discussion of definitions. *Crit Care Med* 1981;9:351-352.
- (35) Thoinot L. *Tratado de medicina legal. Barcelona: Salvat; 1923.*
- (36) Simonín C. Sumersión. *Medicina Legal Judicial. Barcelona: JIMS; 1962. p. 225-243.*
- (37) Romero Palanco J. Muertes por sumersión: Revisión y actualización de un tema clásico de la medicina forense. *Cuadernos de Medicina Forense* 2007(48-49):99-130.
- (38) Papa L, Hoelle R, Idris A. Systematic review of definitions for drowning incidents. *Resuscitation* 2005;65(3):255-264.
- (39) Idris AH, Berg RA, Bierens J, Bossaert L, Branche CM, Gabrielli A, et al. Recommended guidelines for uniform reporting of data from drowning: the "Utstein style". *Circulation* 2003 Nov 18;108(20):2565-2574.
- (40) 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.
- (41) Pozo Luengo M. Marcadores bioquímicos séricos den la muerte por sumersión: eficacia diagnóstica del estroncio y otros elementos traza. *Proyecto de investigación: 2013.*
- (42) WHO. Informe mundial sobre ahogamientos. Prevenir una importante causa de mortalidad. 2016; Available at: http://www.who.int/violence_injury_prevention/global_report_drowning/es/. Accessed 5/1, 2017.
- (43) Defunciones según causa de muerte. 2014; Available at: http://www.ine.es/dyngs/INEbase/es/operacion.htm?c=Estadistica_C&cid=1254736176780&menu=ultiDatos&idp=1254735573175. Accessed 7/5, 2017.
- (44) Posada CAA. Ahogamiento y casi ahogamiento. *Archivos de Medicina (Manizales)* 2005;10:42-50.
- (45) Lunetta P, Smith GS, Penttila A, Sajantila A. Unintentional drowning in Finland 1970-2000: a population-based study. *Int J Epidemiol* 2004 Oct;33(5):1053-1063.



- (46) Moon RE, Long RJ. Drowning and near-drowning. *Emerg Med* 2002;14(4):377-386.
- (47) Torres SF, Rodríguez M, Iolster T, Siaba Serrate A, Cruz Iturrieta C, Martínez del Valle E, et al. Casi ahogamiento en pediatría: epidemiología y factores pronósticos. *Archivos argentinos de pediatría* 2009;107(3):234-240.
- (48) DeNicola LK, Falk JL, Swanson ME, Gayle MO, Kissoon N. Submersion injuries in children and adults. *Crit Care Clin* 1997;13(3):477-502.
- (49) Canturk N, Ozkara E, Canturk G, Bulent Ozata A, Fatih Yavuz M. Medico-legal child deaths in Istanbul: data from the Morgue Department. *Pediatrics international* 2007;49(1):88-93.
- (50) Diekema DS, Quan L, Holt VL. Epilepsy as a risk factor for submersion injury in children. *Pediatrics* 1993 Mar;91(3):612-616.
- (51) 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 Aug 13;112(1093):299-302.
- (52) Quan L, Cummings P. Characteristics of drowning by different age groups. *Inj Prev* 2003 Jun;9(2):163-168.
- (53) 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 Oct 12;110(15):2119-2124.
- (54) Plueckhahn VD. Alcohol and accidental drowning. A 25-year study. *Med J Aust* 1984 Jul 7;141(1):22-25.
- (55) Driscoll TR, Harrison JA, Steenkamp M. Review of the role of alcohol in drowning associated with recreational aquatic activity. *Inj Prev* 2004 Apr;10(2):107-113.
- (56) Gorniak JM, Jenkins AJ, Felo JA, Balraj E. Drug prevalence in drowning deaths in Cuyahoga County, Ohio: a ten-year retrospective study. *The American journal of forensic medicine and pathology* 2005;26(3):240-243.
- (57) WHO U. World report on child injury prevention. Geneva: World Health Organization 2008.
- (58) Gulliver P, Begg D. Usual water-related behaviour and 'near-drowning' incidents in young adults. *Aust N Z J Public Health* 2005;29(3):238-243.
- (59) Schyllander J, Janson S, Nyberg C, Eriksson U, Stark Ekman D. Case analyses of all children's drowning deaths occurring in Sweden 1998–2007. *Scand J Soc Med* 2013;41(2):174-179.



- (60) Watson RS, Cummings P, Quan L, Bratton S, Weiss NS. Cervical spine injuries among submersion victims. *Journal of Trauma and Acute Care Surgery* 2001;51(4):658-662.
- (61) Hwang V, Shofer FS, Durbin DR, Baren JM. Prevalence of traumatic injuries in drowning and near drowning in children and adolescents. *Arch Pediatr Adolesc Med* 2003;157(1):50-53.
- (62) 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 Aug;39(8):573-577.
- (63) Schwebel DC, Simpson J, Lindsay S. Ecology of drowning risk at a public swimming pool. *J Saf Res* 2007;38(3):367-372.
- (64) Kido M, Hitosugi M, Yokoyama T, Tokudome S. Sudden death while bathing. *Nippon Rinsho* 2005;63: 1239-1242.
- (65) Winskog C. Underwater disaster victim identification: the process and the problems. *Forensic science, medicine, and pathology* 2012;8(2):174-178.
- (66) Gamero J, Romero J, Arufe M, Vizcaya M, Balanza E. A study among the population of Sevilla of death due to submersion. *The American journal of forensic medicine and pathology* 1997;18(1):70-74.
- (67) Lucas J, Goldfeder LB, Gill JR. Bodies found in the waterways of New York City. *Journal of Forensic Science* 2002;47(1):137-141.
- (68) Byard RW, Houldsworth G, James RA, Gilbert JD. Characteristic features of suicidal drownings: a 20-year study. *The American Journal of Forensic Medicine and Pathology* 2001;22(2):134-138.
- (69) Avis SP. Suicidal drowning. *Journal of Forensic Science* 1993;38(6):1422-1426.
- (70) Davis LG. Suicidal drowning in south Florida. *Journal of Forensic Science* 1999;44(5):902-905.
- (71) Copeland AR. Suicide by drowning. *The American journal of forensic medicine and pathology* 1987;8(1):18-22.
- (72) Copeland AR. Homicidal drowning. *Forensic Sci Int* 1986;31(4):247-252.
- (73) Wirthwein DP, Barnard JJ, Prahlow JA. Suicide by drowning: a 20-year review. *Journal of Forensic Science* 2002;47(1):131-136.
- (74) Griest KJ, Zumwalt RE. Child abuse by drowning. *Pediatrics* 1989 Jan;83(1):41-46.
- (75) Kemp AM, Mott AM, Sibert JR. Accidents and child abuse in bathtub submersions. *Arch Dis Child* 1994 May;70(5):435-438.



- (76) Fornes P, Druilhe L, Lecomte D. Childhood homicide in Paris, 1990–1993: a report of 81 cases. *Journal of Forensic Science* 1995;40(2):201-204.
- (77) Sibón Olano A, Martínez-García P, Rojas V, Romero Palanco J. Síndrome de Asfixia Sumersión. *Cuadernos de Medicina Forense* 2005(41):229-233.
- (78) Reh H. En Müller, B. *Gerichtliche Medizin*. 1975.
- (79) Bray M. Chemical estimation of fresh water immersion intervals. *The American journal of forensic medicine and pathology* 1985;6(2):133-140.
- (80) Keiper JB, Chapman EG, Foote BA. Midge larvae (Diptera: Chironomidae) as indicators of postmortem submersion interval of carcasses in a woodland stream: a preliminary report. *Journal of Forensic Science* 1997;42(6):1074-1079.
- (81) Brouardel P, Vibert CH. Etude sur la submersion. *Annales d'Hygiène. Médecine Légale* 1880; 3-4: 452–470.
- (82) Brouardel P, Loye P. *Recherches expérimentales sur la mort par submersion brusque*. Masson Edti. Paris. 1889.
- (83) American Heart Association. Drowning. *Circulation* 2005;112:IV133-IV135.
- (84) Modell JH, Moya F, Newby EJ, Ruiz BC, Showers AV. The effects of fluid volume in seawater drowning. *Ann Intern Med* 1967;67(1):68-80.
- (85) Halmagyi DF. Lung changes and incidence of respiratory arrest in rats after aspiration of sea and fresh water. *J Appl Physiol* 1961 Jan;16:41-44.
- (86) Szpilman D, Bierens JJ, Handley AJ, Orłowski JP. cuRRent concepts. *N Engl J Med* 2012;366:2102-2110.
- (87) Zangani P, Palmieri VM, Sciaudone. *Manuale di Medicina LEgale e delle Assicurazioni*. 30 ed. ed. Napoli.: Morano Editore; 1985.
- (88) Wallace J. Drowning and near-drowning. *Harrison's principles of internal medicine: McGraw Hill*; 1991. p. 2200-2202.
- (89) Swann HG, Brucer M. Fresh water and sea water drowning; a study of the terminal cardiac and biochemical events. *Tex Rep Biol Med* 1947;5(4):423-437.
- (90) Swann HG, Spafford NR. Body salt and water changes during fresh and sea water drowning. *Tex Rep Biol Med* 1951;9(2):356-382.
- (91) Modell JH, Gaub M, Maya F, Vestal B, Swarz H. Physiologic effects of near drowning with chlorinated fresh water, distilled water and isotonic saline. *Anesthesiology* 1966;27(1):33-41.



- (92) Fleetham JA, Munt PW. Near-drowning in Canadian waters. *Can Med Assoc J* 1978 Apr 22;118(8):914-917.
- (93) Lawler W. Bodies recovered from water: a personal approach and consideration of difficulties. *J Clin Pathol* 1992 Aug;45(8):654-659.
- (94) Giammona ST, Modell JH. Drowning by total immersion: effects on pulmonary surfactant of distilled water, isotonic saline, and sea water. *American Journal of Diseases of Children* 1967;114(6):612-616.
- (95) Modell JH, Graves SA, Ketover A. Clinical course of 91 consecutive near-drowning victims. *Chest* 1976;70(2):231-238.
- (96) Sibón Olano A. Síndrome de Asfixia Sumersión. *Cuadernos de Medicina Forense* 2006(45-46):262-263.
- (97) Orłowski JP, Szpilman D. Drowning: rescue, resuscitation, and reanimation. *Pediatr Clin North Am* 2001;48(3):627-646.
- (98) Fuller RH. The clinical pathology of human near-drowning. *J R Soc Med* 1963;56(1):33-38.
- (99) Layon AJ, Modell JH. Drowning Update 2009. *The Journal of the American Society of Anesthesiologists* 2009;110(6):1390-1401.
- (100) Oehmichen M, Hennig R, Meissner C. Near-drowning and clinical laboratory changes. *Leg Med* 2008;10(1):1-5.
- (101) Nunn JF. Drowning, *Applied Respiratory Physiology*. 3 ed ed. London: Butterworths; 1987. p. 332-334.
- (102) Bierens JJ, Knape JT, Gelissen HP. Drowning. *Curr Opin Crit Care* 2002 Dec;8(6):578-586.
- (103) Hasibeder WR. Drowning. *Curr Opin Anaesthesiol* 2003 Apr;16(2):139-145.
- (104) Modell JH. Drowning. *N Engl J Med* 1993;328(4):253-256.
- (105) Olshaker JS. Near drowning. *Emerg Med Clin North Am* 1992 May;10(2):339-350.
- (106) Modell JH, Bellefleur M, Davis JH. Drowning without aspiration: is this an appropriate diagnosis? *Journal of Forensic Science* 1999;44(6):1119-1123.
- (107) Moar JJ. Drowning--postmortem appearances and forensic significance. A case report. *S Afr Med J* 1983 Nov 5;64(20):792-795.
- (108) Shaw KN, Briede CA. Submersion injuries: drowning and near-drowning. *Emerg Med Clin North Am* 1989 May;7(2):355-370.



- (109) Lunetta P, Modell JH. Macroscopical, microscopical, and laboratory findings in drowning victims. *Forensic pathology reviews: Springer*; 2005. p. 3-77.
- (110) Shkrum MJ, Ramsay DA. *Forensic pathology of trauma. : Springer Science & Business Media*; 2007.
- (111) Keatinge W, Hayward M. Sudden death in cold water and ventricular arrhythmia. *Journal of Forensic Science* 1981;26(3):459-461.
- (112) Steinman AM. Cardiopulmonary resuscitation and hypothermia. *Circulation* 1986 Dec;74(6 Pt 2):IV29-32.
- (113) Ackerman, Michael J; Tester, David J; Porter, Co-Burn J. Swimming, a gene-specific arrhythmogenic trigger for inherited long QT syndrome. *Mayo Clinic Proceedings: Elsevier*; 1999.
- (114) Lunetta P, Levo A, Laitinen PJ, Fodstad H, Kontula K, Sajantila A. Molecular screening of selected long QT syndrome (LQTS) mutations in 165 consecutive bodies found in water. *Int J Legal Med* 2003;117(2):115-117.
- (115) Hinojal Fonseca R, Martínez JJ. La sumersión: estudio doctrinal. *Revista Española de Medicina Legal* 48-49: 72-86. *Rev Esp Med Leg* 1986;48-49:72-86.
- (116) Romero Palanco J, Gamero Lucas J. El suicidio consumado en el Partido Judicial de Huelva. *Cuadernos de Medicina Forense* 2005(39):5-9.
- (117) Hernández-Cueto C, Vieira D, Girela E, Marques E, Villanueva E, Sá FO. Diagnostic ability of D-dimer in the establishment of the vitality of wounds. *Forensic Sci Int* 1995;76(2):141-149.
- (118) Gowda BC, Sivapathasundharam B, Chatterji A, Chatterji BL. Histological appearance of postmortem pink teeth: Report of two cases. *J Forensic Dent Sci* 2015 May-Aug;7(2):168-170.
- (119) Pessoa Soriano E, Diniz de Carvalho, Marcus Vitor, Dos Santos F, Mendoza Cd, Dantas de Araújo, Maria-do Socorro, Inojosa-Carneiro Campello R. The post-mortem pink teeth phenomenon: A case report. *Med.oral patol.oral cir.bucal (Internet)* 2009:337-339.
- (120) Carter N, Ali F, Green M. Problems in the interpretation of hemorrhage into neck musculature in cases of drowning. *The American journal of forensic medicine and pathology* 1998;19(3):223-225.
- (121) Püschel K, Schulz F, Darrmann I, Tsokos M. Macromorphology and histology of intramuscular hemorrhages in cases of drowning. *Int J Legal Med* 1999;112(2):101-106.
- (122) Bonnet EFP. *Medicina Legal. 2ª edición. ed. Buenos Aires.: López Librero editores.; 1998.*



- (123) Copeland AR. An assessment of lung weights in drowning cases: The Metro Dade County experience from 1978 to 1982. *The American journal of forensic medicine and pathology* 1985;6(4):301-304.
- (124) De La Grandmaison GL, Leterreux M, Lasseuguette 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.
- (125) Hadley JA, Fowler DR. Erratum to “Organ weight effects of drowning and asphyxiation on the lungs, liver, brain, heart, kidneys, and spleen”[*Forensic Sci. Int.* 133 (2003) 190–196]. *Forensic Sci Int* 2003;137(2):239-246.
- (126) Somers GR, Chiasson DA, Smith CR. Pediatric drowning: a 20-year review of autopsied cases: II. Pathologic features. *Am J Forensic Med Pathol* 2006 Mar;27(1):20-24.
- (127) Gordon I, Sapiro HA, Berson SD. *Forensic Medicine. A Guide to Principles.* 3ª edición ed. Edimburgo: Churchill Livingstone.; 1988.
- (128) Zátoková L, Hejna P, Janík M. Hemolytic staining of the endocardium of the left heart chambers: a new sign for autopsy diagnosis of freshwater drowning. *Forensic science, medicine, and pathology* 2015;11(1):65-68.
- (129) Chiodi V, Gilli R, Puccini C, Portigliatti-Barbos M, Fallani M, De Bernardi A. *Manuale di Medicina Legale.* Dr. F. Vallardi: Milano, 1978.
- (130) Reh H. *Diagnostik des Ertrinkungstodes und Bestimmung der Wasserzeit.* M Triltsch Verlag. Düsseldorf. 1970.
- (131) Haffner HT, Graw M, Erdelkamp J. Spleen findings in drowning. *Forensic Sci Int* 1994;66(2):95-104.
- (132) Knight B, Saukko P. Immersion Deaths. In: Arnold E, editor. *Forensic Pathology.* 3ª edición ed. London: Hodder Arnold; 2004. p. 395-411.
- (133) De Bernardi A, Marras G, Turletti M, Lubinu F, Sini M. *Elementi di patologia medico legale.* Roma 1981.
- (134) 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(3):121-124.
- (135) Hotmar P. Nachweis von Flüssigkeit in den Nasennebenhöhlen als mögliches diagnostisches Zeichen des Ertrinkungstodes. *Arch. Criminol.* 1996; 198: 89-94.
- (136) Bohnert M, Ropohl D, Pollak S. Zur rechtsmedizinischen Bedeutung des Flüssigkeitsgehaltes in den Keilbeinhöhlen. *Arch Kriminol* 2002;209(5/6):158-164.



- (137) Živković V, Babić D, Nikolić S. Svechnikov's sign as an indicator of drowning in immersed bodies changed by decomposition: an autopsy study. *Forensic science, medicine, and pathology* 2013;9(2):177-183.
- (138) Levy AD, Harcke HT, Getz JM, Mallak CT, Caruso JL, Pearse L, et al. Virtual Autopsy: Two-and Three-dimensional Multidetector CT Findings in Drowning with Autopsy Comparison 1. *Radiology* 2007;243(3):862-868.
- (139) Gresham GA. *Atlas de Medicina Forense. Científico- Médica*: Barcelona, 1977.
- (140) Polson CJ, Gee DJ, Knight B. *The essentials of forensic medicine* (4^a ed.). Pergamon Press: Oxford, 1985.
- (141) Byard RW, Cains GE, Gilbert JD. Is haemolytic staining of the aortic root a sign of fresh water drowning? *Pathology* 2005;37(6):551-552.
- (142) Papadodima S, Athanaselis S, Skliros E, Spiliopoulou C. Forensic investigation of submersion deaths. *Int J Clin Pract* 2010;64(1):75-83.
- (143) Orden JUS/1291/2010, de 13 de mayo, por la que se aprueban las normas para la preparación y remisión de muestras objeto de análisis por el Instituto Nacional de Toxicología y Ciencias Forenses. *Boletín Oficial del Estado*, 19 Mayo 2010, núm. 122, 43476–80.
- (144) Betz P, Beier G, Eisenmenger W. Pulmonary giant cells and traumatic asphyxia. *Int J Legal Med* 1994;106(5):258-261.
- (145) Betz P, Nerlich A, Penning R, Eisenmenger W. Alveolar macrophages and the diagnosis of drowning. *Forensic Sci Int* 1993;62(3):217-224.
- (146) Betz P, Tübel J, Eisenmenger W. Immunohistochemical analysis of markers for different macrophage phenotypes and their use for a forensic wound age estimation. *Int J Legal Med* 1995;107(4):197-200.
- (147) Cazorla FM. Análisis médico forense del peso pulmonar y de otros factores en la muerte por sumersión. *Cuad Med Forense* 2014;20(2-3):85-91.
- (148) Morte Tamayo N, Sibón Olano A, Pérez Cárceles MD. Histopathological findings in drowning. En: Blanco Pampin J, Salguero Villadiego M. *Practical Manual of Forensic Hitopathology*. Nova Science Publishers: New York, 2012.
- (149) Oehmichen M, Pedal I, Hohmann P, Merten A. Diagnostic significance of myofibrillar degeneration of cardiocytes in forensic pathology. *Forensic Sci Int* 1990;48(2):163-173.
- (150) Lunt DW, Rode AG. Pathology of the human heart in Browning. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 1987; 111: 939-942.



- (151) Jansen W. Vital reactions. In: Jansen W, editor. *Forensic Histopathology*. Berlin: Springer-Verlag; 1984. p. 54-141.
- (152) Sakurada M, Asano M, Takahashi M, Kuse A, Morichika M, Nakagawa K, et al. Estimates of exposure to cold before death from immunohistochemical expression patterns of HSP70 in glomerular podocytes. *Int J Legal Med* 2013;127(4):783-790.
- (153) Babin RW, Graves NN, Rose EF. Temporal bone pathology in drowning. *Am J Otolaryngol* 1982;3(3):168-173.
- (154) Kelemen G. Temporal bone findings in cases of salt water drowning. *Annals of Otolaryngology, Rhinology & Laryngology* 1983;92(2):134-136.
- (155) Sigrist T, Germann U. Homicide by asphyxia--yes or no? On the use of muscle histology. *Z Rechtsmed* 1989;102(8):549-557.
- (156) Sigrist T, Schulz F, Koops E. Confusing muscular hemorrhage in a drowned cadaver. A contribution to differentiation between vital and postmortem changes. *Arch Kriminol* 1994 Mar-Apr;193(3-4):90-96.
- (157) 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 Jun;29(2):128-130.
- (158) Pampin JB, Rivero SG, Tamayo NM, Fonseca RH. Gastric mucosa lesions in drowning: its usefulness in forensic pathology. *Leg Med* 2005;7(2):89-95.
- (159) Girela-Lopez E, Ruz-Caracuel I, Beltran C, Jimena I, Leiva-Cepas F, Jimenez-Reina L, et al. Histological Changes in Skeletal Muscle During Death by Drowning: An Experimental Study. *Am J Forensic Med Pathol* 2016 Jun;37(2):118-126.
- (160) Piette MH, Els A. Drowning: still a difficult autopsy diagnosis. *Forensic Sci Int* 2006;163(1):1-9.
- (161) Corin G, Stockis E. Le diagnostic médico-légale de l'asphyxie par submersion. *Ann. Soc. Méd. Légale Belg.* 1909; 20: 14-23.
- (162) Vallejo G, Azparren JE, de León, M Soledad Sánchez, Contardi L, Valverde JL. Pruebas biológicas complementarias en las muertes por sumersión. *Revista Española de Medicina Legal* 2012;38(1):17-27.
- (163) Lunetta P, Penttilä A, Hällfors 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(5):229-237.
- (164) Trezza F, Ravioli J, Navari C. Análisis de marcadores biológicos de sumersión. *La Prensa Médica Argentina* 1996;83:337-343.



- (165) Pollanen M. The diagnostic value of the diatom test for drowning, II. Validity: analysis of diatoms in bone marrow and drowning medium. *Journal of Forensic Science* 1997;42(2):286-290.
- (166) Pollanen MS. Diatoms and homicide. *Forensic Sci Int* 1998;91(1):29-34.
- (167) Funayama M, Mimasaka S, Nata M, Hashiyada M, Yajima Y. Diatom numbers around the continental shelf break. *The American journal of forensic medicine and pathology* 2001;22(3):236-238.
- (168) Tomonaga T. Identification of death by drowning by the disorganization method (diatom method). *Acta Med Nagasaki* 1960;5(2-3):116-125.
- (169) Nanikawa R, Kotoku S. Medicolegal observations on a dead body drawn up from the sea bed, with special reference to ethanol and diatoms. *Forensic Sci* 1974;3:225-232.
- (170) Auer A. Qualitative diatom analysis as a tool to diagnose drowning. *The American journal of forensic medicine and pathology* 1991;12(3):213-218.
- (171) Ludes B, Coste M, Coste M. Diatomées et médecine légale: applications de la recherche des diatomées au diagnostic de la submersion vitale. : Technique et documentation Lavoisier; Editions médicales internationales; 1996.
- (172) Fukui Y, Hata M, Takahashi S, Matsubara K. A new method for detecting diatoms in human organs. *Forensic Sci Int* 1980;16(1):67-74.
- (173) 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(1):61-65.
- (174) Kobayashi M, Yamada Y, Zhang W, Itakura Y, Nagao M, Takatori T. Novel detection of plankton from lung tissue by enzymatic digestion method. *Forensic Sci Int* 1993;60(1-2):81-90.
- (175) Abe S, Suto M, Nakamura H, Gunji H, Hiraiwa K, Suzuki T, et al. A novel PCR method for identifying plankton in cases of death by drowning. *Medicine, science and the law* 2003;43(1):23-30.
- (176) 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(2):459-463.
- (177) 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.
- (178) 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 Sep;32(3):269-274.
- (179) Maidana NI. El test de diatomeas en el diagnóstico de muerte por sumersión. *Acta Nova* 2013;6(1-2):70-81.



- (180) Zhao J, Ma Y, Liu C, Wen J, Hu S, Shi H, et al. A quantitative comparison analysis of diatoms in the lung tissues and the drowning medium as an indicator of drowning. *Journal of forensic and legal medicine* 2016;42:75-78.
- (181) Zhao J, Liu C, Bardeesi ASA, Wu Y, Ma Y, Hu S, et al. The Diagnostic Value of Quantitative Assessment of Diatom Test for Drowning: An Analysis of 128 Water-related Death Cases using Microwave Digestion-Vacuum Filtration-Automated Scanning Electron Microscopy. *J Forensic Sci* 2017.
- (182) Chardez D, Lambert J. Protozoaires ciliés et thanatologie. *Forensic Sci Int* 1985;28(2):83-101.
- (183) 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(1):39-42.
- (184) Jianping Q, Enshou W. A study on the diagnosis of drowning by examination of lung chlorophyll (a) of planktons with a spectrofluorophotometer. *Forensic Sci Int* 1992;53(2):149-155.
- (185) Mishul'skii AM. The use of bacteriological analysis of the blood in the diagnosis of death by drowning. *Sud Med Ekspert* 1990 Jan-Mar;33(1):26-28.
- (186) Lucci A, Cirnelli A. A microbiological test for the diagnosis of death by drowning. *Forensic Sci Int* 2007;168(1):34-36.
- (187) 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(2):236-247.
- (188) 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* 2009;11(2):91-96.
- (189) Kakizaki E, Kozawa S, Tashiro N, Sakai M, Yukawa N. Detection of bacterioplankton in immersed cadavers using selective agar plates. *Leg Med* 2009;11:S350-S353.
- (190) 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.
- (191) 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(1):11-26.



- (192) 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(1):7-13.
- (193) An J, Ishida Y, Kimura A, Kondo T. Forensic application of intrarenal aquaporin-2 expression for differential diagnosis between freshwater and saltwater drowning. *Int J Legal Med* 2010;124(2):99-104.
- (194) An J, 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 Legal Med* 2011;125(1):59-65.
- (195) Kane M, Fukunaga T, Maeda H, Nishi K. The detection of picoplankton 16S rDNA in cases of drowning. *Int J Legal Med* 1996;108(6):323-326.
- (196) Suto M, Abe S, Nakamura H, Suzuki T, Itoh T, Kochi H, et al. Phytoplankton gene detection in drowned rabbits. *Leg Med* 2003;5:S142-S144.
- (197) 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(2):152-156.
- (198) 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(14):2411-2415.
- (199) Ruttly GN, Bradley CJ, Biggs MJ, Hollingbury FE, Hamilton SJ, Malcomson RD, et al. Detection of bacterioplankton using PCR probes as a diagnostic indicator for drowning; the Leicester experience. *Leg Med* 2015;17(5):401-408.
- (200) Luna A. Is postmortem biochemistry really useful? Why is it not widely used in forensic pathology? *Leg Med* 2009;11:S27-S30.
- (201) Carrara M. Untersuchungen über den osmotischen druck und die spezifische elektrische leitfähigkeit des blutes bei der fäulnis. *Vierteljahrsschr Gerichtl Med.* 1902; 24: 236.
- (202) Gettler A. A method for the determination of death by drowning. *J Am Med Assoc* 1921;77(21):1650-1652.
- (203) Moritz AR. Chemical methods for the determination of death by drowning. *Physiol. Rev.* 1944; 24:70-88.
- (204) Freimuth HC, Swann HE. Plasma specific gravity changes in sudden deaths. *Arch. Pathol.* 1955; 59: 214-218.
- (205) Coe JJ. Postmortem chemistry update. Emphasis on forensic application. *Am. J. Forensic Med. Pathol.* 1993; 14: 91-117.



- (206) Maeda H, Zhu B, Ishikawa T, Quan L, Michiue T. Significance of postmortem biochemistry in determining the cause of death. *Leg Med* 2009;11:S46-S49.
- (207) Gisbert Calabuig JA, Villanueva E. Procesos destructores del cadáver. En: Gisbert Calabuig JA. *Medicina Legal y Toxicología*. Masson: Barcelona, 2004.
- (208) 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.
- (209) 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.
- (210) 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.
- (211) 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.
- (212) Lachica E, Villanueva E, Luna A. Comparison of different techniques for the postmortem diagnosis of myocardial infarction. *Forensic Sci. Int.* 1988; 38: 21-26.
- (213) 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.
- (214) 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.
- (215) Piette M, Desmet B, Dams R. Determination of strontium in human whole blood by ICP-AES. *Sci. Total Environ.* 1994; 141: 269-273.
- (216) Piette M. La noyade: Recherches actuelles. *J. Méd. Lég. Droit. Méd.* 1996; 39: 417-420.
- (217) Tournis S, Economopoulos D, Lyritis GP. Strontium ranelate: a novel treatment in postmenopausal osteoporosis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2006; 1092: 403-407.
- (218) Piette M, Timperman J, Parisis N. Serum strontium estimation as a medico-legal diagnostic indicator of drowning. *Med. Sci. Law.* 1989; 29: 162-171.
- (219) 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.



- (220) 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.
- (221) 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.
- (222) Fornes P, Pépin G, Heudes D, Lecomte D. Diagnosis of drowning by combined computer-assisted histomorphometry of lungs with blood strontium determination. *Journal of Forensic Science* 1998;43(4):772-776.
- (223) Pérez-Cárceles M, Sibón A, Del Castillo MG, Vizcaya M, Osuna E, Casas T, et al. Strontium levels in different causes of death: diagnostic efficacy in drowning. *Biol Trace Elem Res* 2008;126(1-3):27-37.
- (224) Azparren J, Perucha E, Martínez P, Muñoz R, Vallejo G. Factors affecting strontium absorption in drownings. *Forensic Sci Int* 2007;168(2):138-142.
- (225) Azparren J, Cubero C, Perucha E, Martínez P, Vallejo G. Comparison between lung weight and blood strontium in bodies found in seawater. *Forensic Sci Int* 2007;168(2):128-132.
- (226) 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.
- (227) Jeanmonod R, Staub CH, Mermillod B. The reliability of cardiac haemodilution as a diagnostic test of drowning. *Forensic Sci. Int.* 1992; 52: 171-180.
- (228) Sturner WQ, Balko A, Sullivan J. Magnesium and other electrolytes in bovine eyeballs immersed in sea water and other fluids. *Forensic Sci* 1976;8:139-150.
- (229) Adjutantis G, Coutselinis A. Changes in magnesium concentration of the vitreous humour of exenterated human eyeballs immersed in sea water. *Forensic Sci* 1974;4:63-65.
- (230) Coutselinis A, Boukis D. The estimation of Mg²⁺ concentration in cerebrospinal fluid (CSF) as a method of drowning diagnosis in sea water. *Forensic Sci* 1976;7(2):109-111.
- (231) Zhu B, Ishida K, Taniguchi M, Quan L, Oritani S, Tsuda K, et al. Possible postmortem serum markers for differentiation between fresh-, saltwater drowning and acute cardiac death: a preliminary investigation. *Leg Med* 2003;5:S298-S301.
- (232) 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 autopsies. *Forensic Sci. Int.* 2005; 155: 18-23.



- (233) Zhu B, Quan L, Li D, Taniguchi M, Kamikodai Y, Tsuda K, et al. Postmortem lung weight in drownings: a comparison with acute asphyxiation and cardiac death. *Leg Med* 2003;5(1):20-26.
- (234) Li D, Quan L, Zhu B, Ishikawa T, Michiue T, Zhao D, et al. Evaluation of postmortem calcium and magnesium levels in the pericardial fluid with regard to the cause of death in medicolegal autopsy. *Leg Med* 2009;11:S276-S278.
- (235) 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.
- (236) 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.
- (237) Pierucci G, Merlano F, Chen Y, Sturini M, Maraschi F, Profumo A. Haematic silicon in drowning. *Journal of forensic and legal medicine* 2016;39:22-26.
- (238) Anderson JV, Millar ND, O'Hare JP, Mackenzie JC, Corral RJ, Bloom SR. Atrial natriuretic peptide: physiological release associated with natriuresis during water immersion in man. *Clin Sci (Lond)* 1986 Sep;71(3):319-322.
- (239) Lorente JA, Hernandez-Cueto C, Villanueva E. Postmortem stability of the rat atrial natriuretic peptide in blood and atrial tissue. *Rev Esp Fisiol* 1989 Jun;45(2):127-130.
- (240) Zhu B, Ishikawa T, Michiue T, Li D, Zhao D, Tanaka S, et al. Postmortem pericardial natriuretic peptides as markers of cardiac function in medico-legal autopsies. *Int J Legal Med* 2007;121(1):28-35.
- (241) Chen J, Michiue T, Ishikawa T, Maeda H. Difference in molecular pathology of natriuretic peptides in the myocardium between acute asphyxial and cardiac deaths. *Leg Med* 2012;14(4):177-182.
- (242) Quan L, Zhu B, Ishida K, Oritani S, Taniguchi M, Fujita M, et al. Intranuclear ubiquitin immunoreactivity of the pigmented neurons of the substantia nigra in fatal acute mechanical asphyxiation and drowning. *Int J Legal Med* 2001;115(1):6-11.
- (243) Pérez-Cárceles M, Del Pozo S, Sibón A, Noguera J, Osuna E, Vizcaya M, et al. Serum biochemical markers in drowning: diagnostic efficacy of Strontium and other trace elements. *Forensic Sci Int* 2012;214(1):159-166.
- (244) Yajima D, Saito H, Sato K, Hayakawa M, Iwase H. Diagnosis of drowning by summation of sodium, potassium and chloride ion levels in pleural effusion: differentiating between freshwater and seawater drowning and application to bathtub deaths. *Forensic Sci Int* 2013;233(1):167-173.



- (245) Deliligka A, Raikos N, Chatzinikolaou F, Venizelos I, Chatzopoulos K, Goulas A. Potential use of pericardial cTnI, Mg 2 and Ca 2 in the forensic investigation of seawater drowning in Greece: An initial assessment. *Leg Med* 2016;23:30-33.
- (246) Vázquez Méndez M. Análisis de elementos traza por ICP-MS en sangre, humor vítreo y agua: su aplicación en el diagnóstico de sumersión. 2017.
- (247) Zilg B, Alkass K, Berg S, Druid H. Interpretation of postmortem vitreous concentrations of sodium and chloride. *Forensic Sci Int* 2016;263:107-113.
- (248) Kawasumi Y, Kawabata T, Sugai Y, Usui A, Hosokai Y, Sato M, et al. Assessment of the relationship between drowning and fluid accumulation in the paranasal sinuses on post-mortem computed tomography. *Eur J Radiol* 2012;81(12):3953-3955.
- (249) Kawasumi Y, Kawabata T, Sugai Y, Usui A, Hosokai Y, Sato M, et al. Diagnosis of drowning using post-mortem computed tomography based on the volume and density of fluid accumulation in the maxillary and sphenoid sinuses. *Eur J Radiol* 2013;82(10):e562-e566.
- (250) Ambrosetti MC, Barbiani C, El-Dalati G, Pellini E, Raniero D, De Salvia A, et al. Virtual autopsy using multislice computed tomography in forensic medical diagnosis of drowning. *Radiol Med* 2013 Jun;118(4):679-687.
- (251) Filograna L, Tartaglione T, Vetrugno G, Guerra C, Fileni A, Bonomo L. Freshwater drowning in a child: A case study demonstrating the role of post-mortem computed tomography. *Medicine, Science and the Law* 2015;55(4):304-311.
- (252) Astrid J, Van Hoyweghen L, Jacobs W, De Beeck BO, Parizel PM. Can post-mortem CT reliably distinguish between drowning and non-drowning asphyxiation? *Int J Legal Med* 2015;129(1):159.
- (253) Ruddy GN, Johnson C, Amoroso J, Robinson C, Bradley CJ, Morgan B. Post-mortem computed tomography coaxial cutting needle biopsy to facilitate the detection of bacterioplankton using PCR probes as a diagnostic indicator for drowning. *Int J Legal Med* 2017 Jan;131(1):211-216.
- (254) Reiter C. Zum Nachweis des Ertrinkungstodes mittels ins Herzblut eingeschwemmter Raucherzellen. *Int J Legal Med* 1984;93(2):79-88.
- (255) Lorente J, Lorente M, Villanueva E. Postmortem stability of lung surfactant phospholipids. *Journal of Forensic Science* 1992;37(5):1341-1345.
- (256) Lorente J, Hernandez-Cueto C, Villanueva E, Luna J. The usefulness of lung surfactant phospholipids (LSPs) in the diagnosis of drowning. *Journal of Forensic Science* 1990;35(6):1367-1372.
- (257) 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(1):51-63.



- (258) Zhu B, 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. *Forensic Sci Int* 2000;113(1):193-197.
- (259) Zhu B, Ishida K, Quan L, Li D, Taniguchi M, Fujita MQ, et al. Pulmonary immunohistochemistry and serum levels of a surfactant-associated protein A in fatal drowning. *Leg Med* 2002;4(1):1-6.
- (260) Stemberga V, Stifter S, Cuculić D, Čoklo M, Bosnar A. Immunohistochemical surfactant protein-A expression: Fatal drowning vs. postmortem immersion. *Med Hypotheses* 2009;72(4):413-415.
- (261) Quan L, Zhu B, Ishikawa T, Michiue T, Zhao D, Yoshida C, et al. Postmortem serum levels of pulmonary surfactant-associated proteins A and D with regard to the cause of death in medicolegal autopsy. *Leg Med* 2009;11:S301-S303.
- (262) 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.
- (263) Hernández ÁSM, San Miguel R, Martín-Gil FJ. Importancia de las aplicaciones clínicas de la proteómica. *Revista del Laboratorio Clínico* 2010;3(1):40-48.
- (264) Wilkins MR, Sanchez J, Gooley AA, Appel RD, Humphery-Smith I, Hochstrasser DF, et al. Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. *Biotechnology and genetic engineering reviews* 1996;13(1):19-50.
- (265) Martín RDD, Camacho-Martínez Z, Hernández JRA, Valencia-Caballero L. Proteomics as a new tool in forensic sciences. *Spanish Journal of Legal Medicine* 2019;45(3):114-122.
- (266) Madea B, Saukko P, Oliva A, Musshoff F. Molecular pathology in forensic medicine—introduction. *Forensic Sci Int* 2010;203(1-3):3-14.
- (267) Choi K, Zissler A, Kim E, Ehrenfellner B, Cho E, Lee S, et al. Postmortem proteomics to discover biomarkers for forensic PMI estimation. *Int J Legal Med* 2019;133(3):899-908.
- (268) Aquila I, Sacco MA, Gratteri S, Raffaele R, Ricci P. The Forensic Application Of Proteomics For The Study Of The Time Of Death: An Operative Experimental Model For PMI Estimation. *Journal of Integrated OMICS* 2018;8(3):56-59.
- (269) Crecelius A, Götz A, Arzberger T, Fröhlich T, Arnold GJ, Ferrer I, et al. Assessing quantitative post-mortem changes in the gray matter of the human frontal cortex proteome by 2-D DIGE. *Proteomics* 2008;8(6):1276-1291.



- (270) Campell ZK, Kwon I, Finley SJ, Lee Y, Javan GT. Talin: A potential protein biomarker in postmortem investigations. *Journal of forensic and legal medicine* 2016;44:188-191.
- (271) McCall JD, Sternard BT. Drowning. StatPearls Treasure Island (FL): StatPearls Publishing LLC; 2020.
- (272) O'Connor PJ, O'Connor N. Work-related maritime fatalities. *Accident Analysis & Prevention* 2006;38(4):737-741.
- (273) Diaz JH. Global climate changes, natural disasters, and travel health risks. *Journal of travel medicine* 2006;13(6):361-372.
- (274) Prasarthitha T, Tungsiripat R, Warachit P. The revisit of 2004 tsunami in Thailand: characteristics of wounds. *International wound journal* 2008;5(1):8-19.
- (275) Yajima D, Inokuchi G, Makino Y, Motomura A, Chiba F, Torimitsu S, et al. Diagnosis of drowning by summation of sodium, potassium, and chloride ion levels in sphenoidal sinus fluid: Differentiating between freshwater and seawater drowning and its application to brackish water and bathtub deaths. *Forensic Sci Int* 2018;284:219-225.
- (276) Barranco R, Castiglioni C, Ventura F, Fracasso T. A comparative digital morphometric study of lung tissue in saltwater and freshwater drowning. *Forensic Sci Int* 2019;298:157-160.
- (277) Barranco R, Ventura F, Fracasso T. Immunohistochemical renal expression of aquaporin 2, arginine-vasopressin, vasopressin receptor 2, and renin in saltwater drowning and freshwater drowning. *Int J Legal Med* 2020.
- (278) Barranco R, Castiglioni C, Ventura F, Fracasso T. Immunohistochemical expression of P-selectin, SP-A, HSP70, aquaporin 5, and fibronectin in saltwater drowning and freshwater drowning. *Int J Legal Med* 2019;133(5):1461-1467.
- (279) Han LJ, Xu HM, Chen L. Proteomics and Its Application in Forensic Pathology. *Fa Yi Xue Za Zhi* 2019 Feb;35(1):78-83.
- (280) Procopio N, Williams A, Chamberlain AT, Buckley M. Forensic proteomics for the evaluation of the post-mortem decay in bones. *Journal of proteomics* 2018;177:21-30.
- (281) Prieto-Bonete G, Pérez-Cárceles MD, Maurandi-López A, Pérez-Martínez C, Luna A. Association between protein profile and postmortem interval in human bone remains. *Journal of proteomics* 2019;192:54-63.
- (282) Gagajewski A, Murakami MM, Kloss J, Edstrom M, Hillyer M, Peterson GF, et al. Measurement of chemical analytes in vitreous humor: stability and precision studies. *Journal of Forensic Science* 2004;49(2):1-4.



- (283) Mulla A, Massey KL, Kalra J. Vitreous humor biochemical constituents: evaluation of between-eye differences. *The American journal of forensic medicine and pathology* 2005;26(2):146-149.
- (284) Thierauf A, Musshoff F, Madea B. Post-mortem biochemical investigations of vitreous humor. *Forensic Sci Int* 2009;192(1-3):78-82.
- (285) Vazquez M, Ibarra I, Sibon A, Perez-Carceles M. Multi-element Analysis of Vitreous Humor Samples by ICP-MS and ICP-OES. *Atomic Spectroscopy* 2017;38(5):124-132.
- (286) Kay R, Barton C, Ratcliffe L, Matharoo-Ball B, Brown P, Roberts J, et al. Enrichment of low molecular weight serum proteins using acetonitrile precipitation for mass spectrometry based proteomic analysis. *Rapid Communications in Mass Spectrometry: An International Journal Devoted to the Rapid Dissemination of Up-to-the-Minute Research in Mass Spectrometry* 2008;22(20):3255-3260.
- (287) Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;227(5259):680-685.
- (288) Shevchenko A, Tomas H, Havli J, Olsen JV, Mann M. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nature protocols* 2006;1(6):2856-2860.
- (289) Nesvizhskii AI, Keller A, Kolker E, Aebersold R. A statistical model for identifying proteins by tandem mass spectrometry. *Anal Chem* 2003;75(17):4646-4658.
- (290) Sharma V, Kumar R, Devgan K, Mishra PK, Ekielski A, Kumar V, et al. Multivariate analysis for forensic characterization, discrimination, and classification of marker pen inks. *Spectroscopy Letters* 2018;51(5):205-215.
- (291) Team, RC. R: A Language and Environment for Statistical Computing, R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2014 URL <https://www.R-project.org/>.
- (292) Lê S, Josse J, Husson F. FactoMineR: an R package for multivariate analysis. *Journal of statistical software* 2008;25(1):1-18.
- (293) Husson F, Lê S, Pagès J. *Exploratory multivariate analysis by example using R.* CRC press; 2017.
- (294) Abdi H, Williams LJ. *Principal component analysis.* Wiley interdisciplinary reviews: computational statistics 2010;2(4):433-459.
- (295) Chandrakanth H, Kanchan T, Balaraj B, Virupaksha H, Chandrashekar T. Postmortem vitreous chemistry—an evaluation of sodium, potassium and chloride levels in estimation of time since death (during the first 36 h after death). *Journal of forensic and legal medicine* 2013;20(4):211-216.



- (296) Tanaka N, Kinoshita H, Jamal M, Takakura A, Kumihashi M, Miyatake N, et al. Detection of chlorine and bromine in free liquid from the sphenoid sinus as an indicator of seawater drowning. *Leg Med* 2015;17(5):299-303.
- (297) Byard RW, Summersides G. Vitreous humor sodium levels in immersion deaths. *J Forensic Sci* 2011 May;56(3):643-644.
- (298) Ingham AI, Byard RW. The potential significance of elevated vitreous sodium levels at autopsy. *Journal of forensic and legal medicine* 2009;16(8):437-440.
- (299) Garland J, Tse R, Oldmeadow C, Attia J, Anne S, Cala A. Elevation of post mortem vitreous humour sodium and chloride levels can be used as a reliable test in cases of suspected salt water drowning when the immersion times are less than one hour. *Forensic Sci Int* 2016;266:338-342.
- (300) Tse R, Kuo T, Kesha K, Garland J, Garland S, Anne S, et al. Postmortem vitreous humor magnesium does not elevate in salt water drowning when the immersion time is less than an hour. *The American Journal of Forensic Medicine and Pathology* 2017;38(4):298-303.
- (301) Belsey S, Flanagan R. Postmortem biochemistry: current applications. *Journal of forensic and legal medicine* 2016;41:49-57.
- (302) Hernández-Romero D, Sánchez-Rodríguez E, Osuna E, Sibón A, Martínez-Villanueva M, Noguera-Velasco JA, et al. Proteomics in Deaths by Drowning: Diagnostic Efficacy of Apolipoprotein A1 and α -1Antitrypsin, Pilot Study. *Diagnostics* 2020;10(10):747.
- (303) Wortham M, Benthuyssen JR, Wallace M, Savas JN, Mulas F, Divakaruni AS, et al. Integrated in vivo quantitative proteomics and nutrient tracing reveals age-related metabolic rewiring of pancreatic β cell function. *Cell reports* 2018;25(10):2904-2918. e8.
- (304) Gianazza E, Miller I, Guerrini U, Palazzolo L, Parravicini C, Eberini I. Gender proteomics I. Which proteins in non-sexual organs. *Journal of proteomics* 2018;178:7-17.
- (305) Gregorakos L, Markou N, Psalida V, Kanakaki M, Alexopoulou A, Sotiriou E, et al. Near-drowning: clinical course of lung injury in adults. *Lung* 2009;187(2):93-97.
- (306) Leman LJ, Maryanoff BE, Ghadiri MR. Molecules that mimic apolipoprotein A-I: potential agents for treating atherosclerosis. *J Med Chem* 2014 Mar 27;57(6):2169-2196.
- (307) Borna H, Hosseini Qale Noe, Seyed Hojjat, Harchegani AB, Talatappe NR, Ghatrehsamani M, Ghanei M, et al. A review on proteomics analysis to reveal biological pathways and predictive proteins in sulfur mustard exposed patients: roles of inflammation and oxidative stress. *Inhal Toxicol* 2019;31(1):3-11.
- (308) Gauthier M, Ray A, Wenzel SE. Evolving concepts of asthma. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2015;192(6):660-668.



- (309) Yao X, Gordon EM, Figueroa DM, Barochia AV, Levine SJ. Emerging roles of apolipoprotein E and apolipoprotein AI in the pathogenesis and treatment of lung disease. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 2016;55(2):159-169.
- (310) Tiniakou I, Drakos E, Sinatkas V, Van Eck M, Zannis VI, Boumpas D, et al. High-density lipoprotein attenuates Th1 and th17 autoimmune responses by modulating dendritic cell maturation and function. *J Immunol* 2015 May 15;194(10):4676-4687.
- (311) De Serres F, Blanco I. Role of alpha-1 antitrypsin in human health and disease. *J Intern Med* 2014;276(4):311-335.
- (312) Lewis EC, Shapiro L, Bowers OJ, Dinarello CA. Alpha1-antitrypsin monotherapy prolongs islet allograft survival in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005 Aug 23;102(34):12153-12158.
- (313) Eden E, Holbrook J, Brantly M, Turino G, Wise R. Prevalence of alpha-1 antitrypsin deficiency in poorly controlled asthma—results from the ALA-ACRC low-dose theophylline trial. *Journal of Asthma* 2007;44(8):605-608.
- (314) Blanco I, Lara B, De Serres F. Efficacy of alpha1-antitrypsin augmentation therapy in conditions other than pulmonary emphysema. *Orphanet journal of rare diseases* 2011;6(1):1-11.
- (315) Clément R, Redpath M, Sauvageau A. Mechanism of death in hanging: a historical review of the evolution of pathophysiological hypotheses. *J Forensic Sci* 2010;55(5):1268-1271.
- (316) Orłowski JP, Abulleil MM, Phillips JM. The hemodynamic and cardiovascular effects of near-drowning in hypotonic, isotonic, or hypertonic solutions. *Ann Emerg Med* 1989;18(10):1044-1049.
- (317) Szpilman D. Near-drowning and drowning classification: a proposal to stratify mortality based on the analysis of 1,831 cases. *Chest* 1997;112(3):660-665.
- (318) Bierens JJ, Lunetta P, Tipton M, Warner DS. Physiology of drowning: a review. *Physiology* 2016.
- (319) Santurro A, Maria Vullo A, Borro M, Gentile G, La Russa R, Simmaco M, et al. Personalized medicine applied to forensic sciences: new advances and perspectives for a tailored forensic approach. *Curr Pharm Biotechnol* 2017;18(3):263-273.
- (320) Tavichakorntrakool R, Prasongwattana V, Sriboonlue P, Puapairoj A, Pongskul J, Khuntikeo N, et al. Serial analyses of postmortem changes in human skeletal muscle: A case study of alterations in proteome profile, histology, electrolyte contents, water composition, and enzyme activity. *Proteomics—Clinical Applications* 2008;2(9):1255-1264.



(321) Mizukami H, Hathway B, Procopio N. Aquatic Decomposition of Mammalian Corpses: A Forensic Proteomic Approach. *Journal of Proteome Research* 2020;19(5):2122-2135.

(322) Alkass K, Buchholz BA, Ohtani S, Yamamoto T, Druid H, Spalding KL. Age estimation in forensic sciences: application of combined aspartic acid racemization and radiocarbon analysis. *Mol Cell Proteomics* 2010 May;9(5):1022-1030.

(323) Hunt NJ, Phillips L, Waters KA, Machaalani R. Proteomic MALDI-TOF/TOF-IMS examination of peptide expression in the formalin fixed brainstem and changes in sudden infant death syndrome infants. *Journal of proteomics* 2016;138:48-60.

(324) Kakimoto Y, Ito S, Abiru H, Kotani H, Ozeki M, Tamaki K, et al. Sorbin and SH 3 Domain-Containing Protein 2 Is Released From Infarcted Heart in the Very Early Phase: Proteomic Analysis of Cardiac Tissues From Patients. *Journal of the American Heart Association* 2013;2(6):e000565.

