



# UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE CARTAGENA

*Tesis Doctoral*

## ANÁLISIS DE ELEMENTOS TRAZA POR ICP-MS EN SANGRE, HUMOR VÍTREO Y AGUA: SU APLICACIÓN EN EL DIAGNÓSTICO DE SUMERSIÓN

**Magdalena Vázquez Méndez**

**Directores:**

Dra. M<sup>a</sup> Dolores Pérez Cárceles

Dr. Isidro Ibarra Berrocal

**Cartagena 2017**



*“La vida no es un problema  
que tiene que ser resuelto,  
sino una realidad  
que debe ser experimentada.”*

Soren Kierkegaard



## **Agradecimientos**

En primer lugar, mi agradecimiento a la profesora M<sup>a</sup> Dolores Pérez Cárceles por dirigir y coordinar este trabajo. He tenido mucha suerte de poder aprender de tus conocimientos, de tu perseverancia y de tu paciencia infinita.

A Isidro Ibarra, co-director de esta tesis por facilitarme las tareas y ayudarme a salvar los obstáculos que han aparecido.

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

A mis compañeros del Servicio de Apoyo a la Instrumentación Tecnológica de la Universidad Politécnica de Cartagena, Alberto, M<sup>a</sup> José, Ana Belén, Ana Vanesa, Vicente, Juan, Ana, gracias por crear tan buen ambiente de trabajo y por hacerme fácil el día a día y a Lola por orientarme y ayudarme con los formatos y la impresión.

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

A Lucía y Ana por el estímulo y la fuerza que me habéis dado para hacer este trabajo y me dais siempre.

A Andrés, gracias por tu generosidad y por apoyarme incondicionalmente en este proyecto y en todos.



# ÍNDICE

<b>Resumen.....</b>	<b>1</b>
<b>Summary.....</b>	<b>3</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>7</b>
1.1. Asfixias .....	9
1.1.1. Concepto.....	9
1.1.2. Fisiología del oxígeno y CO <sub>2</sub> en sangre y respiración .....	9
1.1.3. Clasificación de las asfixias.....	13
1.2. Sumersión.....	14
1.2.1. Concepto de Muerte por Sumersión .....	14
1.2.2. Importancia del estudio de la Sumersión .....	17
1.2.3. Epidemiología de las muertes por sumersión .....	21
1.2.4. Etiología Médico-Legal.....	28
1.2.5. Fisiopatología y mecanismos de muerte.....	30
1.2.6. Exámenes biológicos y tanatoquímicos .....	44
1.2.7. Fluidos biológicos. Especial importancia del humor vítreo .....	90
1.2.8. Data de la sumersión.....	96
<b>2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.....</b>	<b>101</b>
<b>3. MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>107</b>
3.1. Casos de autopsias forenses .....	109
3.2. Muestras .....	109
3.3. Recogida de muestras.....	112
3.4. Análisis químico .....	113
3.4.1. Preparación de muestras.....	114
3.4.2. Digestión por microondas.....	114
3.4.3. Plasma de acoplamiento inductivo con espectrometría de masas (ICP-MS).....	117
3.4.4. Análisis de materiales de referencia por ICP-MS.....	121
3.5. Análisis de materiales de referencia por ICP-OES .....	122
3.5.1. Plasma de acoplamiento inductivo con espectrometría óptica (ICP-OES).....	122
3.6. Análisis Estadístico .....	126
3.6.1. Análisis descriptivo de los datos.....	126
3.6.2. Análisis de comparación de medias .....	127
3.6.3. Análisis de correlación.....	127

3.6.4. Curvas ROC (“Receiver Operating Characteristic”: Curva de característica operativa para el receptor) .....	128
3.6.5. Análisis discriminante .....	129
3.6.6. Análisis de componentes principales .....	130
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>131</b>
4.1. Análisis comparativo de técnicas instrumentales .....	133
4.1.1. Resultados del análisis de los materiales de referencia por ICP-MS .....	133
4.1.2. Resultados del análisis de los materiales de referencia por ICP-OES .....	136
4.1.3. Comparación de las técnicas ICP-MS e ICP-OES con el análisis de muestras de humor vítreo. ....	139
4.2. Análisis descriptivo de las muestras y de las diferencias según sexo, edad e intervalo post-mortem .....	142
4.3. Análisis de las concentraciones de los elementos químicos en muestras de sangre.....	143
4.4. Análisis de las diferencias en las concentraciones de los elementos químicos entre los casos de muerte por sumersión en agua salada, sumersión en agua dulce y no sumersión.....	157
4.5. Análisis de agrupaciones y relaciones en los tres grupos diagnósticos y todos los elementos químicos analizados.....	161
4.6. Análisis de concentraciones y diferencias de los elementos químicos en el medio de sumersión y de correlación entre los elementos químicos en sangre y en el medio de sumersión. ....	164
4.7. Análisis de las diferencias en las concentraciones de los elementos químicos entre los casos de muerte por sumersión en agua salada, agua dulce y no sumersión mediante las curvas ROC y el Análisis discriminante.....	167
4.8. Análisis descriptivo de las muestras de humor vítreo. ....	173
4.9. Análisis de las diferencias en las concentraciones de los elementos químicos en humor vítreo, entre los casos de muerte por sumersión en agua salada, sumersión en agua dulce y no sumersión .....	178
4.10. Análisis de ratios entre la concentración de los elementos en agua de mar y humor vítreo y de ratios entre la concentración de elementos en agua de mar y sangre.....	179



4.11.	Análisis de las diferencias en las concentraciones de los elementos químicos en humor vítreo entre los casos de muerte por sumersión en agua salada y no sumersión mediante las curvas ROC y el Análisis discriminante.....	183
4.12.	Análisis de correlación entre elementos químicos en humor vítreo y sangre .....	188
4.13.	Análisis de correlación de los elementos en sangre y humor vítreo con el intervalo postmortem y la edad de los sujetos.....	190
<b>5.</b>	<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>191</b>
<b>6.</b>	<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>219</b>
<b>7.</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>225</b>



## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b>	Composición de la atmósfera y presión de los gases.....	10
<b>Tabla 2.</b>	Muertes por sumersión distribuidas por sexo y región (WHO, GBD 2000).....	21
<b>Tabla 3.</b>	Fallecidos en medio acuático en España, junio a agosto 2013. Distribución por edad.....	26
<b>Tabla 4.</b>	Fallecidos en medio acuático en España, junio a agosto 2013. Distribución por espacio acuático.....	27
<b>Tabla 5.</b>	Fallecidos en medio acuático en España, junio a agosto 2013. Distribución por Comunidades Autónomas.....	27
<b>Tabla 6.</b>	Marcadores bioquímicos utilizados en Medicina forense.....	64
<b>Tabla 7.</b>	Concentraciones de referencia normales, habituales o terapéuticas, en sangre total, suero o plasma y orina humanas de los elementos químicos.	73
<b>Tabla 8.</b>	Ratios entre las concentraciones de los elementos más abundantes en agua marina y sangre humana (Azparren et al., 2000).....	74
<b>Tabla 9.</b>	Valores límites de estroncio para el estudio de la causa de la muerte en cadáveres encontrados en agua de mar. Azparren-Contardi.....	81
<b>Tabla 10.</b>	Resumen de la utilidad de los diferentes fluidos disponibles para el análisis bioquímico en el cadáver.....	92
<b>Tabla 11.</b>	Distribución de los casos por grupos diagnóstico.....	109
<b>Tabla 12.</b>	Distribución de las muestras por grupos diagnósticos.....	110
<b>Tabla 13.</b>	Programa de microondas.....	116
<b>Tabla 14.</b>	ICP-MS. Condiciones instrumentales.....	118
<b>Tabla 15.</b>	Isótopos monitorizados, estándares internos, rangos de medida, IDLs y BEC.....	120
<b>Tabla 16.</b>	ICP-OES. Condiciones instrumentales.....	123
<b>Tabla 17.</b>	Longitudes de onda analíticas (nm). Límites de detección (LOD) y límites de cuantificación (LOQ).....	125
<b>Tabla 18.</b>	Valores obtenidos y certificados de la concentración de los elementos en Seronorm Trace Elements Whole Blood L-1.....	133

<b>Tabla 19.</b>	Valores obtenidos y certificados de la concentración de los elementos en Seronorm Trace Elements Serum L-2.....	134
<b>Tabla 20.</b>	Resultados de los análisis de ICP-OES. Valores certificados y obtenidos de las concentraciones elementales en Seronorm Trace Elements Whole Blood L-1.....	137
<b>Tabla 21.</b>	Resultados de los análisis de ICP-OES. Valores certificados y obtenidos de las concentraciones elementales en Seronorm Trace Elements Serum L-2.....	138
<b>Tabla 22.</b>	Resultados de los análisis de ICP-MS de muestras de humor vítreo.....	139
<b>Tabla 23.</b>	Resultados de los análisis de ICP-OES de las muestras de humor vítreo...	140
<b>Tabla 24.</b>	Análisis de regresión lineal de los resultados con ICP-MS vs. ICP-OES en muestras de humor vítreo.....	140
<b>Tabla 25.</b>	Distribución de los casos por grupo diagnóstico, sexo, edad e intervalo post-mortem.....	142
<b>Tabla 26.</b>	Sumersión en agua salada. Sangre periférica, sangre ventrículo izquierdo, sangre ventrículo derecho.....	145
<b>Tabla 27.</b>	Sumersión en agua dulce. Sangre periférica, sangre ventrículo izquierdo , sangre ventrículo derecho.....	149
<b>Tabla 28.</b>	No Sumersión. Sangre periférica, sangre ventrículo izquierdo, sangre ventrículo derecho.....	153
<b>Tabla 29.</b>	Test Kruskal Wallis. Diferencias estadísticas en sangre en sumersión en agua salada, sumersión en agua dulce y no sumersión.....	158
<b>Tabla 30.</b>	Test de Mann-Whitney. Diferencias estadísticas in sangre en sumersión en agua salada, sumersión en agua dulce y no sumersión.....	158
<b>Tabla 31.</b>	Media, mediana, desviación estándar, mínimo, máximo y rango de los marcadores bioquímicos en el medio de sumersión, agua de mar y agua dulce. Diferencias significativas entre agua de mar y agua dulce.....	165
<b>Tabla 32.</b>	Correlaciones entre diferentes variables en agua de sumersión y sangre de las tres localizaciones en los casos de sumersión.....	167
<b>Tabla 33.</b>	Áreas bajo las curvas ROC de los elementos químicos en los casos de sumersión, error estándar, probabilidad y límites superiores e inferiores de las áreas.....	168

<b>Tabla 34.</b>	Áreas bajo las curvas ROC de los elementos químicos en los casos de sumersión en agua salada, error estándar, probabilidad y límites superiores e inferiores de las áreas.....	169
<b>Tabla 35.</b>	Áreas bajo las curvas ROC de los elementos químicos en los casos de sumersión en agua dulce, error estándar, probabilidad y límites superiores e inferiores de las áreas.....	170
<b>Tabla 36.</b>	Análisis discriminante usando los elementos químicos en sumersión.....	171
<b>Tabla 37.</b>	Análisis discriminante usando los elementos químicos en sumersión en agua salada.....	172
<b>Tabla 38.</b>	Media, mediana, desviación estándar, mínimo, máximo y rango de los marcadores químicos en humor vítreo en los casos de sumersión en agua salada, sumersión en agua dulce y no sumersión.....	174
<b>Tabla 39.</b>	Test Kruskal Wallis y Test de Mann-Whitney. Diferencias estadísticas en humor vítreo en sumersión en agua salada, en agua dulce y no sumersión	178
<b>Tabla 40.</b>	Ratio de las concentraciones de los elementos entre agua de mar y humor vítreo y entre agua de mar y sangre periférica, sangre de ventrículo izquierdo y de ventrículo derecho.....	180
<b>Tabla 41.</b>	Áreas bajo las curvas ROC de los elementos químicos en los casos de sumersión, error estándar, probabilidad y límites superior e inferiores del área.....	184
<b>Tabla 42.</b>	Áreas bajo las curvas ROC de los elementos químicos en los casos de sumersión en agua salada, error estándar, probabilidad y límites superior e inferiores del área.....	185
<b>Tabla 43.</b>	Análisis discriminante usando los elementos químicos en sumersión.....	186
<b>Tabla 44.</b>	Análisis discriminante usando los elementos químicos en sumersión en agua salada.....	187
<b>Tabla 45.</b>	Correlaciones estadísticamente significativas entre las concentraciones de elementos químicos en sangre y humor vítreo en todos los casos de muerte.....	188
<b>Tabla 46.</b>	Correlaciones estadísticamente significativas entre las concentraciones de elementos químicos en sangre y humor vítreo en los casos de muerte por sumersión.....	189
<b>Tabla 47.</b>	Valor asignado a los parámetros analizados en muestras de sangre.....	209

<b>Tabla 48.</b>	Valoración final de los elementos analizados en las muestras de sangre...	210
<b>Tabla 49.</b>	Valor asignado a los parámetros analizados en muestras de humor vítreo.....	211
<b>Tabla 50.</b>	Valoración final de los elementos analizados en las muestras de humor vítreo.....	212

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b>	Intercambio gaseoso en el cuerpo humano.....	11
<b>Figura 2.</b>	Ahogados en España 2006-2011 (INE) .....	25
<b>Figura 3.</b>	Esquema de Ponsold, fases de la sumersión-asfixia.....	36
<b>Figura 4.</b>	Esquema de A. Sibón. Fisiopatología de la asfixia por sumersión.....	39
<b>Figura 5.</b>	Esquema de Knight. Fisiopatología sumersión en agua dulce.....	41
<b>Figura 6.</b>	Fisiopatología sumersión en agua salada.....	42
<b>Figura 7.</b>	Cuadro resumen sumersión en agua dulce y agua salada.....	42
<b>Figura 8.</b>	Selección de diatomeas marinas.....	47
<b>Figura 9.</b>	Fotografías al microscopio electrónico de barrido de valvas de diatomeas encontradas en los sedimentos de los lagos andinos.....	47
<b>Figura 10.</b>	Género Tetrahymena.....	53
<b>Figura 11.</b>	Especies de algas verdes.....	54
<b>Figura 12.</b>	Pseudomona.....	56
<b>Figura 13.</b>	Estreptococo.....	56
<b>Figura 14.</b>	E.coli.....	56
<b>Figura 15.</b>	Distribución del total de las muestras por grupos diagnósticos.....	110
<b>Figura 16.</b>	Distribución de las muestras de sangre por grupos diagnósticos. ....	111
<b>Figura 17.</b>	Distribución de las muestras de humor vítreo por grupos diagnósticos	111
<b>Figura 18.</b>	Muestras de sangre y humor vítreo.....	112
<b>Figura 19.</b>	Muestras de aguas del lugar de sumersión.....	113
<b>Figura 20.</b>	Horno microondas Ethos Plus Milestone. ....	116
<b>Figura 21.</b>	Recipientes de reacción de horno microondas.....	116
<b>Figura 22.</b>	ICP-MS Agilent 7500 ce.....	117
<b>Figura 23.</b>	ICP-OES PerkinElmer Optima 8300.....	122
<b>Figura 24.</b>	Rectas de regresión lineal de los resultados con la técnica ICP-MS vs técnica ICP-OES en muestras de humor vítreo. ....	141
<b>Figura 25.</b>	Rectas de regresión lineal de los resultados con la técnica ICP-MS vs técnica ICP-OES en muestras de humor vítreo.....	141
<b>Figura 26.</b>	Rectas de regresión lineal de los resultados con la técnica ICP-MS vs técnica ICP-OES en muestras de humor vítreo.....	141

<b>Figura 27.</b>	Perfil elemental, elementos minoritarios ( $\mu\text{g/L}$ ) en sangre periférica del grupo Sumersión en agua salada.....	146
<b>Figura 27a.</b>	Concentración de todos los elementos en la sangre de las tres localizaciones de los casos de sumersión en agua salada en escala logarítmica.....	147
<b>Figura 28.</b>	Perfil elemental, elementos mayoritarios ( $\text{mg/L}$ ) en sangre periférica del grupo Sumersión en agua salada.....	146
<b>Figura 29.</b>	Perfil elemental, elementos minoritarios ( $\mu\text{g/L}$ ) en sangre del ventrículo izquierdo del grupo Sumersión en agua salada.....	146
<b>Figura 30.</b>	Perfil elemental, elementos mayoritarios ( $\text{mg/L}$ ) en sangre del ventrículo izquierdo del grupo Sumersión en agua salada.....	146
<b>Figura 31.</b>	Perfil elemental, elementos minoritarios ( $\mu\text{g/L}$ ) en sangre del ventrículo derecho del grupo Sumersión en agua salada.....	146
<b>Figura 32.</b>	Perfil elemental, elementos mayoritarios ( $\text{mg/L}$ ) en sangre del ventrículo derecho del grupo Sumersión en agua salada.....	146
<b>Figura 33.</b>	Perfil elemental, elementos minoritarios ( $\mu\text{g/L}$ ) en sangre periférica del grupo Sumersión en agua dulce.....	150
<b>Figura 33a.</b>	Concentración de todos los elementos en la sangre de las tres localizaciones de los casos de sumersión en agua dulce en escala logarítmica.....	151
<b>Figura 34.</b>	Perfil elemental, elementos mayoritarios ( $\text{mg/L}$ ) en sangre periférica del grupo Sumersión en agua dulce.....	150
<b>Figura 35.</b>	Perfil elemental, elementos minoritarios ( $\mu\text{g/L}$ ) en sangre del ventrículo izquierdo del grupo Sumersión en agua dulce.....	150
<b>Figura 36.</b>	Perfil elemental, elementos mayoritarios ( $\text{mg/L}$ ) en sangre del ventrículo izquierdo del grupo Sumersión en agua dulce.....	150
<b>Figura 37.</b>	Perfil elemental, elementos minoritarios ( $\mu\text{g/L}$ ) en sangre del ventrículo derecho del grupo Sumersión en agua dulce.....	150
<b>Figura 38.</b>	Perfil elemental, elementos mayoritarios ( $\text{mg/L}$ ) en sangre del ventrículo derecho del grupo Sumersión en agua dulce.....	150
<b>Figura 39.</b>	Perfil elemental, elementos minoritarios ( $\mu\text{g/L}$ ) en sangre periférica del grupo No sumersión.....	154



<b>Figura 39a.</b>	Concentración de todos los elementos en la sangre de las tres localizaciones de los casos de sumersión en agua dulce escala logarítmica.....	155
<b>Figura 40.</b>	Perfil elemental, elementos mayoritarios (mg/L) en sangre periférica del grupo No sumersión.....	154
<b>Figura 41.</b>	Perfil elemental, elementos minoritarios ( $\mu\text{g/L}$ ) en sangre del ventrículo izquierdo del grupo No sumersión.....	154
<b>Figura 42.</b>	Perfil elemental, elementos mayoritarios (mg/L) en sangre del ventrículo izquierdo del grupo No sumersión.....	154
<b>Figura 43.</b>	Perfil elemental, elementos minoritarios ( $\mu\text{g/L}$ ) en sangre del ventrículo derecho del grupo No sumersión.....	154
<b>Figura 44.</b>	Perfil elemental, elementos mayoritarios (mg/L) en sangre del ventrículo derecho del grupo No sumersión.....	154
<b>Figura 45.</b>	Valores medios de las concentraciones de Litio en las tres localizaciones sanguíneas de los tres grupos diagnósticos, entre los que existen diferencias estadísticamente significativas.....	160
<b>Figura 46.</b>	Valores medios de las concentraciones de Boro en las tres localizaciones sanguíneas de los tres grupos diagnósticos, entre los que existen diferencias estadísticamente significativas.....	160
<b>Figura 47.</b>	Valores medios de las concentraciones de Estroncio en las tres localizaciones sanguíneas de los tres grupos diagnósticos, entre los que existen diferencias estadísticamente significativas.....	160
<b>Figura 48.</b>	Valores medios de las concentraciones de Magnesio en las tres localizaciones sanguíneas de los tres grupos diagnósticos, entre los que existen diferencias estadísticamente significativas.....	160
<b>Figura 49.</b>	Valores medios de las concentraciones de Calcio en las tres localizaciones sanguíneas de los tres grupos diagnósticos, entre los que existen diferencias estadísticamente significativas.....	160
<b>Figura 50.</b>	Valores medios de las concentraciones de Bromo en las tres localizaciones sanguíneas de los tres grupos diagnósticos. Existen diferencias estadísticamente significativas en ventrículo izquierdo.....	160

<b>Figura 51.</b>	Valores medios de las concentraciones de Fe en las tres localizaciones sanguíneas de los tres grupos diagnósticos. Existen diferencias estadísticamente significativas en ventrículo izquierdo.....	161
<b>Figura 52.</b>	Círculo de correlación F1/F2. Relaciones entre variables.....	162
<b>Figura 53.</b>	Gráfico de puntuaciones PC1/PC2. Agrupaciones entre muestras de sangre de las tres localizaciones.....	163
<b>Figura 54.</b>	Valores medios de las concentraciones ( $\mu\text{g/L}$ en escala logarítmica) de los elementos químicos en las aguas de sumersión.....	166
<b>Figura 55.</b>	Curva ROC de elementos químicos en sangre en casos sumersión	168
<b>Figura 56.</b>	Curva ROC de los elementos químicos en sangre en los casos de sumersión en agua salada.....	169
<b>Figura 57.</b>	Curva ROC de los elementos químicos en sangre en los casos de sumersión en agua dulce.....	170
<b>Figura 58.</b>	Concentración media ( $\mu\text{g/L}$ en escala logarítmica) de los elementos químicos es las muestras de humor vítreo .....	176
<b>Figura 59.</b>	Concentraciones de Estroncio en humor vítreo.....	177
<b>Figura 60.</b>	Concentraciones de Boro en humor vítreo.....	177
<b>Figura 61.</b>	Concentraciones de Bromo en humor vítreo.....	177
<b>Figura 62.</b>	Concentraciones de Magnesio en humor vítreo.....	177
<b>Figura 63.</b>	Concentraciones de Litio en agua de mar y en humor vítreo en el grupo de sumersión en agua salada y no sumersión.....	181
<b>Figura 64.</b>	Concentraciones de Boro en agua de mar y en humor vítreo en el grupo de sumersión en agua salada y no sumersión.....	181
<b>Figura 65.</b>	Concentraciones de Estroncio en agua de mar y en humor vítreo en el grupo de sumersión en agua salada y no sumersión.....	181
<b>Figura 66.</b>	Concentraciones de Bromo en agua de mar y en humor vítreo en el grupo de sumersión en agua salada y no sumersión.....	182
<b>Figura 67.</b>	Concentraciones de Magnesio en agua de mar y en humor vítreo en el grupo de sumersión en agua salada y no sumersión.....	182
<b>Figura 68.</b>	Ratios Agua de mar/Sangre y agua de mar/vítreo de Sr, B, Mg, Li y Br	183
<b>Figura 69.</b>	Curva Roc elementos químicos en humor vítreo en casos sumersión....	184
<b>Figura 70.</b>	Curva ROC de los elementos químicos en humor vítreo en los casos de sumersión en agua salada.....	185

## LISTADO DE ABREVIATURAS

AS: Agua salada

AD: Agua dulce

ANP: Péptido natriurético auricular

AQP-5: Aquaporin 5

BEC: Concentración equivalente de fondo

BNP: Péptido Natriurético Cerebral

HV: Humor vítreo

ICP-OES: Plasma de acoplamiento inductivo espectrometría óptica de emisión

ICP-MS: Plasma de acoplamiento inductivo con espectrometría de masas

IDL: Límite de detección instrumental

IPM: Intervalo postmortem

LCR: Líquido cefalorraquídeo

NS: No sumersión

P: Sangre periférica

SAS: Sumersión agua salada

SAD: Sumersión agua dulce

SP: Surfactante pulmonar

VD: Sangre ventrículo derecho

VI: Sangre ventrículo izquierdo



## Resumen

La muerte por sumersión es un problema de salud pública importante. Es considerada como la segunda causa de muerte no intencional, tras las producidas por accidentes de tráfico y representa más de medio millón de muertes anuales en todo el mundo.

El diagnóstico post mortem de ahogamiento continúa siendo uno de los más difíciles en la patología forense y con más frecuencia necesita exámenes complementarios. La determinación de elementos traza en sangre y humor vítreo puede ser aplicada en medicina forense para el diagnóstico de la causa de la muerte. En este sentido, uno de los principios generales que puede ayudar a confirmar el diagnóstico de sumersión es la presencia en la circulación sanguínea de sustancias químicas presentes en el agua de sumersión que se encuentran en el cuerpo humano en concentraciones muy bajas (elementos traza).

El propósito de esta investigación fue analizar distintos elementos químicos en sangre y humor vítreo en distintas causas de muerte y su posible aplicación al diagnóstico de sumersión. Así, 19 elementos químicos (Al, As, Ba, B, Br, Ca, Cd, Cu, Fe, K, Li, Mg, Mn, Mo, Ni, Pb, Se, Sr y Zn) se determinaron en la sangre periférica, sangre del ventrículo derecho, sangre del ventrículo izquierdo y humor vítreo, procedentes de 68 cadáveres con diferentes causas de muerte: sumersión en agua de mar (n=41), sumersión en agua dulce (n= 14) y no sumersión (n=13) y el medio de sumersión, por espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS).

Los objetivos del estudio fueron: (1) Determinar el tratamiento más adecuado para aplicar a las muestras y estudiar la idoneidad de las técnicas de análisis elemental ICP-MS e ICP-OES. (2) Analizar la existencia de diferencias en las concentraciones de los elementos químicos entre los grupos diagnósticos y diferencias en las concentraciones de los elementos asociadas al sexo y a la edad de los fallecidos. (3) Determinar la existencia de correlaciones entre las concentraciones de los elementos bioquímicos analizados con el intervalo postmortem y correlaciones entre los elementos químicos en sangre y humor vítreo y el medio de sumersión. (4) Analizar la existencia de patrones definidos en los tres grupos diagnósticos y relaciones con los elementos químicos analizados. (5) Evaluar la capacidad discriminadora de los elementos traza de forma individual y conjunta para diagnosticar las muertes por sumersión. (6) Análisis de ratios entre la concentración de los elementos químicos en agua de mar y humor vítreo y entre agua de mar y

sangre. (7) Establecer un protocolo en el uso de los marcadores bioquímicos como herramienta complementaria en el correcto diagnóstico.

Las conclusiones del estudio fueron las siguientes: (1) ICP-MS es la técnica de elección para el análisis de trazas y ultratrazas en matrices clínicas. (2) Nuestros análisis muestran que las concentraciones de Sr, Mg, B y Ca en las tres localizaciones sanguíneas son marcadores útiles en el diagnóstico de la sumersión en agua salada. La utilidad de las concentraciones de litio debe realizarse con precaución debido a sus bajas concentraciones en este medio. La determinación conjunta de estroncio, magnesio, calcio, boro y litio permiten clasificar al 83% de los casos de sumersión en agua salada. (3) El bromo presenta alta capacidad discriminatoria para la identificación de la sumersión en agua salada. (4) El análisis de hierro en sangre puede ser útil para el diagnóstico de la muerte por sumersión en agua dulce. La determinación conjunta de cinc, bario, estroncio y magnesio permite mejorar la capacidad de discriminación para identificar los casos de sumersión en agua dulce. (5) El análisis de componentes principales pone de manifiesto mayores niveles de Sr, Mg, B, Ca y Br en sangre del ventrículo izquierdo en sumersión en agua salada, lo que explica la aspiración de agua hipertónica, y mayores niveles de As, Se, K, Zn, Mn, Pb y Cu en sangre del ventrículo derecho, lo que evidencia la hemodilución. (6) El análisis de las aguas de sumersión muestra mayores concentraciones de Sr, Ca, B, Br y Mg en agua salada, lo cual se corresponde con los análisis de sangre de sumersión en agua salada y con las ratios agua salada/sangre. (7) Los análisis realizados en humor vítreo muestran por primera vez la utilidad de este fluido biológico para el diagnóstico de sumersión y se ha comprobado la utilidad del análisis de las concentraciones de Mg, Sr, Br y B en el diagnóstico de sumersión en agua salada. (8) La determinación de elementos traza en sangre y en humor vítreo es una buena herramienta complementaria para el diagnóstico de sumersión.

## Summary

Drowning is a major public health problem. It is considered to be the second leading cause of death from unintentional injury, after road traffic injuries, and accounts for more than half a million deaths annually worldwide.

The post-mortem diagnosis of drowning continues to be one of the most difficult in forensic pathology and it needs increasingly more frequent complementary examinations. Trace element determination in blood and vitreous humor can be applied in forensic medicine to diagnose the cause of death. One of the general principles that can help confirm the diagnosis of drowning is the presence of chemical substances in the blood circulation, present in the drowning water that are found in the human body in very low concentrations (trace elements).

The purpose of this research was to analyze different chemical elements in blood and vitreous humor in different causes of death and its possible application to the diagnosis of drowning.

In this study 19 elements (Al, As, Ba, B, Br, Ca, Cd, Cu, Fe, K, Li, Mg, Mn, Mo, Ni, Pb, Se, Sr and Zn) were determined in peripheral blood, right ventricle and left ventricle blood and vitreous humor from 68 cadavers with different causes of death: seawater drowning (n=41), freshwater drowning (n=14) and no drowning (n=13), and drowning medium by inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS).

The study objectives were: (1) To determine the most appropriate treatment to apply to the samples and to study the suitability of the ICP-MS and ICP-OES elemental analysis techniques. (2) Analyze the existence of differences in the concentrations of the chemical elements between the different diagnostic groups and differences in the concentrations of the elements associated with sex and the age of the deceased. (3) To determine the existence of correlations between the concentrations of the biochemical elements analyzed with the postmortem interval and correlations between the chemical elements in blood and vitreous humor and the drowning water. (4) To analyze the existence of defined patterns within the three diagnostic groups and the relationships between the analyzed chemical elements. (5) To evaluate the discriminative power of the trace elements individually and jointly in order to diagnose drowning deaths. (6) Analysis of ratios between the concentration of chemical elements in seawater and vitreous humor and between sea water and blood. (7) To establish a protocol in the use of biochemical markers as a complementary tool in the correct diagnosis.

The conclusions of the study were: (1) ICP-MS is the technique of choice for trace and ultratrace analysis in clinical matrices. (2) Our analyses show that concentrations of Sr, Mg, B and Ca in the three blood locations are useful markers in the diagnosis of seawater drowning. The usefulness of lithium concentrations should be made with caution due to their low concentrations in this environment. The joint determination of strontium, magnesium, calcium, boron and lithium allows to classify 83% of the cases of drowning in seawater. (3) Bromine has a high discriminative power in the identification of seawater drowning. (4) Blood iron analysis may be useful for the diagnosis of freshwater drowning. The joint determination of zinc, barium, strontium and magnesium allows to improve the power of discrimination to identify cases of freshwater drowning. (5) Principal components analysis shows higher levels of Sr, Mg, B, Ca and Br in left ventricular blood in sea water drowning, which explains the aspiration of hypertonic water, and higher levels of As, Se, K, Zn, Mn, Pb and Cu in the right ventricle blood, demonstrating hemodilution. (6) The analysis of drowning waters shows higher concentrations of Sr, Ca, B, Br and Mg in sea water, which matches the seawater drowning blood tests and the seawater / blood ratio. (7) The analyzes performed in vitreous humor show for the first time the usefulness of this biological fluid for the diagnosis of drowning and the usefulness of the analysis of the concentrations of Mg, Sr, Br and B for the diagnosis of drowning in sea water has been verified. (8) The determination of trace elements in blood and vitreous humor is a good complementary tool for the diagnosis of drowning.







# **1. INTRODUCCIÓN**



## 1.1. Asfixias

### 1.1.1. Concepto

La sumersión no es una entidad simple, sino un síndrome complejo, con numerosas variaciones englobadas dentro del amplio grupo de las asfixias mecánicas, presentando muchas similitudes con otros mecanismos de muerte de dicho grupo, pero con características especiales que dificultan su estudio en función de las diferencias individuales y ambientales.

Por ello, para encuadrar el tema que nos ocupa, y antes de profundizar sobre él, es necesario definir y clasificar de una forma general las asfixias mecánicas. La Asfixia (del griego *asphyxia* o detención del pulso) es una causa frecuente de muerte, común a numerosos procesos patológicos, el término fue creado en época galénica para designar las muertes repentinas con parada cardíaca.

Clásicamente se ha denominado mecánica cuando provenía del impedimento mecánico de la penetración del aire en los pulmones, lo que llevaba consigo una dificultad o detención de la función respiratoria y con tal significado persiste en la literatura médico-legal y en el lenguaje coloquial (Saukko y Knight, 2004; Spitz, 2006).

Hoy en día el concepto ha cambiado con el mejor conocimiento de la fisiología celular y se prefiere hablar de *anoxia* (en un sentido amplio, déficit total) que es la carencia de oxígeno en el organismo y de *anoxemia* (de forma más restringida, déficit parcial) que es la falta de oxígeno en la sangre, para expresar que lo fundamental es el empobrecimiento gradual de la sangre en oxígeno a nivel tisular. Aunque más correcto es hablar de anoxia e *hipoxemia* (hipoxia: disminución de oxígeno en el organismo; hipoxemia: disminución de oxígeno en sangre).

### 1.1.2. Fisiología del oxígeno y CO<sub>2</sub> en sangre y respiración

Para entender los mecanismos de la asfixia mecánica, es interesante estudiar la fisiología de los gases oxígeno y dióxido de carbono en la sangre y el intercambio gaseoso que constituye la respiración (Alarcón Flores, 2006).

Los gases que se encuentran mezclados en un mismo espacio, siempre se comportan de forma independiente, cada uno de ellos ejerce una presión que es proporcional a su concentración, o lo que es lo mismo, a su número de moléculas.

La presión atmosférica es de 760 mm Hg a nivel del mar, y es la suma de las presiones parciales de todos los gases que componen la atmósfera (**Tabla 1**):

Gases	Presión mm Hg	Composición %
N <sub>2</sub>	597	78,62
O <sub>2</sub>	159	20,34
CO <sub>2</sub>	0,3	0,04
H <sub>2</sub> O	3,7	0,50
Total	760	100

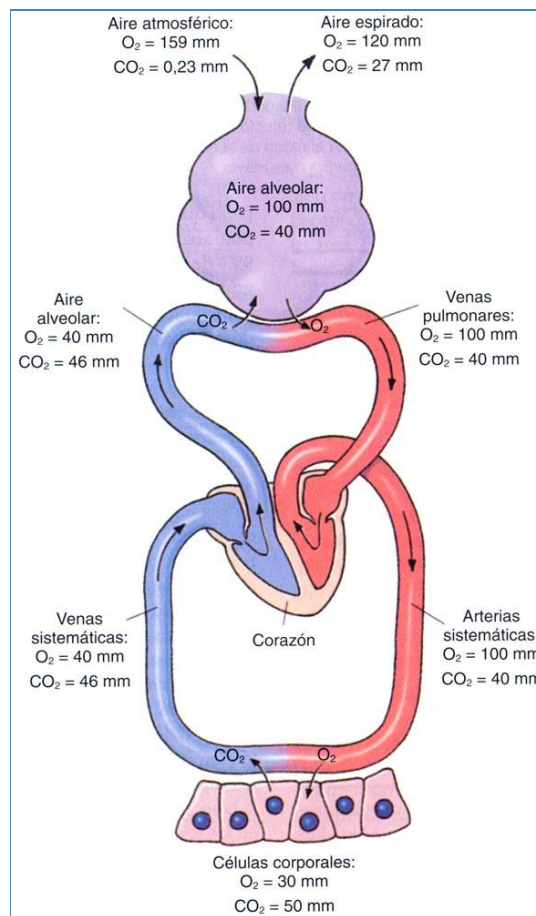
**Tabla 1.** Composición de la atmósfera y presión de los gases.

En los fenómenos respiratorios, las presiones parciales de cada uno de los gases, son de vital importancia. El oxígeno abundante en la atmósfera debe ser transportado hasta el interior de cada una de las células del organismo, y el dióxido de carbono debe hacerlo en sentido contrario, es decir, desde las células en que se produce, hasta la atmósfera en donde su concentración es muy baja; esto se traduce en una entrada continua de oxígeno de la atmósfera al organismo, y una salida continua de CO<sub>2</sub> del organismo al exterior. Para efectuar este proceso, interviene el aparato respiratorio, el circulatorio, la sangre y las presiones parciales de cada uno de los gases.

El aparato respiratorio lleva el aire atmosférico hasta los alvéolos. En el alveolo la presión de O<sub>2</sub> es de 100 mm Hg. La sangre venosa lleva una pO<sub>2</sub> de 40 mm Hg por lo que el oxígeno difunde siguiendo el gradiente de presión del alveolo a la sangre, hasta que se equilibra alcanzando una concentración de 100 mm Hg de O<sub>2</sub>, ésta sería la sangre arterial que se distribuye por todo el organismo.

En los tejidos, esta sangre desprende su oxígeno, ya que las células tienen una presión de O<sub>2</sub> de 40 mm Hg o menos, por esto el O<sub>2</sub> pasa, siguiendo su gradiente de concentración, del capilar a las células. Por otro lado, en las células se produce CO<sub>2</sub> y su presión parcial es de 46

mm Hg, en la sangre arterial capilar la  $p\text{CO}_2$  es de 40 mm Hg por lo que el  $\text{CO}_2$  difunde de las células a los capilares hasta que se equilibra y alcanza una  $p\text{CO}_2$  de 46 mm Hg, esta es la sangre venosa. Al llegar a los pulmones, la  $p\text{CO}_2$  en los alvéolos es de 40 mm Hg por lo que el  $\text{CO}_2$  difunde de la sangre venosa al alveolo siguiendo su gradiente de concentración, y el alveolo se carga de  $\text{CO}_2$ , mientras que la sangre pierde el  $\text{CO}_2$ . Finalmente, la sangre queda con 40 mm Hg de  $\text{CO}_2$  y con 100 mm Hg de  $\text{O}_2$ , y ésta es la sangre arterial (**Figura 1**).



Princp Integ Zool, Hickman et al, 2003. ISBN84-468-0330.

**Figura 1.** Intercambio gaseoso en el cuerpo humano.

El hombre es un sistema termodinámico inestable que requiere la constante administración de energía para mantenerse vivo. Ésta se obtiene por la oxidación de la glucosa, un mol de la cual proporciona 686 kilocalorías, con productos finales de anhídrido carbónico y agua. Anaeróbicamente (fermentación de glucólisis), por la misma cantidad de glucosa se obtienen 45 kilocalorías, insuficiente para que el organismo funcione adecuadamente en circunstancias

normales. Por tanto, resulta indispensable una aportación constante y suficiente de glucosa y oxígeno para conservar la vida.

Mediante movimientos respiratorios, los pulmones captan oxígeno del aire, que es transportado en los glóbulos rojos a todos los tejidos, y proporciona a cada célula una cantidad adecuada de oxígeno por unidad de tiempo. Cualquier interferencia en este proceso hace peligrar la vida o causa la muerte. Si el bloqueo se encuentra en el área respiratoria, podrá haber disminución de la captación de oxígeno (hipoxia) o carencia total de éste (anoxia). Lo mismo acontece en las otras áreas del mecanismo de oxidación, por lo cual habrá hipoxia o anoxia si en el sistema eritrocítico existe hipoxia anémica, si en los tejidos afectados por algún tóxico hay hipoxia o anoxia citotóxica y, por último, si la disminución o falta de oxígeno es causada por un fallo en la circulación sanguínea.

Clásicamente se describían 4 tipos de anoxia en función del nivel en el que falla el aporte de oxígeno. En la actualidad han sido revisados y actualizados por autores como Concheiro y Suárez Peñaranda (2004).

1. *Hipoxémica*: Consiste en una disminución de la concentración de O<sub>2</sub> en la sangre. Responde a una etiología muy diversa, aunque suele deberse a la escasez de oxígeno en el ambiente, a la obstrucción del flujo de aire en las vías respiratorias o a enfermedades pulmonares.

2. *Isquémica o circulatoria*: El déficit de O<sub>2</sub> se relaciona con una incapacidad para mantener un flujo circulatorio adecuado, ya sea por fallo cardíaco o por shock (trastornos de la pequeña o de la gran circulación).

3. *Anémica*: Cuando el déficit está ocasionado por una disminución de la capacidad de transporte de oxígeno por la sangre, como ocurre en las anemias, hemoglobinopatías o intoxicaciones por CO.

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



Los cuatro grupos descritos son causas de muerte habitual, pero de entre ellas, el primer grupo es sin duda la más frecuente y es la que por extensión se engloba en el concepto de asfixia mecánica.

### 1.1.3. Clasificación de las asfixias

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

- *Sofocación*: Término amplio asociado con la falta de oxígeno. Puede ser provocada por oclusión de los orificios respiratorios, oclusión intrínseca de las vías respiratorias o por carencia de aire respirable.

- *Estrangulación*: Asfixia por el cierre de los vasos sanguíneos y/o conductos de aire del cuello como resultado de la compresión externa del cuello. Esta presión en el cuello se puede ejercer con las manos o los antebrazos, mediante una banda de constricción apretada por una fuerza que no sea el peso corporal, o mediante una banda de constricción apretada por el peso gravitacional del cuerpo o parte del cuerpo (ahorcadura).

- *Asfixia mecánica*: Asfixia por la restricción de los movimientos respiratorios, ya sea por la posición del cuerpo o por la compresión externa del pecho. Este tipo de asfixia puede ser postural, donde la posición de un individuo compromete la capacidad respiratoria, o traumática, causada por la compresión externa del pecho por un objeto pesado.

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

## 1.2. Sumersión

### 1.2.1. Concepto de Muerte por Sumersión

A lo largo de la historia se han dado diferentes definiciones de sumersión:

- *Roll* (1918) da una de las definiciones clásicas de la muerte por sumersión: es el resultado de obstaculizar la respiración por obstrucción de la boca y la nariz, por un medio fluido, generalmente agua.
- *Thoinot* en 1927 la definía como la asfixia por penetración de una materia líquida o semilíquida en las vías respiratorias.
- *Balthazar* (1933) opinaba que si los orificios de las vías aéreas están sumergidos en un líquido cualquiera y éste penetra en los pulmones en lugar del aire respirable, se trata de un tipo de asfixia llamado sumersión.
- *Vibert* (1911) la definió como la muerte que sobreviene como consecuencia de la inmersión del cuerpo en el agua o en otro líquido que impida la entrada de aire en las vías aéreas.
- *Simonin* (1962) consideró que la sumersión podía definirse como un mecanismo de muerte originado por respirar debajo del agua o por perder la respiración debajo del agua.
- *Di Maio y Di Maio* en 1989, encuentran que la sumersión puede definirse como la muerte debida a la sumersión en un líquido.
- *Cocheiro y Suárez Peñaranda* (2004) definen la sumersión como la muerte o el trastorno patológico producidos por la introducción de un medio líquido, habitualmente agua, en las vías respiratorias.

Como vemos, son muchas las definiciones que en la literatura podemos encontrar sobre este cuadro, si bien algunas de ellas pueden resultar incorrectas o incompletas a la luz de los conocimientos actuales.

Podemos decir que no existe actualmente una definición uniforme y mundialmente aceptada para definir el concepto de sumersión. Autores como *Papa et al.* (2005) en una revisión efectuada entre los años 1966 y 2002, encontraron 6000 artículos relacionados, en los que se establecían 33 definiciones diferentes para describir incidentes de sumersión.

Por otro lado, tal y como señalaron Cocheiro y Suárez en 1998, no existe en nuestro idioma un término preciso que defina los efectos perjudiciales derivados de la penetración de agua en las vías respiratorias como sucede en inglés (drowning), en alemán (ertrinkung), en francés (noyade) y en italiano (annegamento). De esta manera, se podría recurrir al calificativo de ahogamiento, en vez de sumersión que no conceptúa ni los trastornos derivados de la penetración de agua en las vías respiratorias ni la muerte como consecuencia de ésta.

Recientemente y de forma más precisa, el Primer Congreso Mundial sobre asfixia por sumersión celebrado en Amsterdam (Holanda) en el año 2002, ha venido a definirla como “*el proceso de experimentar insuficiencia respiratoria por la sumersión o inmersión en un medio líquido, de modo que el fluido que rodea a la víctima llega a bloquear las vías respiratorias e inhibir la respiración. La víctima puede vivir o morir después de este proceso*” (Idris et al., 2003). También se llegó a 2 definiciones consensuadas aceptadas mundialmente, *working drown*: muertes por asfixia debido a la sumersión en un medio líquido, incluyendo las muertes por las complicaciones de este evento como la hipotermia y *near drowning*: supervivencia inmediata que sigue a la asfixia debida a la sumersión en un medio líquido, que incluye el concepto de casi ahogamiento.

La sumersión encuadra un mecanismo de muerte en el que el denominador común es la hipoxia o la anoxia generada por una defectuosa oxigenación de la sangre producida al respirar en un medio líquido, lo cual puede suceder por reducción del área pulmonar de intercambio y por ocupación del espacio alveolar por líquido. Comparte mecanismo fisiopatológico con muchos tipos de muerte por hipoxia o anoxia lo cual hace que sea un síndrome complejo en su producción y por ende en su explicación y en su comprensión (Salomez et al. 2004).

A la vista de todas estas definiciones, la más aceptada por la comunidad médico-forense es la de Concheiro y Suárez que definen la sumersión, en sentido médico-legal, como “*la muerte o el trastorno patológico producido por la introducción de un medio líquido, habitualmente agua, en las vías respiratorias*”. Distinguen entre sumersión primaria, cuando la muerte sigue inmediatamente a la sumersión, y sumersión secundaria, cuando la penetración líquida ocasiona tan sólo un trastorno patológico que, eventualmente, puede ocasionar también la muerte en un momento posterior.

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

Podemos distinguir varios tipos de sumersión según:

- El curso evolutivo de la sumersión:
  - Sumersión primaria, cuando la muerte sigue inmediatamente a la sumersión.
  - Sumersión secundaria, cuando la penetración líquida ocasiona tan sólo un trastorno patológico que, eventualmente, puede ocasionar también la muerte en un momento posterior.
  
- La superficie corporal cubierta por el agua:
  - Sumersión completa, cuando la totalidad del cuerpo está inmerso en el agua.
  - Sumersión incompleta si tan sólo la cabeza, o en los casos más extremos, únicamente los orificios respiratorios, se encuentran cubiertos por el agua.
  
- La naturaleza del agua en la que se produce la sumersión:
  - Sumersión en agua dulce.
  - Sumersión en agua salada, con diferencias fisiopatológicas entre ambas.
  
- La cantidad de agua encontrada en los pulmones:
  - Asfixia por sumersión, cuando se encuentran grandes cantidades de agua en las vías respiratorias.
  - Muerte en el agua con pulmones secos, cuando se encuentra un cuerpo en el agua sin presentar líquido en los pulmones.

- La presencia de testigos:

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

### 1.2.2. Importancia del estudio de la Sumersión

El ser humano, por naturaleza, debe relacionarse con su medio ambiente surgiendo de esta relación riesgos ambientales que en ocasiones pueden producir la muerte, bien como consecuencia fatal de la práctica de deportes, bien de forma accidental, también como forma de suicidio y como mecanismo homicida. Dentro de las muertes relacionadas con circunstancias ambientales se encuentran las asfixias mecánicas y muy especialmente dentro de éstas la sumersión.

La incidencia de la muerte por sumersión está aumentando en todo el mundo, aproximadamente medio millón de personas mueren cada año por esta causa (Salomez y Vincent, 2004) y se estima que dicha cifra está muy por debajo de las cifras reales, ya que muchos casos no son informados o registrados. En Estados Unidos los ahogamientos accidentales son responsables de casi 4000 muertes anuales (2005-2009), lo cual queda empequeñecido por las catástrofes producidas en Asia por el efecto de los Tsunamis en 2005 con 296.000 fallecidos (Ministerio de Salud de Indonesia y CDC). Desde esa fecha hasta ahora se han producido otras catástrofes naturales importantes, pero ninguna de tan gran magnitud.

En nuestro país el ahogamiento es la segunda causa de mortalidad en accidentes después de los siniestros de tráfico, como se desprende de las cifras recogidas por el Instituto Nacional de Estadística, al cobrarse alrededor de 450 vidas al año (422 en 2013 y 465 en 2014) y por el informe nacional de ahogamientos elaborado por la Real Federación Española de Salvamento y Socorrismo (415 en 2015 y 437 en 2016). Es importante destacar la incidencia que tiene el

fenómeno de la inmigración ilegal, utilizando el sistema de pateras en el estrecho de Gibraltar y en la Comunidad de Canarias, que cada año se cobra un número considerable de víctimas.

El diagnóstico de muerte por sumersión es uno de los grandes problemas que se plantean cotidianamente en medicina forense. Desde muy antiguo se han descrito características clásicas para estos mecanismos de muerte, signos generales inespecíficos y algunos específicos, siendo máximas las dificultades cuando se trata de cadáveres en estado de putrefacción.

Tal y como señala Romero Palanco (2007), la recuperación de un cadáver del agua plantea siempre múltiples y variadas preguntas a las que es necesario dar cumplida respuesta, a fin de resolver los diferentes problemas que se plantean desde el punto de vista médico forense:

- ¿Quién es la víctima?
- ¿Estaba viva la víctima antes de entrar en el agua?
- ¿Falleció por una causa natural o violenta antes del ingreso en el agua?
- ¿Le sobrevino una muerte natural o violenta en el agua?
- ¿Sufrió una muerte por inhibición en el agua?
- ¿Sufrió un cuadro de hipotermia en el agua?
- ¿Precipitó la hipotermia el fallecimiento en el agua?
- ¿Sufrió un cuadro de asfixia por sumersión?
- ¿Por qué motivo fue incapaz de sobrevivir en el agua?
- ¿Pudo influir en el fatal desenlace algún tóxico?
- ¿Cuánto tiempo ha permanecido en el agua?

En definitiva, las exigencias legales que se plantean ante un cadáver extraído del agua son:

- Diagnóstico
- Etiología de la sumersión: accidental, suicida u homicida
- Cronología
- Determinar si hubo o no sobrevivencia

Estas cuestiones y otras múltiples hacen que la investigación en los casos de cuerpos recuperados del agua sea sumamente compleja y difícil. Es necesario correlacionar todos los hallazgos necrópsicos, que en estos supuestos son muy abundantes, con los resultados de las pruebas analíticas complementarias, así como con los datos facilitados por la investigación policial, que, aun siendo siempre necesaria, en estos casos requiere una más intensa colaboración.

Con respecto a las pruebas complementarias, tenemos que decir que en Patología Forense son muchos los casos en los que puede realizarse un diagnóstico correcto sin el empleo de técnicas complementarias, la simple observación macroscópica despeja muchos de los casos, pero existe un buen número de casos en el que se requiere la realización de pruebas analíticas complementarias y en muchos de estos casos ni con el empleo de las técnicas más sofisticadas se puede alcanzar el grado de certeza científica que la Administración de Justicia necesita.

Es importante destacar, que pese a que la muerte por sumersión es un mecanismo de muerte conocido desde muy antiguo, existiendo toda clase de citas en la literatura, son pocos los estudios científicos innovadores que se han efectuado al objeto de resolver los problemas que plantean, a diferencia de lo que ocurre con otros campos de la medicina legal y forense.

Una búsqueda en bibliotecas digitales sobre estas materias pone de manifiesto que son pocas las tesis doctorales y los estudios que se han ocupado del tema en España y en el extranjero, de esta manera encontramos a lo largo de la historia:

1. Anteriores a 1900: Anónimo de 1775; Fabregat en 1775; Orfila en 1830.
2. Posteriores a 1900: Echelbauer en 1938; Büttner en 1941; Gunzelmann en 1941; Espinosa Muñoz en 1964; Muñoz Tuero en 1971; Villalaín Blanco en 1979; Lorente Acosta en 1988; Pérez Pujol en 1997; Azparren Lucas en 1988; Sibón Olano 2009; del Pozo Luengo 2013.

Por todo lo expuesto anteriormente, podemos afirmar que el diagnóstico de certeza de una muerte por asfixia por sumersión es uno de los problemas de más compleja resolución en Patología Forense, para el que aún hoy no se dispone de un método o procedimiento diagnóstico cuyos resultados sean irrefutables.

Puede afirmarse, como lo hacen Piette y De Letter (2006), que el test diagnóstico ideal como prueba definitiva de asfixia por sumersión todavía está por ser establecido y que para llegar a un diagnóstico en la asfixia por sumersión, se necesitan de los hallazgos clásicos de la autopsia, siendo los más significativos: 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 de los estudios histológicos, del test de diatomeas y del estudio de estroncio.

Más recientemente, en 2010, Papadodima aconseja realizar sistemáticamente una meticulosa autopsia, así como incorporar los estudios histológicos y añadir un completo *screening* toxicológico en aquellos casos que presenten una especial dificultad.

Existe un protocolo desde hace más de 20 años establecido por el Instituto Nacional de Toxicología y Ciencias Forenses (INTCF) para el estudio de las muertes por sumersión, publicado (Sánchez de León, 2011) y revisado en la reciente 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 INTCF. En él se contemplan los estudios histopatológicos, estudio toxicológico, la determinación de estroncio, y el test de diatomeas.

Los procedimientos diagnósticos que se han establecido hasta ahora se basan en las consecuencias inmediatas que origina el líquido de sumersión al introducirse en el organismo, haciendo penetrar, igualmente, los diferentes elementos químicos y partículas que se encuentran en el mismo. Pese a ello, en los últimos años se han publicado numerosos trabajos en un intento de determinar un marcador bioquímico que resulte especialmente útil para el diagnóstico de la asfixia por sumersión.

En este trabajo examinaremos los procedimientos diagnósticos publicados hasta ahora y estudiaremos posibles marcadores químicos para el diagnóstico de la asfixia por sumersión.



### 1.2.3. Epidemiología de las muertes por sumersión

Romero Palanco en su excelente revisión del 2007, recoge los siguientes datos: Aproximadamente medio millón de personas mueren cada año en todo el mundo a causa de asfixia por sumersión (Salomez y Vincent, 2004) y se estima que dicha cifra está muy por debajo de las cifras reales, ya que muchos casos no son informados o registrados (De Nicola et al., 1997).

Datos disponibles de la OMS vienen a poner de manifiesto una tasa de mortalidad de 6,8 por 100.000 habitantes (World Health Organization, 2010). Estas cifras colocan a la asfixia por sumersión como la segunda causa de muerte accidental, tras las producidas por accidentes de tráfico (Beeck et al., 2005). Esta alta incidencia hace que organismos internacionales como la UNESCO y la Organización Mundial de la Salud (OMS) lo califiquen de asunto de salud pública que reclama atención mundial (OMS, 2008). Además, estos mismos organismos advierten que las cifras reales de muerte por ahogamiento pueden estar subestimadas pues la clasificación y la forma de registro no es universal ni sistemática en todos los países.

Las muertes por ahogamiento se producen en todos los países y regiones del mundo, sea cual sea su economía, como muestra la **Tabla 2** de la Organización Mundial de la Salud.

	Total	AFR	AMR	EMR	EUR	SEAR	WPR
Hombres	281.717	67.654	20.181	20.712	30.322	55.258	87.600
Mujeres	127.555	23.311	4.408	6.904	7.196	36.520	49.216
Total	409.272	90.965	24.589	27.616	37.518	91.778	136.816
Ratio por sexo	2,2:1	2,9:1	4,6:1	3:01	4,2:1	1,5:1	1,8:1
%	100	22,3	6	6,8	9,1	22,4	33,4
Ratio por 100.000	6,8	14,2	3	5,7	4,3	6	8,1

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

**Tabla 2.** Muertes por sumersión distribuidas por sexo y región (WHO, GBD 2000).

A la vista de estos datos se puede decir que el 96% de las muertes por ahogamiento accidental se producen en los países de ingresos bajos y medios. Más del 60% de los ahogamientos en el mundo se producen en la Región del Pacífico Occidental y la Región del Sudeste de Asia.

En el 2005 los desastres naturales conocidos por Tsunamis, se han cobrado en un solo día más muertes que la estadística mundial de dos años consecutivos, originando no pocos problemas de salud pública y de identificación de víctimas.

En la actualidad nos llegan continuamente noticias de inundaciones y tifones en todas partes del mundo que dejan miles de muertos, fundamentalmente ahogados, así encontramos en los últimos años el huracán Katrina que en agosto de 2005 provocó la inundación de Nueva Orleans. En 2008 el ciclón Nargis afectó a la Península de Birmania dejando 100.000 muertos. En marzo del 2011 murieron 23.639 personas en Japón por un devastador terremoto que posteriormente dio lugar a un tsunami. El tifón “Yolanda” en la India en 2013, dejó a su paso 5.200 víctimas mortales.

En Estados Unidos, datos estadísticos del año 2007 recogen la cifra de 3.443 muertes accidentales por ahogamiento no relacionadas con la navegación y 496 relacionadas con la navegación, estableciendo la sumersión como la sexta causa de muerte accidental para las personas de todas las edades y la segunda causa de muerte en niños de entre 1 y 14 años, después de los accidentes de tráfico (CDC, 2009, 2011). Esto da una media de cerca de 10 muertes por día. También las estadísticas revelan que las muertes por sumersión tienden a ocurrir con mayor frecuencia los fines de semana (40%) en meses de verano (mayo a agosto).

Otros artículos consultados indican durante el período 2005-2009 un promedio de 3.533 muertes anuales por sumersión accidental no relacionadas con la navegación y 347 muertes por sumersión relacionadas con la navegación.

La forma más común es la etiología accidental, que para algunos autores representa entre el 80 y el 90% del total de las sumersiones y el 15% de las muertes accidentales, con una relación 10:1 a favor de los varones (Verdú 1987, Gordon et al. 1988, Wang y Chou 1997) y con un lógico predominio en meses cálidos y en fines de semana (Carithers et al. 1997).

En un gran número de países desarrollados, la asfixia por sumersión tiene una alta incidencia en niños menores de 5 años y en jóvenes con edades comprendidas entre 14 y 24 años (Mulligan-Smith 2002; Blum 2000; Browne 2003; Golden 1997, Siber 2002), constituyendo la primera o segunda causa de muerte en estos grupos de edad. Así, Swick en 1997, afirmó que la asfixia por sumersión es la tercera causa de muerte en la población pediátrica en Estados Unidos, después de los accidentes de tráfico y el cáncer. Posteriormente, según datos recogidos en Estados Unidos en el período 2005-2009 se ha visto que los niños de 1 a 4 años tienen altas tasas de ahogamiento, así en el 2009 más del 30% de los niños de 1 a 4 años que murieron por accidente la causa fue el ahogamiento, produciéndose la mayoría de ellos en piscinas particulares (CDC 2012).

También su incidencia es alta en algunas profesiones, como se refleja en estudios realizados en Estados Unidos para el caso de los pescadores comerciales, así el Instituto Nacional para la Seguridad y Salud Ocupacional de Estados Unidos (NIOSH, 1993 y 1994) registró las muertes de 637 pescadores comerciales durante el período de 10 años de 1980 a 1989, las sumersiones sumaron el 69% de estas muertes. También un estudio médico realizado en Dinamarca revela que durante el período 1989-2005 se produjeron 114 muertes por sumersión entre los pescadores comerciales (Laursen, 2008).

Mención especial merece la asociación existente entre sumersión y alcohol tal y como se ha visto en estudios realizados en Finlandia por Lunetta et al. (2004), donde un tercio de los adultos ahogados tenían cifras de alcohol en sangre superior a 1 gramo por mil. En el mismo sentido, Driscoll et al. publicaron en el 2004 en Australia un artículo donde reflejaron que el alcohol parecía contribuir a aproximadamente el 19% de las muertes por sumersión, mientras que la mortandad se dispara cuando se realiza el estudio en las muertes por sumersión derivadas de actividades recreativas, encontrándose cifras de alcohol superior a 1 gramo por mil en el 30 a 70% de los casos estudiados, no obstante los autores insisten en que estos datos podrían verse incrementados, ya que no a todos los ahogados se les realiza la prueba de la alcoholemia. Cifras similares pueden encontrarse en Inglaterra y Gales que se acercan al 14% de los casos, aumentando hasta el 29% en Escocia.

Un estudio más reciente realizado en Suecia que recoge datos del período 1992-2009, realiza las autopsias de 5.125 cadáveres víctimas de ahogamiento y en el 38% se encuentran concentraciones de alcohol en sangre en torno a 1,8 g/l (Kristin Ahlm et al. 2009).

En España no contamos con una estadística sistemática y fiable de muertos en el medio acuático. Los datos que aporta el Instituto Nacional de Estadística con varios años de retraso aparecen reflejados en un apartado denominado “*ahogamiento, sumersión y sofocación accidentales*”, clasificándolos en varones y mujeres, por edades, por comunidades autónomas y por meses.

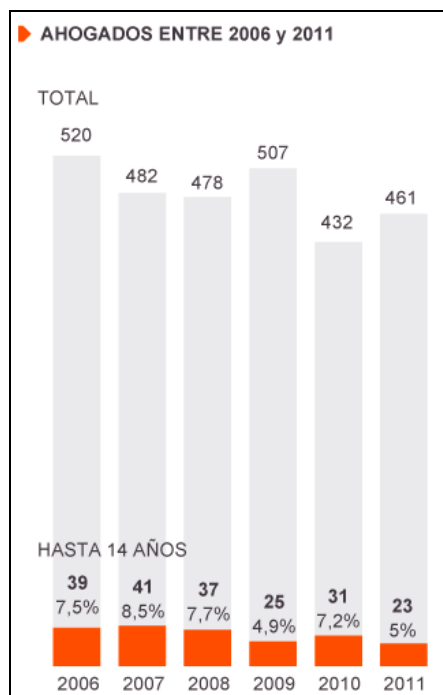
Los primeros datos los recoge Verdú Pascual en su tesis doctoral de 1987 sobre el estudio de la muerte violenta en el partido judicial de Valencia desde 1960 a 1987, con 486 casos de muerte por sumersión durante este período lo que representa 1,56 muertes por cada 100 mil habitantes.

Datos recogidos del Instituto Anatómico Forense de Madrid en 1996, indican un total de 1075 muertes violentas, siendo 10 el número de fallecidos por sumersión. Lógicamente estas cifras aumentan en las zonas de costa, y así el Instituto Anatómico Forense de Cartagena en el período de 1994 a 1997 inclusive (Pérez Pujol, 1997), sobre el total de 423 muertes de etiología violenta, el número de casos de sumersión fue de 62 (14,65% de muertes violentas) de las cuales el predominio era masculino en una proporción 6,75 a 1.

Por lo que se refiere a la edad, el mayor número de sumersiones para este período lo comprendía el intervalo de 31 a 40 años (19,35%) al que le seguía el intervalo de 61 a 70 años (16,12%) y el de 71 a 80 años (16,12%).

En cuanto a la tasa anual, en 1995 el porcentaje de muertes por sumersión fue de 12,84%, incrementándose hasta el 18,4% en el año 1996. Se observó una mayor casuística en los meses veraniegos en correspondencia con el incremento de actividades acuáticas y de recreo llevadas a cabo en el mar durante la época estival.

Recientemente, el diario El País publicaba en su edición de 19 de julio de 2013 las cifras de ahogados en España durante el período 2006-2011 recogidas por el Instituto Nacional de Estadística (**Figura 2**).



**Figura 2.** Ahogados en España durante 2006-2011

Como se desprende del diagrama, al cobrarse alrededor de 450 vidas al año entre personas de todas las edades (461 en 2011 y 432 en 2010), el ahogamiento es, en España, la segunda causa de mortalidad en accidentes después de los siniestros de tráfico.

Más recientemente, el profesor Palacios Aguilar ha realizado estudios de las personas fallecidas en el medio acuático durante los meses de verano de los años 2012 y 2013, a partir de las noticias publicadas en medios de comunicación digitales (periódicos, revistas, canales de televisión y radio) regionales y nacionales. En estos estudios sólo se han analizado las noticias en relación a actividades de ocio y tiempo libre, quedando fuera del estudio los casos relacionados con la inmigración ilegal (el intento de alcanzar la costa española en patera), los accidentes laborales, como los que pueden sufrir los pescadores profesionales, o grandes catástrofes como inundaciones o riadas.

Así durante los meses de junio, julio, agosto y septiembre de 2013 murieron en España en el medio acuático 155 personas, 28 en junio, 70 en julio y 57 en agosto. La mayoría de las muertes en el medio acuático se da en hombres, el 79% (122 casos), mientras que en mujeres

son el 21% restante (33). Este reparto coincide con lo sucedido en 2012 y con otras estadísticas a nivel nacional e internacional.

El reparto por edades es diverso, ningún grupo de edad queda libre de morir en el medio acuático, como puede verse en la siguiente tabla:

Grupos de edad	Nº muertes	Porcentajes
0 – 9 años	17	11 %
10 – 19 años	15	10%
20 – 29 años	8	5 %
30 – 39 años	11	7 %
40 – 49 años	14	9 %
50 – 59 años	19	12 %
60 – 69 años	25	16 %
70 – 79 años	24	15%
80 – 89 años	13	8%
90 – 99 años	2	1%
No se dice	7	5 %

**Tabla 3.** Muertos en medio acuático en España, en junio, julio y agosto de 2013 por actividades de ocio y tiempo libre. Distribución por edades.

Si analizamos la edad de los ahogados, los datos son muy claros y contundentes. Son las edades extremas de la vida donde se reúnen un mayor número de muertes y es evidente que de 0 a 9 años y por encima de 60 años son las edades más sensibles a problemas relacionados con el medio acuático.

El espacio acuático en el que ocurre la muerte es diverso, aunque destaca negativamente la playa con más del 50% de los casos, sin contar otro 3% que sucede en el mar en zonas sin playa. Es evidente que las playas y el mar acogen durante el verano al mayor número de usuarios y también representan los lugares donde se producen las mayores situaciones de riesgo. Pero no debemos olvidar que España es un país con miles de embalses, canales, ríos y lagos, en los que también se disfruta del medio acuático; y tampoco podemos olvidar que España cuenta con más de 400.000 piscinas. El reparto ha sido el siguiente:

Espacio acuático	Número	Porcentaje
Playa	80	52 %
Mar (zonas sin playa)	5	3 %
Piscina	31	20,6%
Río	22	14 %
Embalse	8	5 %
Canal de trasvase	3	2 %
Estanque, acequia	2	1 %
Puerto	1	0,6 %
Balsa de riego	1	0,6 %
Pozo	1	0,6 %
Aljibe	1	0,6 %

**Tabla 4:** Muertos en medio acuático en España, en junio, julio y agosto de 2013 por actividades de ocio y tiempo libre. Distribución por espacios acuáticos.

En cuanto a comunidades autónomas, la clasificación se presenta así:

Comunidad Autónoma	Número	Porcentaje
Andalucía	31	20 %
Comunidad Valenciana	25	16 %
Cataluña	21	13,5 %
Galicia	17	11 %
Baleares	10	6,5 %
Castilla-León	7	4,5 %
Murcia	7	4,5 %
Aragón	6	4 %
Canarias	6	4 %
Castilla-La Mancha	5	3 %
Extremadura	4	2,5 %
País Vasco	4	2,5 %
Asturias	3	2 %
Cantabria	3	2 %
Madrid	3	2 %
Navarra	2	1 %
Melilla	1	0,6 %

**Tabla 5:** Muertos en medio acuático en España, en junio, julio y agosto de 2013 por actividades de ocio y tiempo libre. Distribución por comunidades autónomas.

La inmigración ilegal, el intento de alcanzar la costa española en pateras, deja cada año un elevado número de muertos fundamentalmente en las zonas del Estrecho y Canarias. La APDHA (La Asociación Pro Derechos Humanos de Andalucía) daba a conocer el 28 de noviembre de 2013 las cifras recogidas de personas muertas y desaparecidas cuando intentaban llegar a España durante los años 2010, 2011 y 2012, siendo respectivamente 138, 198 y 225.

#### 1.2.4. Etiología Médico-Legal

Se conocen 3 formas etiológicas, si bien las dos primeras que se citan son las únicas que tienen una incidencia real.

- 1.- Sumersión accidental
- 2.- Sumersión suicida
- 3.- Sumersión homicida

Antes de desarrollar cada una de las formas es importante destacar que el establecimiento de la etiología médico-legal de la asfixia por sumersión ofrece una gran dificultad en la práctica, excediendo en muchos casos las posibilidades con las que cuenta el patólogo forense. Por ello es totalmente necesaria una colaboración más estrecha con los agentes policiales, a efectos de dar una adecuada respuesta a esta cuestión (Romero Palanco, 2007).

##### 4.1.- Sumersión accidental

Es la más frecuente de todas y se produce por caída accidental entre las que se incluyen las actividades profesionales o por imprudencias natatorias, teniendo un pico de máxima incidencia en los meses de verano (Gabbe et al. 2005), en niños e individuos jóvenes (Runyan et al. 2005), y en ancianos (Kido et al. 2005). Así la mayor incidencia se presenta en menores de 5 años y en jóvenes con edades comprendidas entre 15 y 24 años.

Se observa un predominio de varones sobre mujeres y cada vez más una relación de consumo de alcohol (Gulliver et al., 2005). Se incluyen en este apartado todas las muertes derivadas de accidentes colectivos (Gamero, Romero et al., 1997), tales como naufragios, inundaciones, accidentes aéreos, de automóvil con caída secundaria al mar y deportivos.

##### 4.2.- Sumersión suicida

Presenta una incidencia significativamente menor que la etiología accidental (Avis, 1993; Byard et al., 2001). De todos los procedimientos suicidas, la asfixia por sumersión no constituye un procedimiento de elección en nuestro medio, siendo ampliamente sobrepasado



por la precipitación, la ahorcadura, el empleo de tóxicos y, en algunos países, por el uso de armas de fuego. Algunas publicaciones señalan una mayor incidencia en determinadas áreas geográficas en las que existe cierta cercanía de la costa, grandes lagos o ríos (Gamero et al., 1997; Lucas et al., 2002). Las estadísticas evidencian un predominio en el sexo femenino y en grupos de edad mayores que en los casos de etiología accidental además de su predominio en épocas frías del año. Hoy en día la mayoría de los autores coinciden en señalar que esta forma suicida supone del 10 al 20% del total de las sumersiones (Giersten, 1970) y que representan el 1% de las formas de suicidio (Wirthwein et al., 2002).

### 4.3.- Sumersión homicida

Es muy poco frecuente en el adulto ya que requiere una gran desproporción de fuerzas entre el agresor y la víctima, o bien que esta última haya sido previamente privada de sentido por traumatismos o mediante la administración de tóxicos que le anulen la capacidad defensiva y natatoria. Por su difícil demostración obliga a extremar la precaución en la búsqueda de lesiones previas de diverso tipo y restos de tóxicos depresores del SNC, planteando la duda en el diagnóstico (Griest et al., 1989).

Se ha comprobado que este tipo de sumersión, presenta una mayor incidencia en niños, discapacitados psíquicos y en sujetos que presentan especial vulnerabilidad, tal y como suscriben los autores Hinojal y Martínez, 1986; Kemps et al., 1994 y Fornes et al., 1995.

### 4.4.- Otras

Dentro de este apartado incluimos la sumersión suplicio. La pena de muerte por sumersión solo tiene un interés histórico ya que en la actualidad no es aplicada por ningún país. La última referencia histórica es apuntada por Reverte (1983) entre los indígenas del Mato Grosso como forma de eutanasia con los ancianos de la tribu.

### 1.2.5. Fisiopatología y mecanismos de muerte

La sumersión encuadra un mecanismo de muerte en el que el denominador común es la hipoxia o la anoxia generada por una defectuosa oxigenación de la sangre producida al respirar en un medio líquido, lo cual puede suceder por reducción del área pulmonar de intercambio y por ocupación del espacio alveolar por líquido. Comparte mecanismo fisiopatológico con muchos tipos de muerte por hipoxia o anoxia lo cual hace que sea un síndrome complejo en su producción y por ende en su explicación y en su comprensión (Salomez et al. 2004).

Los mecanismos exactos de la asfixia por sumersión en humanos siguen siendo desconocidos en muchos aspectos. Buena prueba de ello son las diferentes clases o tipos de sumersión que, bajo esta común e inespecífica denominación, podemos encontrar en la bibliografía especializada.

#### Antecedentes:

Las primeras referencias de carácter experimental en animales (perros) sobre la sumersión se deben a Brouardel y Vibert y Brouardel y Loye llevadas a cabo en 1880 y 1889, respectivamente. Estos autores evidenciaron que en la sumersión tiene lugar el paso de agua a los pulmones y al torrente circulatorio produciendo una dilución de la sangre y cambios osmóticos en ésta que desempeñarían un importante papel en el mecanismo de la muerte.

Las opiniones clásicas consideraban como único mecanismo fisiopatológico de la sumersión la ocupación de las vías aéreas por un medio líquido y la consiguiente falta de oxígeno, lo que se traduce en una defectuosa oxigenación de la sangre. Según esta teoría clásica, la penetración de la columna líquida en las vías respiratorias, llegando a inundar los alvéolos pulmonares, conlleva unos efectos mecánicos de carácter inmediato. De una parte, se va a mezclar el aire residual pulmonar con el agua y con sustancias y secreciones pulmonares, dando lugar a la formación de una materia espumosa que ocupará las vías respiratorias, pudiendo exteriorizarse a través de la boca y de los orificios nasales, dando lugar al denominado “hongo de espuma”. De otra parte, la presión ejercida por la columna líquida sobre el propio aire

residual existente en los pulmones, provocará lesiones en el tejido pulmonar, que constituyen parte de los hallazgos anatomopatológicos.

Posteriormente, Swan et al. (1947, 1949, 1951, 1956) concluyeron a partir de sus experimentaciones en animales, que el principal mecanismo fisiopatológico de la muerte por sumersión lo constituyen los trastornos electrolíticos producidos por la entrada de volúmenes de agua en la circulación a través de los pulmones, que tienen como consecuencia un fallo miocárdico agudo. Estos experimentos llevados a cabo en perros vivos enjaulados y sumergidos, no reflejaba con exactitud lo que ocurre con el ser humano en el que la sumersión inicialmente es intermitente, por lo que el proceso de agonía se prolonga y los efectos fisiopatológicos son distintos.

En definitiva, Swann y sus colaboradores evidenciaron con sus experiencias que lo que se produce en una muerte por sumersión es una absorción masiva de agua a través de las membranas alveolares que podría aumentar hasta un 70% el volumen original sanguíneo en 3 minutos. Esta hemodilución se traduce en una anemia relativa y en una hipoxia del miocardio y secundariamente una rápida sobrecarga de la capacidad cardíaca por la hipovolemia producida.

Para Rivers et al. (1970) la primera fase de la sumersión accidental empieza con la asfixia, debido a laringoespasma (10 a 15 % de casos) o aspiración de agua y la segunda fase se caracteriza porque el agua y los electrolitos cambian en la sangre.

Más tarde otros autores, y el propio Rivers, comprobaron que las modificaciones de la fisiopatología originadas en la sumersión de agua dulce, difieren de aquéllas que se producen en el agua del mar, y que estas modificaciones están condicionadas por la osmolaridad del líquido inspirado.

Lo anterior fue corroborado por los experimentos llevados a cabo por Bhardwaj et al. en 1982 que sumergieron monos en agua dulce y en agua de mar y comprobaron que la aspiración de agua de mar produjo una bradicardia inmediata que a alguno de los monos les causó la muerte, mientras que la aspiración de agua dulce produjo fibrilación ventricular. El mayor número de muertes a igualdad de volumen de agua aspirado, sucedió cuando la

aspiración fue de agua de mar, sobreviviendo mayor número de los especímenes cuando la aspiración era de agua dulce.

Todos los trastornos electrolíticos comentados, juegan un importante papel en el mecanismo de la muerte, pero para autores como Di Maio (1989) y Knight (1996), deben de tenerse en cuenta también las consecuencias de la anoxia o de la hipoxia cerebral irreversible. Otros autores como Orłowski et al. (1989), llegan a la conclusión de que el fallo es independiente de la concentración de electrolitos del agua, pero no de la duración de la agonía inducida por la anoxia.

Más recientemente, Layon y Modell (2009) afirman que 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, y se ha comprobado que la mayoría de las víctimas de sumersión no aspiran líquido suficiente para causar cambios potencialmente mortales en el volumen de la sangre.

También se ha comprobado que las concentraciones séricas de los electrolitos no sufren cambios importantes tras la aspiración de volúmenes considerables de agua dulce o salada.

Así, a pesar de que se había pensado que la parada cardiovascular en los ahogados se debía a las graves alteraciones electrolíticas asociadas a grandes volúmenes de líquido inspirado, hoy en día se piensa que la mayor parte de los efectos cardiovasculares de la asfixia por sumersión son fundamentalmente secundarios a la prolongada hipoxia (Bierens et al., 2002; Oehmichen et al., 2008).

### Mecanismos de muerte:

Son varios los mecanismos de muerte por sumersión que podemos distinguir:

- 1- Sumersión inhibición
- 2- Síndrome de sumersión secundario
- 3- Sumersión asfixia o sumersión típica

### 1.- Sumersión Inhibición

A este tipo de sumersión, se le han asignado varias denominaciones: hidrocuación, síndrome de inmersión, ahogamiento seco o ahogados blancos (por la palidez que presentan estos fallecidos). Se ha citado clásicamente que entre un 10 y un 15% de los cuerpos recuperados del agua no tenían líquido en los pulmones, en este sentido, Cocheiro y Suarez (1998) afirman que la sumersión por inhibición representa de un 10 a un 15% de los casos de sumersión. En estos casos la muerte no sobreviene por un mecanismo hipóxico sino por laringoespasmos o por inhibición cardíaca.

El espasmo laríngeo se produce por la entrada de una pequeña cantidad de agua fría en la laringe, tráquea o incluso en las fosas nasales (Gisbert 1983, Gordon et al. 1988). La laringe o las cuerdas vocales en la garganta se contraen, sellando el tubo respiratorio y evitando la entrada de agua en los pulmones. Debido al laringoespasmos, el agua entra en el estómago, es la fase inicial del ahogamiento y muy poca agua entra en los pulmones. En la mayoría de las víctimas, el laringoespasmos se relaja algún tiempo después y el agua puede entrar en los pulmones y causar un “ahogamiento húmedo”. Sin embargo, aproximadamente el 7-10% de las víctimas mantienen esta contracción muscular hasta un paro cardíaco. Esto fue llamado “ahogamiento seco”, ya que no entra agua en los pulmones. En patología forense, el agua en los pulmones indica que la víctima aún estaba viva en el momento de la inmersión. La falta de agua en los pulmones puede ser un ahogamiento seco o indica una muerte antes de la inmersión.

La inhibición cardíaca puede ocurrir por varios hechos:

- Intenso dolor abdominal ocasionado por el impacto del cuerpo con el agua.
- Shock anafiláctico de origen digestivo en el estado postprandial.
- El reflejo inhibitorio cardiorrespiratorio y la congestión por acción del frío.

Ambos mecanismos (laringoespasmos e inhibición cardíaca) no pueden evidenciarse en la autopsia y el diagnóstico se realiza tras analizar las circunstancias del hecho y la exclusión de otras causas de muerte. Los hallazgos más significativos y que caracterizan a este tipo de mecanismo es la ausencia de los signos típicos de la muerte por sumersión.

## 2.- Síndrome de sumersión secundario

También llamado *pseudosumersión* o *casi abogamiento*, se debe a cuadros de infección secundaria causados por contaminantes del fluido inhalado, que producen complicaciones pulmonares, miocárdicas y cerebrales. Se trata por lo general de individuos parcialmente recuperados de un proceso de sumersión que en las primeras 24 horas realizan un cuadro de distress respiratorio, hipotensión, arritmias cardíacas y edema cerebral, que en la mayor parte de los casos evoluciona hasta la muerte, a pesar de las medidas terapéuticas que se empleen.

Estos dos primeros tipos descritos son los conocidos en literatura anglosajona como *sumersión atípica* o *neardrowning*.

## 3.- Sumersión asfixia o Sumersión típica

Es la forma de sumersión más conocida, más estudiada y la más frecuente. Representa del 70 al 80% de todas las sumersiones.

En este tipo de sumersión, la muerte por asfixia en el agua parece producirse en un plazo muy breve, así Taylor en 1881 habla de 4 a 5 minutos, Brouardel en 1897 considera un período de 4 a 8 minutos, Lacassagne en 1906 estimó que 5 minutos como máximo y Thoinot opinaba que era de 3 a 4 minutos.

Sin embargo, se han publicado muchos casos, un gran número de ellos de niños o bebés, que demuestran que es posible la supervivencia sin déficit neurológico después de una sumersión prolongada en agua muy fría o helada. En este sentido, Bolte et al. (1988), describe el caso de un niño que estuvo sumergido durante 66 minutos.

Este hecho se explica porque la sumersión en agua fría induce a la bradicardia y a la vasoconstricción intensa y generalizada que respeta los vasos que irrigan el cerebro y el corazón, causando todo ello una protección cerebral contra la hipoxia. Por el contrario, en agua templada se puede producir anoxia cerebral irreversible tras sólo 3 a 10 minutos de sumersión, como indicaron Di Maio y Dana en 2003.

La sumersión asfixia pese a ser la más estudiada ha sido mal conocida, considerándose al principio que consistía en la entrada de agua al tubo digestivo y más tarde en un simple mecanismo de obstrucción de las vías respiratorias.

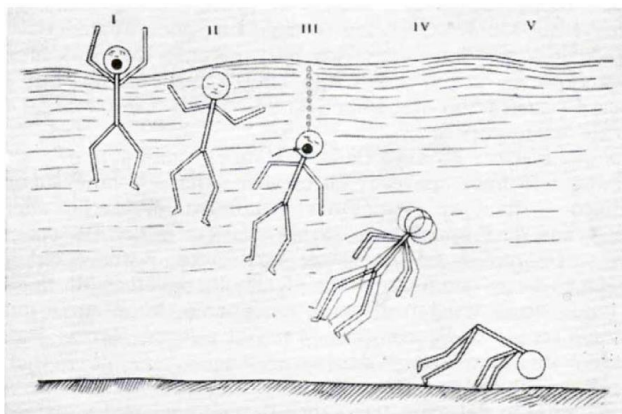
Uno de los esquemas más acertados es el del profesor Gisbert Calabuig (1983), quien distingue entre asfixia simple y asfixia con paso de líquido a los pulmones:

*a. Asfixia simple*: El sujeto traga importantes cantidades de agua que pasan mayoritariamente al estómago produciéndose un espasmo laríngeo reflejo. Consecuentemente hay una hipoxia cerebral que ocasiona la pérdida de conciencia y parálisis del centro respiratorio con disminución progresiva del pH y establecimiento de una acidosis incompatible con la vida. Pese a lo aparatoso del cuadro, es de los tipos de sumersión el más favorable para ser recuperado totalmente sin secuelas graves durante la fase de hipoxia simple, ya que los pulmones permanecen "secos" y la reanimación es posible. En la segunda fase, tras la hipoxemia arterial persistente y la acidosis consecutiva, la parálisis del aparato respiratorio se hace irreversible y la muerte es definitiva (Modell, 1971)

*b. Asfixia con paso de líquido a los pulmones*: Es la forma de sumersión más conocida, más estudiada y la más frecuente.

### Fases en la muerte por sumersión

Brouardel a finales del siglo XIX experimentó con perros y estableció 5 fases en el proceso de sumersión. Posteriormente Simonin en 1962 traslada esta evolución de fases, usando un esquema de Ponsold (*Fig. 3*) a lo que sucede en el hombre, distinguiendo las siguientes fases, que son también recogidas por Zangani et al. (1985) y por Vallejo y Azparren en 2012.



**Figura 3.** Esquema de Ponsold, fases de la sumersión-asfixia

I.- Aspiración de aire. Sería una primera fase o de sorpresa, en la que se realiza una profunda aspiración fuera del agua. Duración de 5 a 10 segundos.

II.- Apnea voluntaria. En esta fase de apnea el individuo deja de respirar para evitar la penetración del agua. Se mantiene hasta que las bajas concentraciones de oxígeno y la hipercapnia le obligan a una inspiración forzada, por estimulación de los centros respiratorios. También se produce laringoespasmio involuntario por la presencia de agua en vía aérea. Esta fase dura 1 minuto.

III.- Fuertes inspiraciones involuntarias con penetración del agua y espiración del aire. Esta es la fase de disnea. La hipoxia y la hipercapnia producida en la fase anterior estimulan al centro bulbar respiratorio aumentando la frecuencia de movimientos respiratorios con lo que la víctima traga gran cantidad de agua. Duración de un minuto.

IV.- Paro respiratorio y convulsiones asfícticas (convulsiones debidas a la falta de aire y a la suspensión de la respiración) , en esta fase el líquido continúa penetrando de forma discontinua a las vías respiratorias. Esta fase dura 1 minuto.

V.- En la fase terminal se produce pérdida de los signos vitales, duración total entre 3 y 4 minutos. No hay intercambio gaseoso (obstrucción laríngea). Al caer la tensión arterial de oxígeno, cede el laringoespasmio y la víctima respira activamente el líquido, precedido de una pausa respiratoria pre terminal. Finalmente se produce insuficiencia respiratoria y anoxia por la obstrucción de la vía respiratoria y puede producirse la muerte.



Una víctima consciente tras sumergirse en el agua puede contener voluntariamente la respiración durante un tiempo, pero el reflejo de la respiración aumenta hasta que la víctima trata de respirar, incluso cuando está sumergido.

El reflejo de la respiración en el cuerpo humano está débilmente relacionada con la cantidad de oxígeno en la sangre, pero fuertemente relacionada con la cantidad de dióxido de carbono. Durante la apnea, el oxígeno en el cuerpo es utilizado por las células, y se excreta en forma de dióxido de carbono. Por lo tanto, el nivel de oxígeno en la sangre disminuye, y aumenta el nivel de dióxido de carbono. El aumento de los niveles de dióxido de carbono conduce a un reflejo de la respiración hasta el *punto de ruptura de apnea*, en la que la víctima ya no puede mantener voluntariamente su respiración. Esto ocurre normalmente con una presión parcial de dióxido de carbono de 55 mm de Hg, pero puede diferir significativamente de un individuo a otro.

Un aspecto importante es la *temperatura del agua de sumersión*. El agua fría tiene una serie de efectos sobre la sumersión y la supervivencia. La hipotermia (pérdida de la temperatura corporal central) es la más conocida, pero el cuerpo puede soportar temperaturas bajas durante un tiempo considerable ya que se protege a sí mismo con un mayor movimiento de la sangre, para de ese modo proteger el corazón.

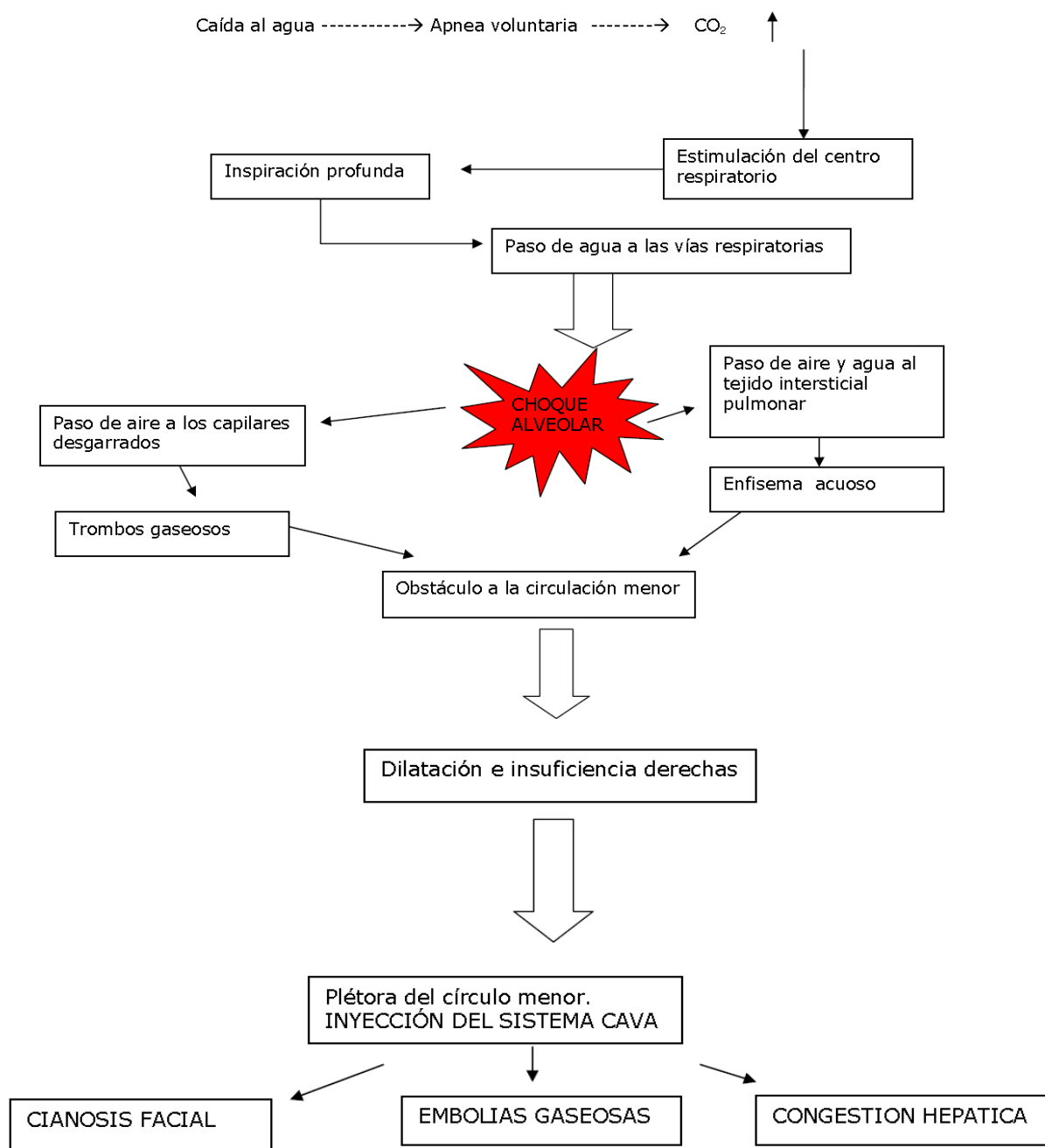
El calor se transfiere muy bien a través del agua, y por lo tanto el calor del cuerpo se pierde más rápidamente en el agua. Sin embargo, se ha comprobado que una temperatura del agua de 10 °C (50 °F) puede llevar a la muerte en una hora, y temperaturas del agua que se acercan a la congelación pueden causar la muerte en tan sólo 15 minutos. Esto se debe a que el agua fría puede tener, además de la hipotermia, otros efectos letales en el cuerpo.

La causa real de la muerte en aguas frías o muy frías suelen ser reacciones corporales letales. Alrededor del 20% de las víctimas mortales de ahogamiento en aguas frías, mueren a los 2 minutos por choque térmico (respiración rápida y no controlada que causa la inhalación de agua, aumento masivo de la presión arterial y la tensión cardíaca que conduce a un paro cardíaco), otro 50% muere en 15 a 30 minutos por incapacitación por frío (pérdida del uso y control de las extremidades y manos para nadar o agarrar, ya que el cuerpo de manera protectora cierra los músculos periféricos de las extremidades para proteger el corazón).

### Fisiopatología

En la sumersión tiene lugar el paso de agua a los pulmones y al torrente circulatorio produciendo una dilución de la sangre y cambios osmóticos en ésta que desempeñarían un importante papel en el mecanismo de la muerte. El esquema de Sibón (2009) recoge todo el proceso (**Figura 4**). Así, en los primeros instantes de la asfixia hay una:

- Apnea voluntaria hasta que la concentración de CO<sub>2</sub> en la sangre estimula el centro respiratorio y obliga forzosamente a la víctima a realizar una inspiración profunda, con el paso de una columna líquida a las vías aéreas.
- El agua comprime y empuja la columna aérea del aire residual pulmonar, originando un choque alveolar con rotura de los alvéolos y paso del aire al tejido intersticial pulmonar, seguido del agua (enfisema acuoso).
- Parte del aire penetra también en los capilares desgarrados, produciendo trombos gaseosos.
- Se origina así un obstáculo a la circulación menor, que da lugar a la dilatación primero e insuficiencia después del ventrículo derecho, origina plétora del círculo menor (síndrome de plétora pulmonar: cuando existe un cortocircuito izquierda-derecha que sobrecarga el círculo pulmonar), y por vía retrógrada, inyección en el sistema cava. Esto se traduce en el territorio de la cava superior por la cianosis facial y congestión cerebral, y en el territorio de la cava inferior por la congestión del hígado (hígado cardíaco).
- Simultáneamente hay también paso del medio de sumersión al árbol circulatorio, lo que origina modificaciones físico-químicas de la sangre (hidremia) que pueden jugar asimismo un papel en la causa de la muerte.



**Figura 4.** Fisiopatología de la asfixia por sumersión. Tomado de Sibón (2009)

Sin embargo, las investigaciones de Swann y Spallford (1951) llevaron a la conclusión de que la propia presión osmótica del líquido de sumersión jugaba un importante papel, lo que daría lugar a diferentes mecanismos de la muerte para la sumersión en agua dulce y en agua de mar.

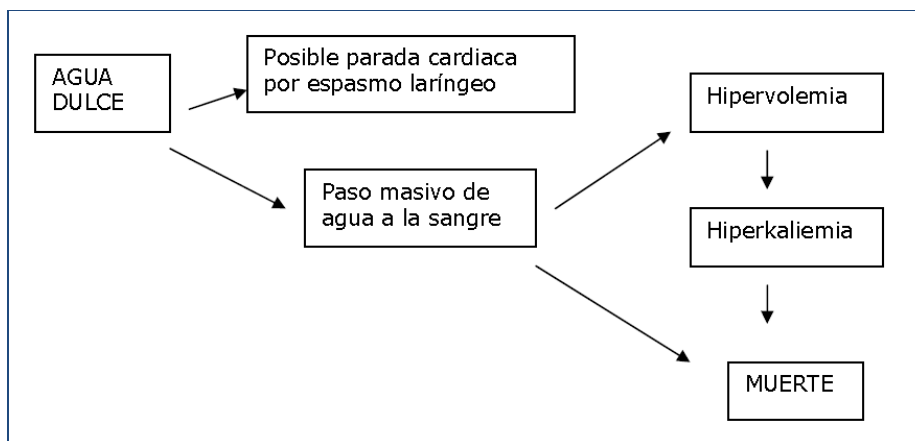
Teniendo en cuenta que los dos principales medios de sumersión son el agua dulce (piscinas, lagos, embalses ríos, etc.) y el agua salada proveniente del mar, distinguiremos los procesos fisiopatológicos que suceden en cada uno de ellos.

### 1. Sumersión en agua dulce

El agua dulce es hipotónica con respecto al plasma y en ella se produce un paso de agua al torrente circulatorio a través de la membrana alveolo-capilar con una consiguiente hemodilución brusca, lo cual determina profundas variaciones electrolíticas que desembocan en una fibrilación ventricular casi irreversible y la muerte.

El antiguo convencimiento de que la sumersión es exclusivamente una forma de asfixia debida a la ausencia de aire en los pulmones por estar las vías respiratorias ocupadas por el líquido de sumersión, es hoy incorrecto. El verdadero motivo es una combinación de una absorción masiva de agua que origina una hipervolemia brusca y un desequilibrio osmótico y electrolítico (dilución de los electrolitos circulantes y aumento del potasio por la ruptura de los hematíes).

Como consecuencia, la causa de la muerte se debe a una combinación de fallo cardíaco agudo por insuficiencia para impulsar el gran volumen circulante y las alteraciones de la contractilidad cardíaca secundarias a la hiperpotasemia que suelen cursar con fibrilación ventricular. También, hay que señalar, que la hemodilución conlleva una disminución relativa en la concentración del plasma de Na, Cl, Ca y albúmina. Todos estos fenómenos ocurren en tan breve espacio de tiempo que no puede intervenir el mecanismo asfíctico. Lo cual viene a ser representado en el siguiente esquema tomado de Knight (1976) (*Figura 5*).



**Figura 5:** Esquema de Knight (1976). Fisiopatología sumersión en agua dulce.

## 2. Sumersión en agua salada

En este caso, debido a la hipertonicidad del agua de mar con respecto al plasma, los electrolitos en el agua de mar aspirada atraen plasma de la circulación sanguínea hacia los alveolos pulmonares, dando lugar a una hemoconcentración en los vasos sanguíneos con elevación de hemoglobina, hematocrito y albúmina y un riesgo elevado de tromboembolismo debido a la viscosidad de sangre aumentada. El pulmón aumenta considerablemente de peso debido a la masa líquida que contiene, constituida por una mezcla de agua de mar y de líquido de edema. Al mismo tiempo, se produce el paso de electrolitos desde el agua de mar a la sangre originando hipernatremia. Por otro lado, disminuye el volumen sanguíneo (hipovolemia) y la hipokalemia da lugar a bradicardia, que, junto con la hipoxia y la hipercapnia, dan lugar a la muerte. En este caso, no se produce una fibrilación y por ello la supervivencia es más prolongada (**Fig. 6**).

En el caso del agua salada, la naturaleza hipertónica del agua de mar en comparación con el plasma, hace que haya un menor trasvase de líquido a través de la barrera alveolo-capilar, siendo menos intensa y aguda la hemólisis y las alteraciones electrolíticas. No obstante, si la sumersión se prolonga el tiempo necesario sobrevienen fenómenos electrolíticos irreversibles.

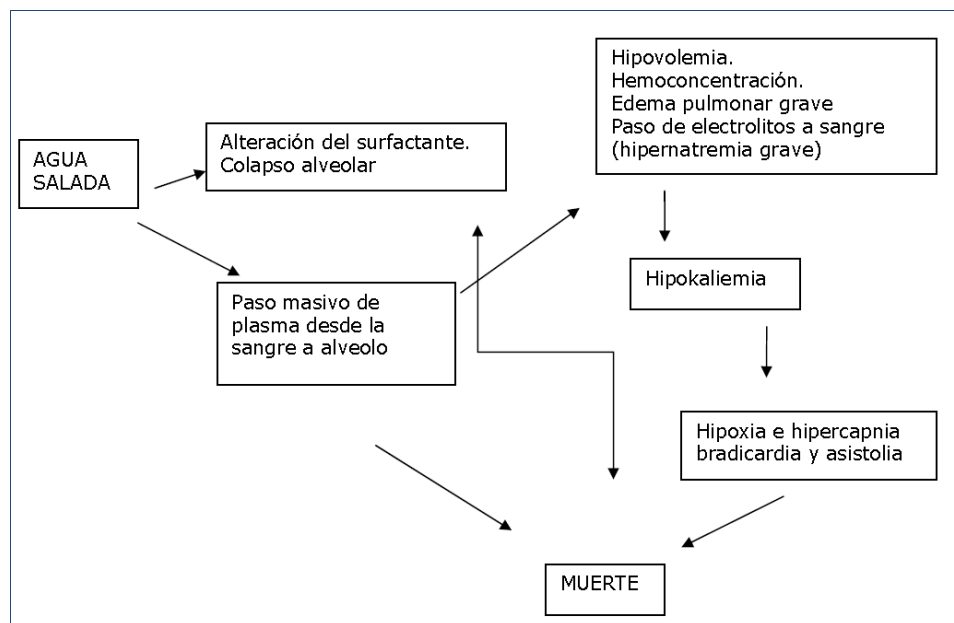


Figura 6: Fisiopatología sumersión en agua salada.

SUMERSIÓN AGUA SALADA	SUMERSIÓN AGUA DULCE
Hipertónica con respecto al plasma	Hipotónica con respecto al plasma
Hipovolemia (disminución volumen sanguíneo)	Hipervolemia ( aumento volumen sanguíneo)
No hemólisis → Hipokalemia → Bradicardia	Hemólisis → Hiperkalemia → Fibrilación ventric
Hemoconcentración: <ul style="list-style-type: none"> <li>- Aumento hemoglobina y hematocrito</li> <li>- Hipernatremia</li> <li>- Aumento de albúmina y calcio</li> <li>- Riesgo de tromboembolismo por aumento de viscosidad de la sangre</li> </ul>	Hemodilución: <ul style="list-style-type: none"> <li>- Disminución hemoglobina y hematocrito</li> <li>- Hiponatremia → Insuficiencia cardíaca</li> <li>- Disminución albúmina y calcio</li> <li>- No riesgo de tromboembolismo</li> </ul>
Bradicardia	Fibrilación ventricular
Muerte	Muerte

Figura 7. Cuadro resumen sumersión en agua dulce y agua salada.

Así, a pesar de que se había pensado que en los ahogados la parada cardiovascular se debía a las graves alteraciones electrolíticas asociadas a grandes volúmenes de líquido inspirado, hoy en día se cuestiona esta teoría debido a varios estudios y experimentaciones realizadas.

En este sentido, Layon y Modell (2009) afirmaron que se requiere la aspiración de un gran volumen de fluido para que se pueda producir un cambio significativo en el volumen de la sangre del paciente. Si se aspira más de 11 ml/kg de líquido hipotónico, el volumen de sangre aumentará en proporción directa a la cantidad aspirada (Modell y Moya, 1966; Layon y Modell, 1992). Si el paciente es resucitado con éxito, este fluido absorbido se redistribuirá rápidamente y la hipovolemia puede ocurrir al cabo de 1 hora (Tabeling y Modell, 1983). Sin embargo, cuando se aspira una cantidad significativa de agua de mar hipertónica, la hipovolemia puede sobrevenir rápidamente (Modell et al., 1967).

Pero hay que tener en cuenta que la mayoría de las víctimas de sumersión no aspiran líquido suficiente para causar cambios potencialmente mortales en el volumen de la sangre. La muerte por sumersión en humanos supone una aspiración de sólo 2-4 ml/kg, como afirman Oehmichen et al. (2008) al analizar 31 casos de sumersión (23 casos en agua dulce y 8 casos en agua salobre) de los cuales 21 de los casos fueron mortales y 10 sobrevivieron a la sumersión. Casi todos los casos (96%) revelaron una reducción del pH debido a la acidosis hipóxica, y sólo dos casos (6,5%) mostraron una ligera hiperpotasemia. La concentración de hemoglobina fue normal en la mayoría de los casos (83%) y ligeramente inferior en los otros (17%), mientras que la concentración de proteínas se redujo ligeramente en la mayoría de las víctimas mortales (80%). Por tanto, llegan a la conclusión de que la muerte por sumersión no se debe ni a la hiperpotasemia ni al aumento de la concentración de hemoglobina debido a la hemólisis provocada por la entrada de agua en el torrente sanguíneo, sino que es el resultado de un proceso hipóxico cerebral. Por consiguiente, no es posible extrapolar los resultados obtenidos en animales a los que se puedan obtener en humanos.

También se ha comprobado que las concentraciones séricas de los electrolitos no sufren cambios importantes tras la aspiración de volúmenes considerables de agua dulce o salada. En este sentido, un trabajo experimental con perros ha demostrado que no se producían importantes cambios persistentes en las concentraciones de los electrolitos séricos con la aspiración de 22 ml/kg o menos, ya sea de agua dulce o salada (Modell y Moya, 1966b; Modell et al., 1967). Sin embargo, la aspiración de esta gran cantidad de agua es muy poco probable en los seres humanos que sobreviven al proceso de sumersión, encontrándose sólo en el 15% de las personas que mueren por esta causa (Modell y Davis, 1969).

Por lo tanto, hoy se piensa que es la hipoxemia y los procesos que ésta desencadena, la causa de la parada cardíaca y la muerte de los ahogados.

De otra parte, experiencias realizadas a mediados del siglo XX, llevan a pensar que, en el mecanismo de la asfixia por sumersión, tenga lugar en agua dulce o en agua de mar, hay un elemento común. En ello juega un importante papel un agente tensioactivo, el surfactante pulmonar, una lipoproteína que reviste los alveolos de los pulmones humanos (Pattle, 1955) y que regula la tensión superficial en aquéllos. Sin este revestimiento el efecto de la tensión superficial reduciría el volumen de los alvéolos más pequeños y aumentaría, por expansión, el de los más grandes.

Cuando el agua, dulce o salada, penetra en los alveolos diluye al surfactante pulmonar y por tanto disminuye su capacidad anticolapsante, lo que ocasiona reducción del tamaño e incluso colapso de los alveolos más pequeños produciéndose un amplio flujo de sangre en los capilares, pero no espacio para el intercambio gaseoso. En los alveolos expandidos, la sangre será rechazada por compresión de los capilares, alterándose también el intercambio gaseoso. La presencia del agua por otra parte, actuando como un irritante, impide la función pulmonar lo que, unido a las alteraciones hidroelectrolíticas, ocasiona rápidamente la muerte.

#### 1.2.6. Exámenes biológicos y tanatoquímicos

El diagnóstico de certeza de una muerte por asfixia por sumersión es uno de los problemas de mayor complejidad en Patología Forense, para el que aún hoy no se dispone de un método o procedimiento diagnóstico cuyos resultados sean irrefutables. Puede afirmarse, como lo hacen Piette y De Letter (2006), que el test diagnóstico ideal como prueba definitiva de asfixia por sumersión todavía está por ser establecido.

Los principios generales sobre los que se sustentan los diferentes procedimientos diagnósticos, complementarios a los resultados de la autopsia, se basan en las consecuencias inmediatas que origina el líquido de sumersión al introducirse en el organismo, haciendo penetrar, igualmente, los diferentes elementos químicos y partículas que se encuentran en el



mismo que van a ser el fundamento de estudio de los exámenes diagnósticos biológicos y tanatoquímicos.

Sin embargo, estos hallazgos no son específicos, como se puede observar en otras situaciones (sobredosis de drogas, muerte cardíaca) y, además, su ausencia no puede excluir la posibilidad de ahogamiento. De ello se desprende que en los casos de sumersión se debe realizar una completa autopsia con el fin de catalogar (y posteriormente explicar satisfactoriamente) todas las lesiones presentes, para determinar si en efecto, la muerte viene después de la inmersión en el agua, y para ver si alguna enfermedad natural, tales como la enfermedad isquémica del corazón, enfermedad cerebrovascular y la hipertensión, pueden haber contribuido, precipitado, o incluso causado la muerte.

Un examen toxicológico completo es también muy importante para determinar si el fallecido se encontraba bajo la influencia de alcohol u otras drogas en el momento de la muerte. Finalmente, en situaciones ambiguas, la estimación conjunta de evidencias circunstanciales es de una gran importancia para la conclusión de la causa de la muerte (ahogamiento, enfermedad natural, etc.) y la etiología de la muerte (accidente, suicidio u homicidio).

### 1.2.6.1. Marcadores biológicos

Como ya se ha indicado en líneas precedentes, durante el proceso de la sumersión y tras la penetración del agua se van a producir lesiones en las membranas alveolares, a través de las cuales van a pasar a la circulación sanguínea, tanto el medio de sumersión como las pequeñas partículas que se encuentran en suspensión en el mismo.

Este hecho ha sido comprobado por Bajanowski et al. (1998) en animales de experimentación utilizando marcadores de látex, detectados mediante microscopía de fluorescencia, y marcadores de oro empleando microscopía electrónica, demostrándose que los marcadores con diámetros pequeños penetraban en los espacios intercelulares del epitelio alveolar.

Los primeros estudios basados en este principio se deben a Stockis (1909), (1921) y Corin (1909), que utilizaron el plancton cristalino y que fueron pronto abandonados por las

dificultades en la detección del mismo. Tras el abandono de las técnicas de elementos cristalinos el estudio se centró en el análisis de diatomeas.

### Diatomeas

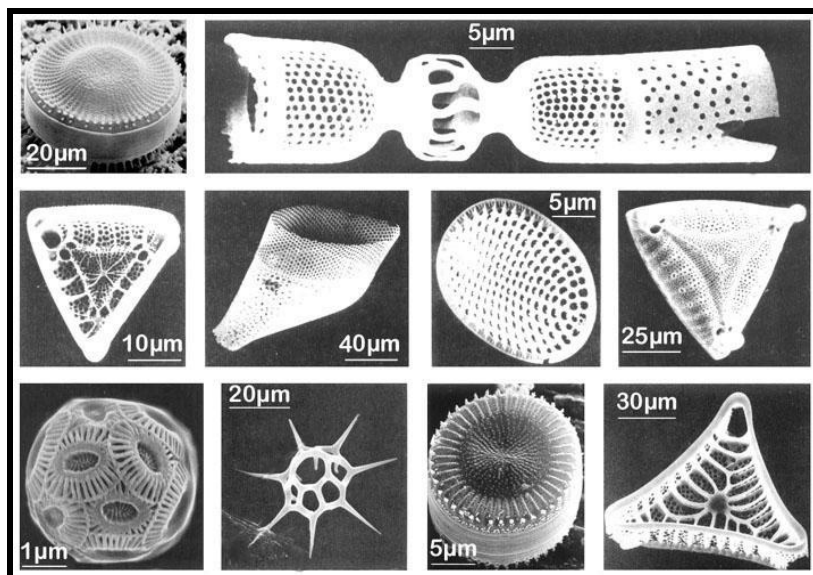
Clásicamente el estudio de las diatomeas se ha descrito como de gran utilidad médico-legal en el diagnóstico de la sumersión. Este estudio tiene tanto partidarios como detractores. Tras la primera descripción de las diatomeas en 1904 por Revenstorf que fue el primero en aplicar su estudio al diagnóstico de la sumersión, se han sucedido un gran número de publicaciones, en torno a la aplicación de las diatomeas en el diagnóstico de la muerte por sumersión, entre las que hemos de destacar las monografías de Ludes y Coste (1996) y de Pollanen (1998), así como la amplia revisión realizada por Lunetta y Modell (2005).

Las diatomeas son algas celulares eucarióticas (Bacillariophyceae), que se encuentran presentes tanto en el agua dulce como en el agua salada, así como en la tierra y en el aire, en general, en todos aquellos lugares donde haya luz suficiente para realizar procesos de fotosíntesis. Su morfología es variable. El tamaño de las mismas varía desde 2  $\mu\text{m}$  a más de 500  $\mu\text{m}$ , midiendo la mayoría de las especies entre 10 y 80  $\mu\text{m}$  de longitud o de diámetro.

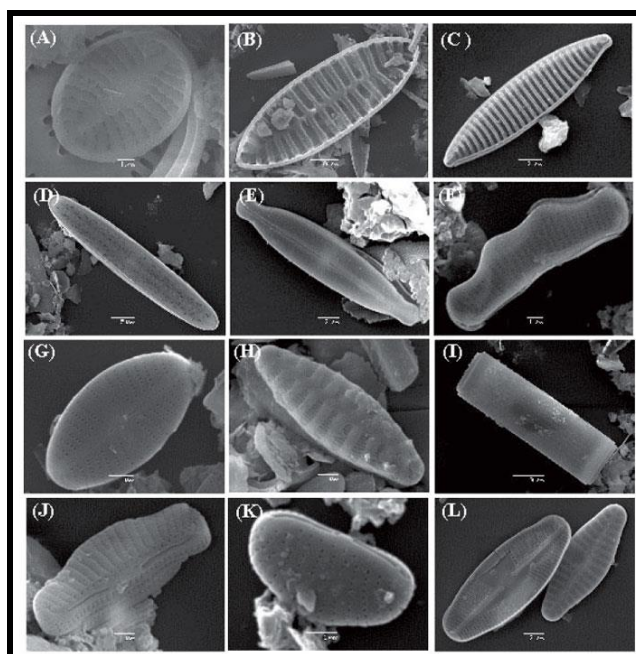
La pared celular contiene una alta cantidad de sílice, denominándose “frústula” a la parte silíceo entera de la diatomea o exoesqueleto, el cual es duro y resistente a la descomposición y a la acción de ácidos fuertes. El frústulo está compuesto por dos piezas principales llamadas valvas. La valva posee numerosos poros que permiten el intercambio de sustancias entre la célula y el medio externo. La disposición de estos poros, así como la forma general de la valva pueden variar notablemente de una especie a la otra y son estas características las que se tienen en cuenta para clasificar taxonómicamente los diferentes grupos de diatomeas.

En Medicina Forense, es de especial interés además de la clasificación taxonómica, la clasificación basada en la salinidad del medio en el que se desarrollan (oligofílicas, mesohalofílicas y polihalofílicas, según la salinidad sea menor de 0,05%, se trate de agua salobre o sea superior a 0,05%, respectivamente).

De todas las especies de diatomeas conocidas (unas 10.000 más o menos) casi la mitad tiene su hábitat en agua dulce y la otra parte en agua salada, aunque hay algunas especies que pueden vivir en ambos medios. (*Figuras 8 y 9*).



*Figura 8.* Selección de diatomeas marinas.



*Figura 9.* Fotografías al microscopio electrónico de barrido de valvas de diatomeas encontradas en los sedimentos de los lagos andinos.

Desde un principio la ventaja del test de diatomeas tuvo su utilidad práctica, en el gran número de cadáveres putrefactos que son descubiertos sumergidos y en los cuales no son posibles otras pruebas que permitan el diagnóstico. Así el frústulo de las diatomeas es prácticamente inalterable, su estructura compuesta por sílice no es afectada por la acción de los organismos descomponedores, de este modo sabemos que persistirá intacto independientemente del estado de conservación en que sea encontrado el cadáver.

Dada la extraordinaria variabilidad de las mismas, el análisis de diatomeas no resulta especialmente fácil, siendo necesario el concurso de un especialista para su adecuada valoración (Ludes, 1996; Hürlimann, 2000).

La aplicación de las diatomeas para el diagnóstico de la asfixia por sumersión se basa en el hecho de que penetrarían en los pulmones conjuntamente con el líquido de la sumersión, y si el sujeto se encuentra vivo, con actividad cardiocirculatoria eficaz, atravesarían el filtro pulmonar y se diseminarían por todo el organismo a través del torrente circulatorio, pudiendo identificarlas en médula ósea, hígado, cerebro o riñones, con la particularidad de que las diatomeas capaces de alcanzar las últimas ramificaciones de los capilares sanguíneos tienen entre 10-100  $\mu\text{m}$  de tamaño, y el hallazgo de las mismas supondría un signo claro de vitalidad (Lunetta et al., 1998). Si se tratara de un cadáver arrojado o caído al agua, las diatomeas podrían penetrar de forma pasiva en el aparato respiratorio, pero no podrían llegar a otros órganos al no existir actividad circulatoria.

El estudio comparativo de las especies de diatomeas halladas en los tejidos y en el curso del agua donde se recuperó el cadáver podría no sólo confirmar las causas de la muerte sino aportar información de valor, para determinar el sitio donde se produjo la sumersión.

Así como la composición de diatomeas varía espacialmente, también lo hace estacionalmente y de un modo tal que el patrón de sucesión de especies (el modo en que se reemplazan unas a otras) se mantiene más o menos constante de un año a otro. Esto quiere decir que para un sitio determinado habrá un conjunto de especies que caractericen cada una de las estaciones del año. Una vez más, entonces, a partir de la composición de especies de diatomeas halladas en los tejidos es posible estimar de manera aproximada la época del año en que ocurrió la sumersión.

Este planteamiento tan simple no ha estado exento de debate, existiendo argumentos a favor y en contra. Así entre los argumentos en contra, es necesario resaltar que las diatomeas no han podido ser identificadas en todos los cadáveres, habiéndose conseguido su identificación en sólo un tercio de cadáveres que han sufrido un cuadro de asfixia por sumersión en agua dulce (Pollanen, 1997, 1998) estimándose por algunos que en mar abierto tampoco se comportarían como un marcador fiable (Funayama, 2001).

Otros autores identificaron diatomeas en sujetos fallecidos por otras causas distintas a la asfixia por sumersión, pero que habían permanecido en el agua. Ello condujo a Reh en 1970 a afirmar que la mera identificación de las diatomeas en los pulmones es un hallazgo inespecífico. Pese a todo, Timperman dos años después, interpreta el hallazgo de las diatomeas en el pulmón como signo indicativo de muerte rápida en el agua, puntualizando Auer y Möttönen (1988) que dicho indicio tendría un evidente valor diagnóstico si se identifican más de 20 diatomeas por campo en muestras de pulmón.

Hoy se sabe que no todas las diatomeas presentes en el líquido de sumersión son capaces de atravesar la barrera alveolo-capilar, lo cual viene condicionado, en gran medida, por el tamaño de aquéllas y por el hecho de su posible agregación en grupos o colonias.

En la exhaustiva revisión que hacen Lunetta y Modell (2005) de la asfixia por sumersión, dedican especial atención al estudio de las diatomeas, y en éste, se ocupan con detenimiento de las principales causas de error de este test diagnóstico. Siguiendo su propio esquema, distinguiremos entre:

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

- Contaminación antemortem: por ingesta de vegetales, mariscos o bebidas con alto contenido en diatomeas, o inhalación de éstas en fábricas de materiales de construcción y aislantes, al fumar cigarrillos o simplemente al respirar aire con diatomeas en suspensión.

- Penetración postmortem: por sumersión prolongada en el agua a alta presión hidrostática, penetración a través de heridas, o por penetración durante las maniobras de reanimación con ventilación artificial.
- Contaminación durante la preparación de muestras: Por las ropas del cadáver, por el instrumental y materiales utilizados en la autopsia, por el agua, reactivos y material de vidrio empleado.
- Otras fuentes de contaminación: inhalación de agua por buceadores y nadadores, paso de diatomeas a través de la placenta, en la exhumación por el serrín que pueda existir en el ataúd, etc.

**B) Falsos resultados negativos:**

- Baja concentración de diatomeas en el medio de sumersión.
- Escasa cantidad de líquido inhalado.
- Pérdida de diatomeas durante el proceso de preparación de muestras.

La investigación de estas algas se complica aún más si tenemos en cuenta que:

- La baja concentración de diatomeas en el medio de sumersión puede ser determinante a la hora de realizar este tipo de investigación como han publicado Funayama et al. (2001), acontecimiento éste que puede verse beneficiado por la contaminación ambiental de las aguas superficiales como informó Timperman (1972) ya hace algunos años.
- Las diatomeas sufren variaciones estacionales o climáticas en el ciclo de desarrollo, siendo más abundantes en primavera y en otoño (Pollanen et al. 1997).
- Otra de las causas de error se encuentra en el uso de técnicas no apropiadas para la correcta recuperación de las diatomeas en las muestras de tejidos u órganos en los que se vaya a llevar a cabo la investigación. Las técnicas de extracción requieren la destrucción previa de la materia orgánica, para lo cual se ha empleado la digestión química con ácido nítrico o sulfúrico (Ludes y Coste, 1996), (Auer, 1991),

solubilizantes como el Solueno-350 (Sidari et al. 1999), el cual no es aconsejable para el estudio de las diatomeas en agua salada, o enzimas como la proteinasa K con el dodecil-sulfato-sódico (Kobayashi et al. 1993). Recientemente ha dado buenos resultados el empleo de técnicas de digestión con microondas (Zhao et al., 2013).

El desarrollo de técnicas de PCR en el estudio con diatomeas ha proporcionado nuevas posibilidades en la identificación de las mismas por medio de *primers o iniciadores* en el estudio del ADN 16S ribosomal (Kane et al., 1996), (Abe et al., 2003), (Suto et al., 2003) que actualmente están constituyendo un método alternativo al estudio con los clásicos métodos sulfonítricos de destrucción de la materia orgánica, los cuales son muy agresivos para el estudio de diatomeas en agua salada (Taylor, 1994), aunque la alta sensibilidad de estas técnicas de PCR encuentran su mayor riesgo de uso en la gran contaminación de las muestras.

Para terminar con estos marcadores es necesario tomar en consideración que cualquier investigación que se pretenda llevar a cabo con ellos requiere no sólo el análisis cualitativo y cuantitativo de las diatomeas en los diferentes órganos y tejidos, sino también el obligado estudio comparativo con el análisis de las diatomeas en el medio en el que se ha producido la sumersión.

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

En el transcurso de la autopsia, y con todas las recomendaciones formuladas anteriormente para evitar la contaminación, se tomarán muestras de sangre de ambos ventrículos y de vena femoral, así como muestras de diferentes órganos (hígado, riñón, cerebro y médula ósea).

Peabody y Burgués (1985) advierten en su publicación de los problemas de contaminación de la muestra y establecen una serie de condiciones para evitarla.

Con la finalidad de evitar fallos de interpretación, Hürlimann et al. (2000) recomiendan que en el estudio de las diatomeas se incluya la determinación y la morfometría de las especies identificadas, así como el estudio cuantitativo. Estos autores estudiaron la distribución cuantitativa y cualitativa de diatomeas en el cuerpo humano de los individuos durante la muerte por sumersión, comprobando que la densidad de diatomeas disminuye por un factor de entre diez y 100 cuando pasa del medio de ahogamiento a los pulmones y/o al estómago o al duodeno. Y la mayor disminución en la densidad de diatomeas se produce en el paso de los pulmones a la sangre, riñones, hígado y médula ósea, siendo el factor en este caso del orden de 100 a 1000.

A pesar de que este gradiente de densidad no es el mismo en todos los casos, se puede suponer que, en circunstancias normales, la densidad de diatomeas en el medio de ahogamiento es decisiva para que las diatomeas se encuentren en el cuerpo de una persona ahogada. Por tanto, los estudios basados únicamente en la densidad de diatomeas sólo mostrarán un resultado positivo cuando el medio de ahogamiento real tenga una densidad relativamente alta de diatomeas.

La morfología de una valva, por ejemplo, el tamaño máximo de la valva o fragmento de valva, el espesor de la valva y su forma (redonda, oblonga, oval, etc.) pueden en gran medida ser decisivos para la penetración de una valva en el organismo. Es muy probable que valvas grandes sólo lleguen a los pulmones, al estómago y al duodeno durante el ahogamiento. Por otra parte, las valvas pequeñas pueden llegar a la sangre, hígado, riñones e incluso a la médula ósea sin dificultad.

Basándose en estos hechos, se puede suponer que el potencial de diatomeas en la sangre, el hígado, los riñones y la médula ósea puede ser deducido de los parámetros identificados en el medio de sumersión (por ejemplo, la densidad de diatomeas, especies, dimensiones).

Lunetta y Modell, concluyen que para considerar que los resultados sean aceptables han de cumplirse las siguientes premisas:

- A. Concordancia taxonómica, cualitativa y cuantitativa, entre las diatomeas encontradas en el cuerpo y en el medio de sumersión.



- B. Adopción de un estricto protocolo para evitar la contaminación durante todo el proceso de preparación de las muestras.
- C. Exclusión de los resultados de diatomeas que potencialmente puedan ser “contaminantes”.

#### Métodos alternativos a la investigación de las diatomeas

- Protozoos ciliados

La identificación de los protozoos ciliados en sangre, es un método propuesto por Chardez y Lambert (1985) para los cadáveres de sujetos ahogados en agua dulce. Consiste en la identificación de protozoos ciliados del género *Tetrahymena*, a través del cultivo de muestras de sangre, ya que poseen una extraordinaria capacidad de reproducción.

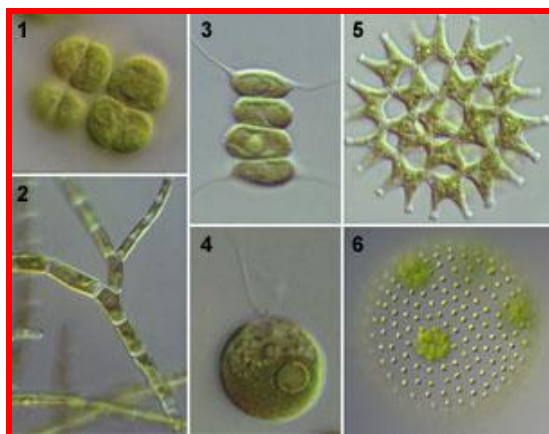


*Figura 10.* Género *Tetrahymena*

- Algas verdes

Como complemento al estudio de las diatomeas, y sobre todo cuando se trata de aguas dulces pobres en diatomeas, se ha propuesto el estudio de determinado tipo de algas verdes (*Chlorophyceae*), empleando solventes como el Solueno-350 para solubilizar los tejidos, el cual permite la detección, no sólo de las diatomeas, sino también la de las algas verdes. Las algas verdes también han sido utilizadas para el establecimiento del intervalo postmortem en cadáveres sumergidos (Casamatta y Verb, 2000), (Haefner et al., 2004).

Si bien este estudio se encuentra normalizado en países como Japón y Francia, no se han encontrado referencias en otros países hasta la publicación en 2009 de Díaz-Palma et al., que han establecido un protocolo de uso de microalgas y de distintas diatomeas para casos forenses en América Latina y particularmente en Chile.



**Figura 11.** Especies de algas verdes (Turmel, M. et al., 2008).

- Clorofila del plancton

Jianping y Enshou en 1992 propusieron para el diagnóstico de la sumersión el análisis de la clorofila del plancton en muestras de pulmón con un espectrofluorofotómetro.

- Análisis bacteriológico

En 1990, Mishul'skii propuso el análisis bacteriológico de la sangre de cadáveres recuperados del agua para el diagnóstico de la asfixia por sumersión. La investigación la llevó a cabo en muestras de sangre femoral en sujetos ahogados y en fallecidos por otras causas como grupo control, comprobando que la *Pseudomonas putida* y la *Pseudomonas fluorescens*, que no estaban presentes en la sangre de los sujetos del grupo control, podían ser utilizadas como test bacteriológico.

En el 2007, Lucci y Cinnelli estudiaron la presencia de bacterias típicas de contaminación fecal de las aguas (*Streptococo fecal* y *Coliformes fecales*), en la sangre de ambos ventrículos, arteria

femoral y vena femoral. El *Streptococo fecalis* está presente en la sangre del ventrículo izquierdo en el 100% de los ahogados, tanto en agua dulce como en agua salada. Señalan dichos autores que la sensibilidad del método podría dar resultados positivos, aunque se hubiesen inhalado muy pocos gérmenes, reconociendo, asimismo, que esa alta sensibilidad representa un riesgo real de falsos resultados positivos debido a la posibilidad de contaminación durante la toma de las muestras.

Otra línea de investigación propuesta en los últimos años ha sido la realización de un test microbiológico de bacterias bioluminiscentes. Kakizaki al frente de uno de los grupos más activos en relación con este tipo de marcadores, estudian en la sangre cardíaca y femoral de ahogados en agua de mar el crecimiento de bacterias bioluminiscentes tras su cultivo en medios selectivos. Posteriormente, las colonias aisladas son identificadas utilizando técnicas basadas en la identificación de genes específicos 16S ARNr. En el estudio finalmente se comprueba la presencia de diferentes especies del género *Vibrio*, todas ellas habitan normalmente en agua de mar. Como conclusión, se propone este test microbiológico como una prueba complementaria para el estudio de sumersión (Kakizaki, 2008, 2009).

También se ha realizado recientemente un test microbiológico de bacterias *Aeromonas*. Aoyagi propone en 2009 detectar fragmentos específicos de ADN de la bacteria acuática más común, *Aeromonas sobria*, mediante técnicas de PCR o nested-PCR en la sangre de ahogados. Obtienen buenos resultados tan solo en aquellas muestras que no estuvieron almacenadas por un largo período o bien la muerte sucedió muy rápida.

En esta misma línea es destacable el trabajo de Suto, publicado en 2009, el autor desarrolla un nuevo método altamente específico y sensitivo para detectar ADN de diferentes bacterias, *Streptococcus salivarius* y *Streptococcus sanguinis* (especies comunes en garganta y tráquea) y *Aeromonas hydrophila* (presente en numerosas aguas), mediante técnicas de PCR con primers específicos. El trabajo presentado es una buena propuesta alternativa de estudio cuando las aguas de sumersión no contienen plancton.

En 2010 Kakizaki utiliza la metodología descrita en 2009 para investigar bacterioplancton en un cadáver hallado en la playa, en avanzado estado de descomposición, con el propósito de determinar cuál fue el lugar donde se produjo la sumersión. La presencia de bacterioplancton

característico de agua dulce reforzó el hallazgo del test de diatomeas y permitió concluir que la víctima murió ahogada en agua dulce o bien en agua salobre con baja salinidad.

Uchiyama et al. (2012) detectaron simultáneamente ocho especies de bacterioplancton de agua dulce o salada (*Aeromonas hydrophila*, *A. salmonicida*; *Vibrio fischeri*, *V. harveyi*, *V. parahaemolyticus*; *Photobacterium damsela*, *P. leiognathi*, *P. phosphoreum*) utilizando ensayos de PCR a tiempo real con sondas TaqMan marcadas con fluoróforos. Estos ensayos fueron rápidos, menos laboriosos y de alto rendimiento, además de sensibles y específicos.



*Figura 12.* Pseudomona



*Figura 13.* Estreptococo



*Figura 14.* E. coli

#### 1.2.6.2. Componentes alveolares que pueden encontrarse en circulación general

Según Piette y De Letter (2006), este grupo de marcadores serían removidos de su asentamiento habitual por el líquido de sumersión, pasando a la circulación general tras la ruptura de las paredes alveolares, lo que diferencia a estos marcadores con respecto a sujetos fallecidos por otras causas de muerte.

- Células de fumadores

Reiter en 1984 puso de manifiesto la presencia de células de fumadores en la sangre del ventrículo izquierdo en las víctimas de asfixia por sumersión, resaltando el interés de estas investigaciones en los casos de muerte en la bañera, dada la escasez de plancton existente en el agua de la red de suministro, y con la lógica limitación de que sólo podría aplicarse a los fumadores activos. Por ello, son escasas las publicaciones sobre este tipo de marcador.

- Surfactante pulmonar

Un gran número de publicaciones se han dirigido al estudio del surfactante pulmonar, este es un complejo lipoproteínico (90% de lípidos y 10% de proteínas), siendo los lípidos fundamentalmente fosfolípidos y el más abundante la fosfatidilcolina. La parte proteica contiene proteínas séricas y proteínas asociadas identificándose cuatro: La SP-A que es la más abundante y es hidrofílica al igual que la SP-D, mientras que la SP-B y la SP-C son proteínas muy pequeñas e hidrófobas.

El surfactante pulmonar es un complejo altamente tensoactivo que recubre la superficie alveolar del pulmón y que reduce la tensión superficial en la interfase aire-líquido. Por lo tanto, la estabilidad mecánica del alveolo pulmonar es posible gracias a este complejo lipoproteico que se encuentra tapizando sus paredes.

También se ha demostrado, que el surfactante pulmonar tiene una función de defensa frente a microorganismos patógenos y actividad antioxidante. Se ha comprobado que alteraciones cualitativas y cuantitativas del surfactante pulmonar aparecen asociadas a numerosas patologías pulmonares.

La estabilidad post mortem del surfactante pulmonar ha sido estudiada por Lorente (1990, 1992), mediante modelos experimentales, determinando que la estabilidad es aceptable durante las primeras 24 h, sufriendo un progresivo deterioro entre las 48 h-96 h.

Se han publicado numerosos trabajos acerca de las consecuencias de la sumersión en agua dulce y en agua salada sobre el surfactante pulmonar. Así, entre los más recientes destacan Kamada et al. (2000) que estudiaron la proteína D del surfactante pulmonar en ahogados, cuyos niveles se encontraron elevados, tanto en los casos de agua dulce como de agua salada, siendo más altos en este último caso.

Por su parte, Zhu et al. (2000) estudiaron la proteína A del surfactante pulmonar (SP-A) en un total de 282 cadáveres autopsiados, de los que 59 habían fallecido por asfixia por sumersión. La inmunotinción más intensa y densa del SP-A se observó en los casos de ahogados, síndrome de las membranas hialinas y en casos de aspiración perinatal del líquido amniótico.

En una publicación posterior Zhu et al. (2002), evaluaron los niveles séricos de SP-A y su distribución pulmonar en casos de ahogados en agua dulce y en agua salada, comprobándose que en los casos de sumersión en agua dulce existía una mayor acumulación granular intraalveolar, extremo éste también comprobado por otros autores como Pérez-Cárceles et al. en diferentes estudios realizados en 2004, 2005 y 2008.

Así, Pérez-Cárceles et al. (2008), evaluaron conjuntamente los hallazgos microscópicos y la expresión inmunohistoquímica de la SP-A en lóbulos superiores e inferiores de los pulmones en distintas causas de muerte y su posible aplicación para el diagnóstico de sumersión, permitiendo así diferenciar los casos de asfixia y de sumersión de otras causas de muerte, y los casos de sumersión de otros tipos de asfixia. Estos estudios han tenido su continuidad en la publicación de Stemberga et al. en el 2009, concluyendo todos ellos, que la detección de la SP-A es potencialmente útil en la práctica forense con posible aplicación en la práctica diaria.

### 1.2.6.3. Marcadores químicos

#### 1.2.6.3.1. Tanatoquimia

- Generalidades

Antes de entrar en el estudio de cada uno de los marcadores químicos, es preciso definir el término Tanatoquimia. Luna (2009) define la Tanatoquimia, como el estudio de los parámetros bioquímicos en el cadáver para resolver los problemas que rodean el diagnóstico de la causa y las circunstancias de la muerte.

Para entender la importancia de la Tanatoquimia en la Medicina Forense, es interesante recordar que la autopsia forense es un método para obtener datos que permiten reconstruir con la mayor exactitud posible las circunstancias de la muerte con el fin de resolver un problema judicial. Estas circunstancias no son sólo la causa de la muerte, sino también otras como la data de la muerte, el tiempo de supervivencia, patologías previas a la muerte, etc. Por ello es necesario introducir nuevas herramientas diagnósticas en la patología forense.

Dentro de la autopsia forense, los análisis bioquímicos en el cadáver están dentro de las investigaciones auxiliares y complementarias, que pueden ser hechas con diferentes propósitos como son confirmar o excluir un posible diagnóstico, conducir a un diagnóstico en una situación confusa, interpretar una data que requiere una información adicional o como un test de rutina.

Dicho de otro modo, el principal propósito de uso de la bioquímica y biología molecular post-mortem es investigar los sistemáticos cambios fisiopatológicos que envuelven el proceso de la agonía y que habitualmente no pueden ser detectados por métodos morfológicos. A estos cambios les llaman “reacciones vitales fisiopatológicas”.

Podemos decir que la bioquímica post-mortem se ha convertido en un importante procedimiento para la determinación de la causa y el momento de la muerte presentando ventajas de estandarización, control de calidad, análisis cuantitativo, evaluación estadística y disponibilidad de múltiples marcadores, aunque también problemas relacionados con la selección y recolección de muestras y la aplicabilidad de los procedimientos analíticos. Además, hay que tener en cuenta que la utilización de estos procedimientos está limitada para los casos con un corto período post-mortem (normalmente menos de 48 horas) y que los criterios clínicos no son válidos en la investigación post-mortem, no sólo debido a las interferencias producidas por la agonía y el periodo post-mortem, sino también debido a las diferencias en la causa y el desarrollo de la muerte (Maeda et al., 2009a, 2010, 2011).

- Características del Cadáver

Luna define Cadáver como un grupo de elementos y sistemas biológicos que forman un ser vivo siendo después el fin irreversible de su funcionamiento coordinado, integrado en una unidad interactiva consigo mismo y con el medioambiente. Así que podemos afirmar que en un cadáver encontramos:

- Alguna energía dependiente de procesos (vida residual).
- Algunos procesos de circulación post-mortem.
- Interacción de procesos con el medioambiente.
- Comienzan procesos de autodestrucción.

- Hay una progresiva falta de información.
- Hay un cambio del modelo multicompartimental (procesos vitales) a un modelo con dos compartimentos (predominando los procesos de simple difusión).

Los perfiles bioquímicos son diferentes en un individuo vivo y uno muerto. Así los intervalos clínicos de referencia de sangre periférica (y de algunos fluidos corporales) varían en ambos casos. Veremos algunos ejemplos:

- Se mantienen estables tras la muerte los valores de: urea, nitrógeno, proteínas séricas, colesterol, bilirrubina, colinesterasa,  $\gamma$ -GTP, CRP (proteína C reactiva), eritropoyetina.
- Marcadores que se elevan durante el período de supervivencia: creatinina, ácido úrico, amilasa, surfactantes pulmonares, catecolaminas, S100 (proteína usada como marcador tumoral), neopterina (proteína presente en fluidos biológicos que aumenta cuando el sistema inmune está alterado).
- Elevación post-mortem: magnesio, marcadores del miocardio.
- Disminución post-mortem: cloruro, sodio.
- Post-mortem elevación seguida de disminución: calcio.

Esto se debe a que, aunque en el cadáver se dan procesos enzimáticos, éstos presentan unas particularidades distintas a los procesos intracelulares de los tejidos vivos (Gisbert y Villanueva, 2004). Así, una vez que se extinguen los procesos químicos vitales, se producen una serie de cambios en el cuerpo sin vida como es la autólisis que da lugar a una serie de modificaciones en los tejidos, en los órganos y en los diversos fluidos corporales. Dentro de estas modificaciones, la citólisis es la primera en producirse y la más importante: los lisosomas, organelas impermeables en la célula viva pero que con la muerte pierden esta propiedad, liberan enzimas que digieren la célula. Estos fenómenos carecen de significado patológico y son únicamente la expresión de fenómenos post-mortem.

Todo ello conduce a afirmar que se necesita un modelo real de fisiología del cadáver que nos permita comprender las relaciones entre los diferentes tejidos y fluidos, en ausencia de este modelo, en muchos casos se extrapola la fisiopatología de sujetos vivos al cadáver. Sólo a partir de estos datos se podrá establecer un diagnóstico o valorar correctamente un parámetro



y así saber discriminar los hallazgos bioquímicos que pueden deberse a la lesión de los que pueden ser resultado de los fenómenos autolíticos. Así, el desarrollo de estos fenómenos autolíticos puede interferir en el estudio bioquímico del cadáver, tanto en los fluidos utilizados, en la toma de muestras y en los marcadores bioquímicos determinados con fines diagnósticos, produciendo ciertas limitaciones (Coe, 1993).

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

El problema que surge es que no siempre se pueden establecer unos patrones de normalidad cadavérica ya que muchos factores, exógenos y endógenos, intervienen en su evolución. Así, como consecuencia de la fase de agonía, de los tratamientos y de los fenómenos de autólisis y putrefacción, muchos compuestos sufren procesos de transformación importantes, tanto cualitativos como cuantitativos. Sólo cuando se demuestra que un parámetro no sufre modificación post-mortem, se podrá emplear con garantía diagnóstica (Gisbert y Villanueva, 2004).

- Factores condicionantes en la bioquímica postmortem

Luna (2009), señala que desde 1952 en que aparece por primera vez el término de tanatoquimia, no ha habido una correspondencia entre los trabajos publicados en revistas especializadas y la incorporación de esos resultados a los trabajos de rutina en patología forense, esto puede ser debido a varios factores que engloban desde la falta de confianza a la ignorancia de las muchas posibilidades que ofrecen los test bioquímicos complementarios en el cadáver para la solución de algunas cuestiones forenses.

Para los patólogos forenses, a la hora de realizar su trabajo, tiene un peso decisivo y más práctico la histopatología frente a las determinaciones bioquímicas. La inclusión de los test bioquímicos en su trabajo de rutina, supondría un cambio en los métodos de muestreo para

obtener los materiales y fluidos necesarios para esas determinaciones. Así, se deben de tener en cuenta las siguientes consideraciones (Blanco, 2007): momento de la recogida de muestras, lugar de recogida y el método analítico utilizado. Numerosos estudios de muestras de plasma y humor vítreo demuestran que los valores obtenidos para algunos componentes pueden variar de acuerdo con el método analítico utilizado. Tales variaciones comúnmente no originan errores de interpretación para sustancias como la glucosa o la urea, pero sí a la hora de evaluar ciertos electrolitos como el  $\text{Na}^+$  o el  $\text{K}^+$ . Por consiguiente, es necesario que cada patólogo forense haga las determinaciones bioquímicas siempre en el mismo laboratorio y tenga a éste de referencia.

Uno de los problemas principales es la interpretación de los resultados obtenidos ya que no existen bases de datos con suficiente número de casos para establecer rangos de normalidad. Así Luna considera que para poder utilizar un parámetro bioquímico como marcador diagnóstico se necesitaría una base de datos con más de mil determinaciones de autopsias bien hechas y con exactitud en el diagnóstico.

Por otro lado, hay muy pocos trabajos donde se haya establecido una correspondencia entre las conclusiones histopatológicas y los valores bioquímicos. Este hecho es decisivo para comprender las dificultades para introducir las técnicas bioquímicas en el diagnóstico forense.

Sin embargo, pensar que con una determinación bioquímica el problema podría estar resuelto, es un error, es necesario un conjunto de test para obtener una conclusión final acertada. Así establecer un “estándar de oro” en patología forense presenta muchas dificultades ya que es difícil establecer un caso control modelo de casos similares.

También en 2009 Maeda et al. indican que los procedimientos bioquímicos que se han descrito para investigar la muerte no se han incorporado al trabajo de rutina por dos razones, una por las interferencias que se producen en el período de agonía y post-mortem y otra por el desconocimiento en muchos casos de la data de la muerte.

▪ Marcadores Químicos y Bioquímicos

En el estudio anterior Maeda et al. (2009) señalan la necesidad de establecer marcadores bioquímicos y marcadores de biología molecular para estandarizar un procedimiento para el trabajo de rutina en medicina forense.

Los marcadores podrían ser:

- Reactivos o productos de degradación presentes en la sangre y fluidos corporales.
- Marcadores inmunohistoquímicos en tejidos.
- Marcadores de biología molecular involucrados en la regulación de la homeostasis.

En la siguiente **Tabla 6** se recogen algunos marcadores bioquímicos utilizados en Medicina Forense y los procesos fisiopatológicos que diagnostican.

<b>Marcadores de la pérdida de sangre o anemia</b>	Proteínas Colesterol
<b>Marcadores de la Inflamación</b>	Proteína C reactiva Neopterinina Citoquinas
<b>Marcadores de deshidratación y alteraciones electrolíticas</b>	Urea Creatinina Sodio Cloro Calcio Magnesio
<b>Marcadores de Hipoxemia e Hipoxia sistémica del tejido</b>	Ácido Úrico Creatinina Marcadores cardíacos
<b>Marcadores de respuesta al estrés sistémico</b>	Catecolamina Serotonina.....
<b>Marcadores de daño musculo-esquelético</b>	Ácido Úrico Creatinina Calcio Mioglobina
<b>Marcadores de daño cardíaco y disfunción cardíaca</b>	Troponinas cardíacas Isoenzima MB de la creatin kinasa (CK-MB) Péptido natriurético atrial y cerebral (ANP y BNP)
<b>Marcadores de daño pulmonar y fallo respiratorio</b>	Proteínas A y D del surfactante pulmonar (SP-A y SP-D)
<b>Marcadores de daño y disfunción cerebral</b>	Proteína S100.....
<b>Otros marcadores bioquímicos específicos de células y tejido</b>	Mioglobina.....

*Tabla 6.* Marcadores bioquímicos utilizados en Medicina forense.

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

Según Maeda et al. (2009a), los requisitos para estos marcadores son:

- Rápida respuesta.
- Estabilidad post-mortem.
- Poder de discriminación (especificidad y sensibilidad).
- Bajo costo (su recogida u obtención).
- Fácil acceso.
- Análisis fácil y rápido.
- Que su medida se pueda estandarizar y tenga una calidad asegurada.

Y establecen una clasificación de los marcadores bioquímicos y de biología molecular en cuanto a agonía e interferencia post-mortem:

- Grupo 1: marcadores estables y comparables a criterios clínicos.
- Grupo 2: marcadores predecibles agonía/interferencia post-mortem.
- Grupo 3: marcadores impredecibles agonía/interferencia post-mortem.

Estos autores concluyen afirmando que para poder incorporar a las aplicaciones prácticas estos procedimientos, es esencial establecer bases de datos post-mortem en bioquímica, inmunohistoquímica y biología molecular.

De forma más particular, Piette y De Letter (2006) establecen los requisitos que debe cumplir un buen marcador para ser aplicado al diagnóstico de la muerte por sumersión:

- El marcador debe tener la posibilidad de atravesar la membrana alveolo-capilar y penetrar en la circulación.
- El marcador debe estar presente en grandes cantidades en el medio de sumersión y en muy pequeñas cantidades en la sangre de personas sanas. La ratio del estroncio en agua de mar y suero (650:1) hace de él un potencial marcador para el diagnóstico de la asfixia por sumersión, y ello a pesar de las diferentes concentraciones que pueden observarse entre distintos puntos geográficos.
- El marcador no debe penetrar en la circulación a través de otras vías (aparato digestivo) o por fenómenos de difusión postmortem.

#### 1.2.6.3.2. Primeros estudios sobre marcadores químicos en la sumersión

Para poder diagnosticar en medicina forense la causa de la muerte en cuerpos sumergidos en un medio acuoso se ha usado la determinación de varios elementos en sangre, especialmente la comparación de las concentraciones de ciertos elementos en la sangre del ventrículo derecho y ventrículo izquierdo.

Cuando se aspira agua durante el periodo vital, las concentraciones de ciertos elementos en la sangre no sólo varían como consecuencia de la hemodilución o la hemoconcentración, según se aspire agua dulce o salada, respectivamente, sino que, además, tanto en agua de mar como en agua dulce, se puede producir una transferencia de elementos desde el agua que llena el pulmón hacia la sangre del ventrículo izquierdo en el caso de que estos sean más abundantes en el medio acuoso que en la sangre.

Así los primeros estudios corresponden a Carrara, en 1902, que comprobó la desproporcionada dilución de la sangre contenida en el ventrículo izquierdo de ahogados en agua dulce frente a los ahogados en agua salada, determinando el peso específico, punto de congelación y conductividad eléctrica para diferenciar estos tipos de sumersión. Un año más tarde, Placzek insistía sobre el valor del peso específico a los mismos fines diagnósticos.

En 1921, Gettler propone la medición de la concentración de cloruros en la sangre de las cavidades cardíacas izquierdas y derechas, cuyas concentraciones difieren en caso de sumersión vital, en un sentido inverso, según se trate de sumersión en agua dulce o en agua salada. Pero posteriormente y tras las publicaciones de Durlacher et al. (1953) y Fuller (1963), el método fue abandonado, dada la escasa fiabilidad de los resultados.

En 1944 Moritz intenta el uso del magnesio como marcador para la asfixia por sumersión. En 1955 Freimuth y Swann proponen la medición de la densidad relativa (o gravedad específica) del plasma en la sangre de las cavidades izquierda y derecha del corazón. En 1970 Rivers et al. comprueban en personas recuperadas tras sufrir un cuadro de sumersión, que la medida de los electrolitos no muestra un patrón regular, y Modell y Davis (1969) llegan a afirmar que la medición de los electrolitos origina considerables dudas acerca de la fiabilidad de sus resultados como diagnóstico de sumersión.

### 1.2.6.3.3. Estudios recientes sobre marcadores químicos en la sumersión

Pese a ello, en los últimos años se han publicado numerosos trabajos en un intento de determinar un marcador bioquímico que resulte especialmente útil para el diagnóstico de la asfixia por sumersión. En este sentido, podemos citar el trabajo de Lorente et al. de 1990 en el que, entre otros elementos, estudian la osmolaridad del plasma, así como las concentraciones de cloro, magnesio y potasio. También en 1990 Yu-Chuan et al. estudian las concentraciones de flúor. Dos años después, Jeanmonod et al. en 1992 determinan los valores del punto de congelación de la sangre contenida en ambos ventrículos.

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

Zhu et al., en el estudio realizado en el 2005, evaluaron la utilidad de las concentraciones séricas post-mortem de calcio y magnesio con el objetivo de identificar la causa de muerte. Para ello analizaron la sangre de ambos ventrículos y la sangre periférica de un total de 360 autopsias con un intervalo post-mortem entre 5-48 horas, 28 casos de sumersión (en agua dulce n=11; en agua salada n=17). Los resultados obtenidos concluyeron que ambos elementos traza fueron significativamente más altos tanto en sangre de ambos ventrículos como en sangre periférica en los casos de sumersión en agua salada comparados con las otras causas de muerte. Además, en los casos de sumersión en agua salada, encontraron concentraciones séricas de calcio y magnesio en VI más elevadas que las correspondientes en

VD y sangre periférica. Sin embargo, en los casos de sumersión en agua dulce obtuvieron unas concentraciones de calcio en sangre periférica significativamente superiores a las halladas en ambos ventrículos y de magnesio en VD superiores a las halladas en VI.

De La Grandmaison et al. en 2006 estudiaron las concentraciones de hierro en la sangre contenida en las cavidades derecha e izquierda del corazón, en los casos de sumersión en agua dulce comparándolo con los casos control. Para ello seleccionaron 26 casos de sumersión en agua dulce con un intervalo post-mortem menor de una semana y 12 casos control cuya causa de muerte se atribuyó a lesiones por traumatismos o sobredosis de drogas, y en todos ellos se determinaron las concentraciones de hierro en ambos ventrículos cardíacos, obteniendo valores significativamente más altos de las diferencias entre VD-VI en los casos de sumersión con respecto a los casos control. Para los casos de sumersión, el valor medio de hierro en las diferencias entre VD-VI fue de 67,7  $\mu\text{mol/l}$ , mientras que para los casos control fue de 1,36  $\mu\text{mol/l}$ . Estos resultados permitieron demostrar así la hemodilución en todos los casos de sumersión en agua dulce, por lo que estiman que el Fe puede ser un buen marcador para el diagnóstico de la sumersión, siempre que el intervalo postmortem sea de corta duración. También es destacable, el amplio rango de niveles VDFe-VIFe en el grupo de ahogados, que podría explicarse por la duración de la agonía.

En uno de sus últimos trabajos publicado en 2007, Zhu et al. estudiaron las concentraciones de urea, creatinina y ácido úrico en sangre y en líquido pericárdico. En los casos de sumersión, y con independencia de que se trate de agua dulce o salada, encuentran unos valores bajos en la concentración de urea en la sangre del ventrículo izquierdo y en el líquido pericárdico, al compararlos con los obtenidos en el ventrículo derecho y en sangre periférica, lo que atribuyen a la dilución de la sangre de las venas pulmonares en el ventrículo izquierdo debido a la entrada de agua. Por ello, en opinión de estos autores, una ratio alta entre las concentraciones del ventrículo derecho y sangre venosa periférica respecto al líquido pericárdico puede ser utilizada como marcador para el diagnóstico de la sumersión.

En el 2009 el grupo de investigación de Zhu y Maeda propone el estudio comparativo entre diferentes marcadores bioquímicos en sangre ventricular y líquido pericárdico en relación con los pesos de los pulmones. Para ello realiza un estudio de 56 muertes por sumersión (19 en agua salada, 21 en agua dulce y 16 en agua salobre) con una data de muerte inferior a 48 horas



y con un grupo control de 240 muertes súbitas cardíacas. Los marcadores bioquímicos utilizados en este estudio fueron el nitrógeno ureico, sodio, cloruro, calcio y magnesio. Sus hallazgos evidencian una correlación inversa entre los marcadores bioquímicos y el peso de los pulmones, diferente para los distintos tipos de muerte en la sangre contenida tanto en ventrículo izquierdo y derecho, como en líquido pericárdico.

Usumoto et al. (2009) han realizado determinaciones en el líquido de efusión pleural concluyendo que los niveles de sodio y cloro permiten distinguir entre las muertes por sumersión en agua dulce y en agua salada, a diferencia del potasio y de las proteínas totales que no sufren variación.

De la misma manera, Pérez-Cárceles y su grupo (2012) estudiaron en los sueros de ventrículo derecho, ventrículo izquierdo y de sangre periférica de 140 cadáveres la presencia de estroncio, magnesio, sodio, cloruro, calcio, hierro, urea, creatinina y troponina T cardíaca. El objetivo era evaluar la capacidad discriminante de los oligoelementos en la sumersión (en agua de mar y en agua dulce) y su correlación con factores como la edad, el sexo, intervalo post-mortem, el tiempo en el agua y las concentraciones de los elementos traza en el medio de ahogamiento. Obtuvieron las siguientes conclusiones:

- El análisis post-mortem de marcadores bioquímicos y de biología molecular en ahogamiento se complica por fallo metabólico y circulatorio, lesión alveolar pulmonar e hipoxia, etc.
- No hay dos casos de ahogamiento idénticos. El tipo, la temperatura, y cantidad de agua aspirada puede variar, mientras que el estado de salud de la víctima antes de ahogamiento y el intervalo postmortem también puede ser importante.
- En sumersión en agua de mar, Sr, Mg, Ca, Na y Cl son significativamente mayores en VI que en VD como resultado de la aspiración de agua.
- La hemodilución es evidente por los significativamente mayores niveles de Fe y urea en VD que en VI en casos de sumersión en agua de mar, y por mayores niveles de Mg y Ca en VD en sumersión en agua dulce.
- El nivel sérico de Sr en sumersión en agua de mar se confirmó como el mejor parámetro para el diagnóstico, aunque otros elementos traza, también pueden ser útiles, tales como las concentraciones en suero de Mg y Cl.

- En el caso de sumersión en agua dulce, la conjunta determinación de Sr y otros marcadores bioquímicos, especialmente Fe, puede aumentar la posibilidad de un diagnóstico correcto, los oligoelementos están siendo especialmente útiles en tales casos.
- Aunque se necesitan más pruebas, concluye que se puede producir difusión pasiva de los elementos traza desde el agua al cadáver después de la muerte, por lo que el análisis de Sr debería sólo ser utilizado en los cadáveres que han estado en el agua menos de 72 h.
- Los marcadores bioquímicos se deben utilizar como una herramienta complementaria más en el diagnóstico de sumersión.

En el año 2012 Vallejo et al. en su trabajo “Pruebas biológicas complementarias en las muertes por sumersión”, afirman que desde el punto de vista de los marcadores químicos, el diagnóstico de sumersión en agua dulce, es el que presenta mayores dificultades, pues las variaciones en las concentraciones de elementos en sangre como consecuencia de la sumersión suelen ser pequeñas, y por lo tanto fácilmente enmascarables por las alteraciones de las concentraciones que ocurren en la sangre cuando no circula. La simple sedimentación de la sangre ya provoca variaciones importantes en las concentraciones de muchos elementos, de modo que capas superiores de sangre pueden contener menores concentraciones que las inferiores.

Por lo tanto, continúa indicando Vallejo, el diagnóstico de sumersión en agua dulce sólo podría realizarse con ciertas garantías cuando la sangre proceda de un individuo que ha fallecido unas pocas horas antes. En este tiempo, las concentraciones del elemento en la sangre del VD o VI aún se mantienen, y es posible detectar el decrecimiento de la concentración del elemento en la sangre del VI como consecuencia de la hemodilución.

De forma general, una aspiración de agua dulce hacia el pulmón se puede traducir en incrementos o descensos de las concentraciones de elementos en sangre. Es decir, pueden ocurrir transferencias de elementos desde el agua del pulmón hacia la sangre, provocando incrementos en la concentración sanguínea, pero también ocurre una entrada de agua dulce en la sangre, provocando cierta hemodilución y un decrecimiento en las concentraciones de elementos.

En la literatura, hay descritos numerosos marcadores bioquímicos que pueden ser utilizados para el diagnóstico de sumersión en aguas dulces, pero la aplicación práctica de muchos de ellos falla cuando se trata de muestras sanguíneas que fueron extraídas muchas horas después de la muerte del individuo por las razones expuestas anteriormente. Por otra parte, a todos los elementos no les afecta de la misma forma la sedimentación y putrefacción de la sangre. Aquellos elementos como el hierro, que tienen una distribución hematíes-suero muy marcada, se ven mucho más afectados.

Por otro lado, hay que señalar que las aguas dulces continentales poseen habitualmente bajas concentraciones de iones. Salvo excepciones, la ratio concentración elemento en medio acuoso/concentración en sangre es muy bajo, y por lo tanto, la aspiración de agua dulce hacia el pulmón no se traduce en transferencias de elementos (iones) hacia la sangre, que incrementen, de forma significativa, la concentración de elementos en sangre existentes antes de la aspiración de agua dulce.

En este sentido, es interesante el trabajo presentado por Maraschi et al. en 2012, en el que parten de la hipótesis de que el silicio al encontrarse en grandes concentraciones en las aguas naturales, por lo general, más altos que el estroncio en agua salada, podría ser de gran utilidad como marcador de ahogamiento en agua dulce. Lo cual queda demostrado tras analizar la sangre del ventrículo derecho e izquierdo de 18 cadáveres, encontrando grandes diferencias en las concentraciones de silicio en ambos lados del corazón en las víctimas de ahogamiento en agua dulce.

#### 1.2.6.3.4. Elementos químicos como marcadores en sumersión

La posibilidad de utilizar como marcadores de sumersión a los iones de gran abundancia en agua de mar, pero escasa presencia en la sangre humana ya fue sugerida por Icard en 1932, el cual propuso la investigación en sangre de iones como el estroncio, bromo, flúor y bario, de relativa gran abundancia en las aguas marinas.

Sobre la corteza terrestre, el metal más abundante es el aluminio, seguido del hierro, el calcio, el sodio, el potasio y el magnesio, los restantes alcanzan proporciones mínimas.

Si bien los metales son los agentes tóxicos conocidos desde más antiguo, no han perdido interés, y en los últimos años se han incrementado los conocimientos concernientes a los potenciales efectos tóxicos y a los mecanismos de acción de los iones metálicos, y los compuestos inorgánicos y organometálicos, que constituyen parte de los productos y subproductos de nuestras tecnologías (Tena, 1985; Repetto, 1995). En las últimas décadas se ha progresado mucho en el estudio de elementos traza y sus compuestos, adquiriendo un gran interés biológico, clínico, medioambiental, etc. en unión al avance de las técnicas instrumentales para su determinación, que se han desarrollado en paralelo (Xia Yi-Ming, 1996).

Algunos metales pesados pueden actuar como potentes tóxicos, pero otros juegan un papel fundamental en las funciones fisiológicas de los seres vivos, de forma que se pueden calificar como esenciales, no esenciales y tóxicos (Cornelis y cols., 1993).

Algunos de estos metales son imprescindibles para el mantenimiento de los sistemas bioquímicos en los seres vivos, siendo denominados oligoelementos o elementos traza. En este grupo se incluirán metales como el manganeso (Mn), cromo (Cr), zinc (Zn) y cobre (Cu). Otros, aunque no incluidos en este grupo, por estar ampliamente distribuidos por la corteza terrestre, se encuentran presentes en los seres vivos, tales como el plomo (Pb), níquel (Ni), vanadio (V), cadmio (Cd) y mercurio (Hg), que no poseen ningún efecto biológico beneficioso y son tóxicos para las personas (Ibáñez y Montoro, 1996; Behne y cols., 1998; Barregard y cols., 1999).

En la siguiente tabla (*Tabla 7*) de los profesores Repetto (2007), se han recogido concentraciones de referencia normales, habituales o terapéuticas, en sangre total, suero o plasma y orina humanas de los elementos químicos más importantes en la naturaleza, tanto por su abundancia como por sus efectos beneficiosos y perjudiciales en el organismo humano. Esta tabla puede servir de guía para la interpretación de los análisis cuantitativos en muestras biológicas, en ningún caso los datos deben tomarse como valores absolutos ya que se ha encontrado gran dispersión entre los datos procedentes de las diferentes fuentes o autores; esto es debido a múltiples causas, como: diferentes criterios clínicos; diferentes métodos analíticos y variable naturaleza de las muestras. Por todo ello, en la tabla se indica un

rango de valores representativo. Otra aplicación de esta tabla podría ser el estudio de la variabilidad de los elementos químicos tras el período postmortem.

SUSTANCIA	CONCENTRACIONES (µg/L)		
	HABITUAL/NORMAL/TERAPEÚTICAS		
	SANGRE	SUERO O PLASMA	ORINA
ALUMINIO		0-15	2-20
ANTIMONIO	0-3,5	0-2	0-1
ARSÉNICO	0-10	0-20	2-50
BARIO	0-2,4		0-6
BISMUTO	0-0.8	50-90	0-20
BORATO		0-7000	
BROMURO, ion		3000-30000(3-30 mg/L)	<16000
CADMIO	0,6(nf)*; 1,6(f)**	0-0,36	0-1,4
CALCIO		90000-110000 (90-110 mg/L)	
CINC	4000-7600 (4-7,6 mg/L)	600-1300-(1600) (0,6-1,3 mg/L)	260-850
COBALTO	0-1	0-0,4	0-1
COBRE	800-1600	600-1500	4-50
CROMO	0-0,4	0-0,4	0-1,5
ESTAÑO		30-140	
ESTRONCIO		30	300
HIERRO	380000-625000 (380-625 mg/L)	500-2000 (0,5-2 mg/L)	
LITIO		4200-8300 (4,2-8,3 mg/L)	
MAGNESIO		16000-25000 (16-25 mg/L)	30000-300000 (30-300 mg/L)
MANGANESO	7-10	0-0,9	0-2
MOLIBDENO		0-5	
NÍQUEL	1-3	0-3	0-2
PLOMO	40-300	0-0,5	12-80
POTASIO	1259000-2103000 (1259-2103 mg/L)	136000-195000 (136-195 mg/L)	
SELENIO	76-140	50-150	2-30
TITANIO			1-3
VANADIO	0-0,75	0-1-(50)	0-1

\*nf : no fumadores \*f: fumadores

**Tabla 7.** Concentraciones de referencia normales, habituales o terapéuticas en sangre total, suero o plasma y orina humanas de los elementos químicos (MR. Repetto y M. Repetto, 2007).

En la **Tabla 8** se muestran las ratios entre las concentraciones de los elementos más abundantes en agua marina y sangre humana (Azparren et al., 2000), observándose que la ratio de estroncio es la más alta. Por tanto, a priori, el estroncio en sangre total podría ser un buen indicador de los casos de sumersión en agua salada, como posteriormente comentaremos.

<i>Elemento</i>	<i>Agua marina (<math>\mu\text{g/L}</math>)</i>	<i>Sangre total (<math>\mu\text{g/l}</math>) Suero (<math>\mu\text{g/L}</math>)* Plasma (<math>\mu\text{g/L}</math>)**</i>	<i>Agua marina/sangre total Agua marina /suero* Agua marina /plasma**</i>
<b>Cloro</b>	19.353.000	3.651.350**	5,3**
<b>Sodio</b>	10.770.000	(3,5-2,9)x106*	3,7-3,0*
<b>Magnesio</b>	1.290.000	18.500 $\pm$ 25.800* ~ 135.760	29,3* 9,5
<b>Calcio</b>	412.000	100.000*	4,1*
<b>Potasio</b>	399.000	(215.000-140.000)*	(2,8-1,8)*
<b>Bromo</b>	67.300	3.900*	17,2*
<b>Estroncio</b>	8.000	~ 30	~ 267
<b>Boro</b>	4.450	365-39	114,1-12,2
<b>Silicio</b>	4.000	3.040-880	4,5-1,3
<b>Flúor</b>	1.300	190**	6,8**
<b>Litio</b>	185	5	37
<b>Rubidio</b>	120	2.700	0,04
<b>Iodo</b>	64	63**	1**

**Tabla 8.** Ratios entre las concentraciones de los elementos más abundantes en agua marina y sangre humana (Azparren et al., 2000).

Vallejo et al. (2012) recogen la tabla anterior indicando que el estroncio es un elemento cuya ratio entre las concentraciones en agua de mar y sangre es muy elevada:  $\approx 270$ , y esto se traduce en elevados incrementos en la concentración de estroncio en la sangre cuando existe aspiración de agua.

El boro es otro de los elementos que con una ratio parecido al estroncio podría ser útil como marcador de sumersiones en agua de mar, sin embargo, Vallejo et al. sostienen que su análisis rutinario es prácticamente imposible ya que resulta difícil evitar la contaminación de las muestras de sangre con el boro de los borosilicatos de los vidrios.

El magnesio es otro elemento que puede utilizarse como marcador de sumersión en agua de mar. Aunque su menor ratio (concentración agua mar/concentración sangre), en comparación al estroncio, le confiere una menor sensibilidad en la detección de las aspiraciones de agua salada.

### Estroncio

El estroncio es posiblemente, el marcador exógeno más estudiado en la asfixia por sumersión. El estroncio es uno de los elementos que se encuentra en cantidades relativamente elevadas en la corteza de la tierra, por lo que no es sorprendente que se encuentre estroncio en aguas de mar y en algunas aguas minerales. Análisis de estroncio realizados en aguas revelan los siguientes datos:

- Aguas extraídas de las minas podrían contener concentraciones de estroncio de hasta más de 1.000.000  $\mu\text{g/L}$  (Meinck et al., 1977).
- En aguas de filtración profundas podemos encontrar concentraciones de estroncio de hasta 31.000  $\mu\text{g/L}$ .
- En océanos y mares se encuentran concentraciones de aproximadamente 8000  $\mu\text{g/L}$ , aunque dependiendo de la salinidad pueden llegar a alcanzar los 13000  $\mu\text{g/L}$  (Piette et al., 1989).
- En los ríos grandes variaciones, desde concentraciones de estroncio similares a la de la sangre hasta diez veces superior (Azparren et al., 2003).

La concentración de estroncio en sangre, suero o plasma de personas sanas está en torno a 30  $\mu\text{g/L}$ , según la tabla anterior del profesor Repetto. Para Azparren (Azparren et al., 1994) varía de 16-43  $\mu\text{g/L}$ , aunque hay que tener en cuenta que estas concentraciones pueden variar según el tipo de agua y los alimentos consumidos (algunos tipos de agua mineral y alimentos de origen marino poseen elevadas concentraciones de estroncio) y probablemente debido también al uso de ciertos fármacos con estroncio para el tratamiento de la osteoporosis (Piette et al., 1994; Piette, 1996; Tournis et al., 2006). Así, según Piette et al. (1989), los valores de estroncio en sangre pueden alcanzar los 95  $\mu\text{g/L}$ .

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

- El Estroncio debe tener la posibilidad de atravesar la membrana alveolo-capilar y penetrar en la circulación.
- El Sr está presente en grandes cantidades en el medio de sumersión y en muy pequeñas cantidades en la sangre de personas sanas. La ratio del estroncio en agua de

mar y suero (650:1) hace de él un potencial marcador para el diagnóstico de la asfixia por sumersión, y ello a pesar de las diferentes concentraciones que pueden observarse entre distintos puntos geográficos.

- El Sr no penetra en la circulación a través de otras vías (aparato digestivo) o por fenómenos de difusión postmortem.

Abdallah et al. en 1985 experimentaron con conejos y llegaron a la conclusión de que la determinación del estroncio en suero era útil para determinar el carácter vital de una sumersión, así como para diferenciar si la sumersión se había producido en agua dulce o agua salada. Señalaron también que los niveles de estroncio no se veían afectados por maniobras de reanimación, ni por la hemólisis, ni por los cambios inducidos precozmente por la putrefacción.

Estos extremos también fueron puestos en evidencia por Piette, Timperman y Parisis en 1989 en cadáveres recuperados del agua, afirmando que la investigación de este marcador puede ser una prueba adicional válida para el diagnóstico de la sumersión en agua salada.

Desde que se empezó a utilizar el análisis del estroncio para el diagnóstico de la muerte por sumersión, fue notorio el hallazgo de concentraciones de estroncio en sangre relativamente bajas en aquellos casos donde la muerte se producía por causas distintas a la sumersión. Según Piette et al. (1994), quienes determinaron mediante ICP-AES (Espectrometría de emisión atómica con plasma de acoplamiento inductivo) la concentración de estroncio en sangre periférica de 22 individuos sanos y de 7 cadáveres fallecidos por causas distintas a la sumersión, la concentración media de estroncio obtenida en la sangre de los sujetos sanos fue de  $11,4 \pm 0,83 \mu\text{g/L}$  (Rango 5,7-15,6) y en los cadáveres fue de  $11,9 \pm 1,36 \mu\text{g/L}$  (Rango 8,7-19,1).

También se han señalado algunas circunstancias a considerar para la valoración de un caso concreto, tales como que algunos tipos de agua tienen una baja concentración de estroncio (agua de lluvia, agua de consumo doméstico) y el hecho de que los consumidores habituales de algunos tipos de agua mineral o los consumidores habituales de alimentos de origen marino, pueden tener unas tasas elevadas de este elemento en sangre.



El grupo de investigación más activo en relación con este marcador es el liderado por Azparren, que en 2003 determinaron mediante ETAAS (Espectrometría de absorción atómica electrotrémica con horno de grafito) la concentración de estroncio en sangre de ambos ventrículos en casos de muerte por sumersión en agua dulce y en casos de muerte por otras causas, la concentración media de estroncio en estos casos distintos a la sumersión fue de 28,0  $\mu\text{g/L}$  (SD = 12,4; Rango 14,5-47,5).

Para poder diagnosticar los casos de muerte por sumersión y diferenciarlos del resto de muertes se establecieron una serie de valores límites que iban a proporcionar información acerca de la cantidad de estroncio capaz de penetrar en el torrente sanguíneo; ésta iba a depender de la concentración de estroncio en el medio de sumersión y del periodo de agonía. Azparren et al. (1994) demostraron la utilidad de las diferencias en las concentraciones de estroncio entre el VI y VD en la investigación de la causa de muerte en los casos de sumersión en agua salada, encontrando que en los casos "típicos" de asfixia por sumersión en agua salada, las diferencias en las concentraciones de estroncio entre VI-VD superaban los 70  $\mu\text{g/L}$ , y un valor inferior a 20  $\mu\text{g/L}$  se considera indicativo de un ahogamiento atípico. También los niveles de estroncio en ventrículo izquierdo estaban por encima de 172  $\mu\text{g/L}$  en los casos de ahogamiento en agua de mar.

Esto fue ratificado en un artículo posterior (Azparren et al., 1998), en el que estudiaron el valor diagnóstico del estroncio, cloro, hemoglobina y diatomeas en sangre de ambos ventrículos de casos de muerte por sumersión, y destacaron el valor de la utilización de las diferencias en las concentraciones de estroncio entre VI y VD en la clasificación de los casos "típicos" de sumersión cuando éste está presente en el medio de sumersión en concentraciones superiores a 800  $\mu\text{g/L}$ .

Ya en el año 2000, Azparren et al. también demostraron la utilidad de la concentración de estroncio en sangre de VI, encontrando que valores superiores a 172  $\mu\text{g/L}$  eran indicativos de muerte por sumersión, siendo éste además un marcador menos proclive a experimentar errores analíticos. Además, permitía distinguir entre tres periodos de agonía diferentes: muertes instantáneas (VI < 125  $\mu\text{g/L}$ ; VI-VD < 30  $\mu\text{g/L}$ ), sumersiones vitales rápidas (VI = 125-172  $\mu\text{g/L}$ ; VI-VD = 30-70  $\mu\text{g/L}$ ) y sumersiones vitales comunes (VI > 172  $\mu\text{g/L}$ ;

VI-VD  $>70 \mu\text{g/L}$ ). Por lo que las diferencias en las concentraciones de estroncio entre ambos ventrículos pueden estar condicionadas por la duración de la agonía.

En el 2007 Azparren et al. (2007b) llevaron a cabo un estudio retrospectivo en el que evaluaron los efectos de la edad, el género, la temperatura y la salinidad del agua sobre la concentración de estroncio en sangre de VI de cadáveres hallados en aguas con alta concentración de estroncio ( $> 1000 \mu\text{g/L}$ ) del norte de España (fallecidos en agua salada y en agua dulce). Obtuvieron diferencias estadísticamente significativas en la concentración de estroncio en sangre del VI según la salinidad del medio ( $p < 0,001$ ) y según la temperatura del agua de sumersión ( $p = 0,030$ ). Sin embargo, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en función del sexo o la edad, por lo que ni la edad ni el género influyen significativamente en las concentraciones sanguíneas de estroncio.

Otro trabajo de estos autores (Azparren 2007a) versa sobre la relación de aumento de peso del pulmón en comparación con la cantidad de estroncio absorbido con utilidad como marcador diagnóstico. Para ello realiza un estudio en víctimas de sexo masculino mayores de 20 años, encontrando diferencias significativas entre los casos de sumersión y "no sumersión" en las relaciones que obtiene al comparar el peso de pulmón y corazón (L/H) en oposición a la relación peso de pulmones y peso del cuerpo (L/B). No obtienen sin embargo diferencias significativas cuando intenta usar dichas relaciones para la diferenciación entre ahogado por agua de mar en contraposición al ahogado en agua dulce al haber superposición de los datos. Concluye en su trabajo que, un valor de la relación peso de pulmón/peso del cuerpo (L/ B) superior a 19,5 Kg, podría ser un indicador útil de muerte por sumersión, pero cuando el valor es más bajo, es necesario para el diagnóstico exámenes adicionales para establecer la forma de la muerte.

En el año 2006 Pérez-Cárceles et al. publican su primer trabajo para este marcador, y más tarde, en 2008, tras estudiar los niveles de estroncio en 120 cadáveres, fallecidos por asfixia por sumersión (en agua dulce y en agua de mar), otras asfixias mecánicas y otras muertes no asfícticas, concluyen, asimismo, que este marcador puede ser usado para el diagnóstico de las muertes por sumersión, y para diferenciar si ésta se ha llevado a cabo en agua dulce o en agua salada.

Asimismo, correlacionan los niveles de estroncio con la proteína A del surfactante pulmonar en diferentes causas de muerte (2005). Y en el trabajo más recientemente publicado por este grupo con respecto al estroncio (2011), tras estudiar en el suero de 140 cadáveres, ahogados y no ahogados, varios marcadores bioquímicos, comprobaron que el Sr es el mejor parámetro para el diagnóstico de ahogamiento en agua de mar, aunque otros elementos traza, también pueden ser útiles como Mg y Cl. En los casos de ahogamiento en agua dulce, la determinación conjunta de Sr y otros marcadores bioquímicos, especialmente Fe, puede aumentar la posibilidad de un diagnóstico correcto.

En este estudio, la media de las concentraciones de estroncio observada en los casos de sumersión en agua salada fue, para la diferencia entre ambos ventrículos (VI-VD), de aproximadamente 360  $\mu\text{g/L}$  y para el VI de aproximadamente 830  $\mu\text{g/L}$ , valores muy superiores a los mencionados por Azparren et al. (1994, 2000). Esto podría explicarse teniendo en cuenta que los estudios se realizaron en diferentes lugares de la geografía española: Azparren analiza los casos de sumersión ocurridos en el norte de España, mientras que en este caso se hace en el sur de España, pudiendo ser debido a las diferencias en las concentraciones de estroncio de dichas aguas.

Siguiendo con este estudio, los investigadores observaron que las concentraciones de estroncio en los casos de sumersión eran superiores, en todas las localizaciones sanguíneas, frente a los niveles observados en los casos de muerte por otras causas. En los casos de sumersión en agua salada observamos también diferencias estadísticamente significativas entre las concentraciones de estroncio del VI y las del VD. Todos estos datos ratifican la transferencia de estroncio desde el agua hacia la sangre del ventrículo izquierdo del fallecido por sumersión, siendo tanto mayor en aquellos casos en los que la concentración de estroncio en el agua de sumersión es mayor (el agua de mar contiene concentraciones mucho más altas de estroncio que el agua dulce).

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

estroncio entre los sujetos fallecidos por sumersión y los fallecidos por otras causas, mientras que Fornes et al. (1998) combinaron en su estudio la histomorfometría de los pulmones y la determinación de estroncio en sangre de sujetos fallecidos por sumersión en agua dulce, fallecidos por otras causas y sujetos vivos sanos, además de la determinación de estroncio en el agua de sumersión, comprobando que las concentraciones medias de estroncio en sangre eran mucho más altas en sujetos fallecidos por sumersión que en los fallecidos por otras causas o en sujetos vivos sanos, no apreciando solapamiento alguno entre ambos.

Posteriormente, en 2003, Azparren et al. analizaron la concentración de estroncio en sangre de ambos ventrículos de cuerpos fallecidos por sumersión en agua dulce y fallecidos por causas distintas de la sumersión, afirmando que sólo el 32% de las sumersiones en agua dulce podían ser diagnosticadas mediante la determinación de las concentraciones de estroncio en sangre.

Para Pérez-Cárceles et al. (2011), las concentraciones de estroncio en ambos ventrículos fueron significativamente más altas en los casos de sumersión en agua dulce que en los sujetos fallecidos por otra causa de muerte, aunque no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en sangre periférica ni entre los dos ventrículos. Además, al comparar los casos de sumersión en agua salada con los casos de sumersión en agua dulce, obtenemos que las concentraciones sanguíneas de estroncio en los casos de sumersión en agua salada, en todas las localizaciones sanguíneas, son significativamente superiores a las obtenidas en los casos de sumersión en agua dulce.

Vallejo et al. (2012) afirman que desde los inicios del análisis de estroncio para el diagnóstico de sumersión, fue notorio el hallazgo de niveles de estroncio en sangre relativamente bajos en aquellos casos donde existía constancia de una muerte en el agua por mecanismos como: inhibición, cardiopatía isquémica, etc. que pretendían diferenciar las muertes por asfixia por sumersión del resto de muertes y también, algo más difícil pero más importante desde el punto de vista de la medicina legal, diferenciar las muertes con aspiración de agua de aquellas donde no existía. Los rangos de la **Tabla 9** muestran estos valores límites de forma más detallada.

Valores límites de estroncio en cadáveres encontrados en agua de mar		
	Sr en sangre VI	Diferencias de Sr entre VI y VD
Asfixia por sumersión	> 172 µg/L	> 70 µg/L <sup>b</sup>
Muertes con aspiración de agua, asociadas con otros mecanismos: cardiopatías isquémicas, algunos traumatismos letales, hipotermia, hipertensión, etc.	(172-48,4) <sup>a</sup> µg/L	(70-20) µg/L <sup>b</sup>
Muerte sin aspiración de agua durante el periodo vital	< 48,4 <sup>a</sup> µg/L	< 20 µg/L

<sup>a</sup>El valor 48,4 µg/L se obtiene sumando una desviación estándar al valor medio normal de estroncio en sangre; <sup>b</sup>diferencias entre concentraciones habitualmente encontradas.

**Tabla 9.** Valores límites de estroncio para el estudio de la causa de la muerte en cadáveres encontrados en agua de mar. Azparren-Contardi (2012).

En esta tabla, la muerte por asfixia por sumersión queda definida por un valor superior de 172 µg/L en la sangre del ventrículo, mientras los valores de la diferencia entre ventrículo derecho (VD) y ventrículo izquierdo (VI) suelen ser superiores a 70 µg/L, aunque no siempre, períodos de supervivencia pueden alterar estas diferencias.

En cuanto al estroncio como marcador químico en el diagnóstico de sumersión en agua dulce, el criterio utilizado por el Instituto Nacional de Toxicología y Ciencias Forenses (INTCF) para diagnosticar aspiración de agua durante el período vital es el mismo que se ha indicado para aguas de mar, que sería: > 48,4 µg/L en sangre VI y diferencias de más de 20 µg/L entre VI y VD. Con estos criterios, solo en un 32% de los cuerpos encontrados inmersos en agua dulce se ha podido diagnosticar la aspiración vital, un porcentaje muy inferior al prácticamente 100% diagnosticado en aguas de mar.

## Bromo

La mayor parte del bromo se encuentra en el mar en forma de bromuro, Br<sup>-</sup>. En el mar presenta una concentración de unos 65 mg/L.

El bromo se encuentra en niveles de trazas en humanos. Es considerado un elemento químico esencial, aunque no se conocen exactamente las funciones que realiza. Algunos de sus compuestos se han empleado en el tratamiento contra la epilepsia y como sedantes.

Como ya se ha apuntado, la concentración de bromuro en agua de mar es de 65-68 mg/L, mucho más alta que la concentración de bromuro en agua de río, agua de la red o en sangre de individuos sanos, es por ello que Takahashi et al. (2010), consideran que la concentración de bromuro en sangre podría ser un potencial marcador químico de la sumersión en agua de mar.

Azparren recoge en la **Tabla 8** las siguientes concentraciones de bromuro: en agua de mar 67,3 mg/L, en suero sanguíneo de individuos sanos 3,9 mg/L, por lo que la ratio Br agua marina /Br suero es de 17,2, una ratio moderadamente elevada, por debajo de Sr, B, Mg y Li. Por ello, y basándonos en este criterio, el bromo podría ser un buen marcador para la sumersión en agua de mar.

Volviendo al trabajo de Takahashi, estos autores determinaron las concentraciones de bromo en sangre de ventrículo derecho e izquierdo de 84 cadáveres, siendo 34 procedentes de muerte natural y 50 víctimas de sumersión, de los cuales 10 se ahogaron en agua de mar. Las determinaciones se hicieron mediante espectrometría de fluorescencia de rayos X por energías dispersivas (EDX). Los resultados fueron los siguientes: concentración de bromo en agua de mar 50,7 mg/L y en agua dulce por debajo de los límites de cuantificación (19,7 mg/L). En cuanto a los niveles de bromo en sangre, los niveles en todos los casos por debajo de los límites de cuantificación, excepto en 4 casos de víctimas de sumersión en agua de mar que se detectaron niveles mayores. Estos autores concluyen que, aunque la sensibilidad de la técnica EDX para la determinación de bromuro en los casos de sumersión en agua de mar es baja (40% en este caso), esta técnica permite hacer análisis multielementales sin interferencias de elementos que coexistan y no requiere una especial preparación de la muestra. Consideran que

la determinación de bromuro podría considerarse un buen marcador de la sumersión en agua de mar ya que la concentración de este electrolito en sangre de individuos sanos es muy baja, a diferencia de otros electrolitos que se han utilizado como marcadores como es el cloruro, calcio y magnesio.

### Potasio

Las cifras normales de Potasio en el plasma se sitúan en torno a los 3-5 mEq/litro (Blanco Pampin et al. 2007). Para Repetto y colaboradores las concentraciones normales en sangre humana (1259-2103 mg/L) son bastante más altas que las de suero (136-195 mg/L). Azparren recoge valores de 140-215 mg/L de potasio en suero y de 399 mg/L en agua marina por lo que la ratio entre las concentraciones en agua de mar y sangre es baja, 1,8-2,8, y esto se traduce en que apenas se detecta un incremento en la concentración de potasio en la sangre cuando existe aspiración de agua salada.

Por otro lado, se ha descrito por varios autores la importancia del potasio en las asfixias por sumersión en agua dulce y salada. Así cuando se aspira agua dulce, al ser hipotónica, se producirá un aumento del volumen sanguíneo con la dilución de electrolitos del plasma y hemólisis que dará lugar a un aumento en la concentración de potasio. Por el contrario, la aspiración de agua salada conlleva una hipovolemia y una hipokalemia ya que no hay hemólisis.

Los estudios más recientes realizados por Oehmichen y colaboradores en 2008, han puesto de manifiesto que la hiper e hipopotasemia no juegan un papel determinante en la muerte por sumersión, siendo la hipoxemia y los procesos que ésta desencadena, la causa de la parada cardíaca y la muerte de los ahogados.

Sea cual sea la causa de la muerte, se sabe que el  $K^+$  del suero se incrementa rápidamente después de la muerte, por lo que es imposible evaluar los niveles antemortem. Sólo es relativamente útil si se conoce con exactitud el momento de la muerte, existiendo además variaciones individuales o circunstanciales importantes, siendo la más importante de ellas la temperatura del cuerpo durante el Intervalo Postmortem (IPM) que es el tiempo que pasa

desde la muerte hasta el hallazgo del cadáver. En el niño estos efectos suceden de forma mucho más rápida que en el adulto.

Debido a numerosos factores, el margen de error es grande y se incrementa a medida que se alarga el IPM, por lo que la determinación de  $K^+$  tiene escaso valor diagnóstico en casos de muerte súbita y es utilizado fundamentalmente con fines de cronotanatodiagnóstico fundamentalmente.

### Calcio

La concentración normal de calcio en suero está en torno a 90-110 mg/L según Reppeto. Según recoge Wu en 2006, los valores de calcio sérico en adultos van de 84 mg/L a 102 mg/L, siendo algo menores en niños. Para Azparren el calcio sérico es de 100 mg/L y en aguas de mar es de 412 mg/L, siendo la ratio Ca agua de mar/Ca suero de 4,1, por lo que, sólo atendiendo a este criterio, el calcio no sería útil como marcador de sumersión en agua de mar.

Sin embargo, los estudios realizados por Zhu y su grupo en 2005, revelan que las concentraciones de calcio son más altas en la sangre de ambos ventrículos y en la sangre periférica de los cadáveres muertos por sumersión en agua salada frente a los que murieron por otras causas. También en los casos de sumersión en agua salada, los valores de Ca en la sangre de ventrículo izquierdo son superiores a los del ventrículo derecho y sangre periférica, no siendo así para los casos de sumersión en agua dulce, en los que el calcio en sangre periférica presenta una mayor concentración.

Estos hechos son corroborados por Pérez-Cárceles et al. en 2011, que afirman que la hemodilución es evidente en los casos de sumersión en agua dulce por los mayores niveles de calcio y magnesio en la sangre del ventrículo derecho, mientras que concentraciones de calcio mayores en ventrículo izquierdo aparecen en los casos de sumersión en agua salada.

Estos datos nos permitirían afirmar que el calcio podría ser útil como marcador de la sumersión.



Hodgkinson en 1969 usando espectrofotometría de absorción atómica encontró que la concentración de Calcio en la sangre aumentaba con el intervalo postmortem. Otros encontraron el mismo efecto, pero más lento en el humor vítreo. Coe y Dufour en 1982 hallaron que los valores en el humor vítreo son independientes de los valores sanguíneos y describieron casos de hipocalcemia con valores en el humor vítreo normales.

Para Pérez-Cárceles et al. (2011) no existe una correlación significativa entre los niveles de calcio y otros elementos estudiados y el intervalo post-mortem, aunque en los casos de sumersión se debe considerar otro factor estrechamente relacionado con el intervalo post-mortem: el período de permanencia del cuerpo en el agua. Por esta razón y tal y como indican Maeda et al. (2011) la utilización del análisis bioquímico post-mortem debe limitarse al periodo post-mortem precoz ya que es posible que se produzca una difusión post-mortem del agua a la sangre, con lo que consideran recomendable la utilización de las concentraciones de calcio y otros elementos en sangre, en los tres primeros días después del fallecimiento, coincidiendo con el tiempo establecido por Azparren et al. (2003). Sin embargo, existe el inconveniente de que no siempre es posible obtener información del tiempo de permanencia en el agua.

### Magnesio

La concentración de Magnesio en los tejidos es alta comparada con la del plasma. Jetter encontró en 1959 que debido a la hemólisis la tasa de magnesio en el suero descendía algo tras la muerte y luego se incrementaba rápidamente hasta niveles de 20-30 mEq/L.

Sin embargo, Coe (1976), Hodgkinson y Hambleton (1969) piensan que el incremento es rápido, precoz y sostenido.

Los niveles de Magnesio en el humor vítreo varían enormemente según la edad del individuo. Así en los recién nacidos la cifra de Mg está en torno a los 6 mg/dl (Blumenfeld, 1975), cayendo progresivamente con la edad del sujeto hasta que en el adulto apenas alcanza los 2 mg/dl (Sturner, 1972). Varios estudios han mostrado que existe un pequeño incremento postmortem de los niveles de Magnesio en el humor vítreo según aumenta el IPM, por lo que puede ser útil para estimar este último.

Entre las posibles aplicaciones forenses del Magnesio destaca la teoría de que la hipomagnesemia pueda asociarse con el síndrome de muerte súbita infantil por su efecto en la estabilidad de la contracción del músculo cardíaco, sin que haya quedado demostrada tal relación.

Weeler et al. (1983) compararon los niveles de Magnesio en el humor vítreo de sujetos, alcohólicos fallecidos repentinamente con otro grupo de sujetos no alcohólicos no encontrando diferencias significativas entre ambos grupos.

Según el grupo de Azparren, en el caso de las muertes por sumersión, el magnesio podría ser un marcador útil ya que la ratio Mg agua de mar/Mg suero es moderadamente alta: 29,3 (Mg en agua de mar: 1290 mg/L; Mg en suero: 18,5-25,8 mg/L), aunque menor que la del estroncio, lo que le confiere una menor sensibilidad en la detección de las aspiraciones de agua salada.

Al igual que para el calcio, destacan los trabajos de Zhu et al. (2005) y Perez-Cárceles et al. (2011), obteniendo para el magnesio resultados análogos a los del calcio, salvo para los casos de sumersión en agua dulce en los que la concentración de calcio es mayor en ventrículo derecho frente al izquierdo. El hecho de que los niveles de magnesio en VI sean más elevados en los casos de sumersión en agua salada se debe a que existe una relación de aproximadamente 100:2 entre la concentración de magnesio en agua salada y agua dulce, pudiéndose producir una transferencia de este elemento desde el agua al VI. Sin embargo, en agua dulce ocurre lo contrario y se debe a que la sangre del VI está más diluida que la del VD, poniendo de manifiesto la hemodilución. Por tanto, estos resultados nos permiten señalar que las diferencias encontradas en las concentraciones de magnesio entre los dos ventrículos pueden proporcionar información útil para el diagnóstico de los casos de sumersión en agua dulce.

### Hierro

El hierro es, con diferencia, el elemento más abundante en los suelos, constituyendo alrededor del 5% de la corteza terrestre, sólo superado por el O<sub>2</sub>, Si y Al. En aguas marinas la concentración de hierro es muy baja, solo entre 3 y 4 µg/L.

De los 2,5 a 4 g de hierro total presente en el organismo, alrededor de 1,3-2,6 g se encuentran formando parte de la hemoglobina; el resto está asociado a ciertos sistemas enzimáticos (relacionados principalmente con el metabolismo energético oxidativo), a la mioglobina y a proteínas de transporte y almacenamiento. Como se observa son funciones vitales, por lo tanto, deficiencias de este metal crean alteraciones en la salud de la población.

En cuanto al valor diagnóstico del Fe en los casos de sumersión, son importantes los trabajos de De La Grandmaison et al. (2006), que encontraron valores más altos de Fe en VD-VI en los casos de sumersiones en agua dulce frente a otras causas de muerte. Por lo que el Fe parece ser un buen marcador bioquímico en los ahogamientos en agua dulce con un corto intervalo postmortem. En el caso de que no se encuentre una diferencia significativa postmortem en el contenido de Fe en los dos lados del corazón, no se debe excluir la muerte por ahogamiento. En efecto, factores como el intervalo postmortem pueden afectar a los resultados bioquímicos, incluso en casos con intervalo postmortem corto, puede producirse en los casos de inmersión autolisis temprana, en particular durante la temporada de verano por las altas temperaturas.

Estos hechos fueron corroborados por el grupo de Pérez-Cárceles et al (2011), que llegan a la conclusión de que la determinación conjunta del estroncio en ambos ventrículos y la diferencia en las concentraciones de Fe entre VI y VD permite una identificación correcta de un mayor porcentaje de los casos de sumersión en agua dulce, mejorando así la capacidad diagnóstica de las muertes por sumersión en estos casos que cuando sólo se utiliza la determinación del estroncio en ambos ventrículos.

### Boro

La concentración estimada del boro en la corteza terrestre es de 10 mg/L y de 4,6 mg/L en el agua marina. La concentración de boro en sangre puede llegar hasta aproximadamente 0,4 mg/L. Se observa que el boro es otro de los elementos con una ratio parecida al estroncio y que podría ser útil como marcador de sumersiones en agua de mar. No obstante, no hemos encontrado estudios de boro como marcador químico para las muertes por sumersión.

#### 1.2.6.4. Otros Marcadores

##### - Péptido natriurético auricular

El péptido natriurético auricular (ANP) es un polipéptido secretado por las células del músculo cardíaco, poseedor de un potente efecto vasodilatador. Está estrechamente relacionado con el control homeostático del agua corporal, sodio, potasio y tejido adiposo. Ha sido un marcador biológico de sumersión estudiado a lo largo de los años por diferentes autores.

Anderson en 1986, comprobó en víctimas de sumersión como el ANP se elevaba considerablemente en plasma, del mismo modo que comprobaba la elevada eliminación urinaria del sodio.

Posteriormente Lorente et al. (1989) realiza un estudio piloto con conejos ahogados en agua dulce, agua de mar y conejos control, comparando los niveles de ANP en plasma y tejido auricular, determinando su posible utilidad para el diagnóstico diferencial entre la sumersión en agua dulce y en agua salada (1990).

En un trabajo posterior Zhu et al. (2007) comprueban la elevación significativa del ANP en el líquido pericárdico, tanto en aguas dulces como aguas saladas, en contraste con el péptido natriurético cerebral (BNP) que se eleva levemente, tanto en los ahogados en agua dulce como en agua salada, lo que puede abrir una nueva línea de investigación en relación con estos marcadores para el diagnóstico de la asfixia por sumersión.

En 2012, Chen et al. utilizaron la patología molecular de ANP y BNP en miocardio para poder diferenciar la disfunción cardíaca como posible causa de la muerte o como factor secundario a los procesos de muerte por sumersión o asfixia mecánica, encontrando que en estos casos la expresión del RNA mensajero de ANP y BNP era significativamente más baja que en las muertes súbitas cardíacas.

- Aquaporin-5

Se conocen 5 genes reguladores de la homeostasis del agua (el canal del agua permite movilizar el agua a través de la membrana celular de los mamíferos). La aquaporin-5 (AQP-5) tiene expresión en la tráquea, membrana apical de los neumocitos alveolares y epitelio de los capilares alveolares (Borgnia et al., 1999). Mediante el estudio de la expresión del canal de agua intrapulmonar (AQP-5) se propone desde diferentes grupos de trabajo establecer el diagnóstico diferencial de sumersión entre los sucesos en agua dulce y los de mar. Así, Hayashi et al. en 2009 observan la disminución de la expresión del gen de AQP-5 intrapulmonar en los casos de ahogados en aguas dulces.

Posteriormente, en 2010, An et al. mediante la utilización de técnicas inmunohistoquímicas realizan el diagnóstico diferencial comprobando la elevación de la expresión intrarrenal de aquaporin-2 en ratas ahogadas en agua de mar. El resultado confiere a la AQP como un potencial marcador para diferenciar sucesos en mar o en agua dulce.

- Ubicuitina

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

- Eventuales contaminantes del medio de sumersión

En algunos casos muy concretos podría hacerse uso de eventuales contaminantes del medio de sumersión que se incorporarían a los órganos de la víctima, tras la correspondiente inhalación del líquido de sumersión al que contaminan. Lehmann y Beuthin (1971), investigan la presencia de lignosulfato sódico, Concheiro (2004) investigan la presencia de taladrina y Mukaida et al. (1998), investigan la presencia de sales de baño en el pulmón y riñones de un bebé ahogado en una bañera.

### 1.2.7. Fluidos biológicos. Especial importancia del humor vítreo

Antes de recoger los fluidos biológicos para los análisis bioquímicos, se necesita contestar a las siguientes cuestiones (Luna, 2009):

- Qué parámetros bioquímicos queremos analizar.
- Por qué y para qué se recogen las muestras.
- Cuándo se deben recoger las muestras.
- Qué fluido.
- Como recoger las muestras.
- Como almacenarlas y transportarlas.

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

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

Por otro lado, se conocen las alteraciones de los constituyentes bioquímicos en el período postmortem, especialmente en la sangre, y los resultados de las investigaciones publicadas en ocasiones están sujetos a controversia. Así, es sabido que, tras la muerte, se alteran los niveles de electrolitos, dependiendo de diversos factores:

- el grado de cambio de las condiciones de almacenamiento del cuerpo,
- el intervalo post-mortem,
- el fluido corporal que se muestrea,
- en particular el analito que se está evaluando.

Los cambios producidos dependen de los efectos de la hipoxia celular que conducen al aumento de la membrana celular y de la permeabilidad de la pared de los vasos sanguíneos, y la reducción en las reservas de ATP que actúa sobre las bombas de las células. Estos factores dan como resultado la fusión de los fluidos intra y extracelulares y de sus respectivos electrolitos que, junto con la autólisis y la desintegración celular, conducen a importantes e impredecibles cambios en el contenido de electrolitos en las muestras post-mortem.

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

Debido a este inconveniente se han investigado otros fluidos corporales, como son el líquido cefalorraquídeo, humor acuoso, humor vítreo, líquido sinovial, líquido pericárdico, y perilinfático. Estos fluidos se encuentran en lugares cerrados y, por tanto, aislados de la circulación general y de la contaminación y no se alteran o contaminan con tanta rapidez como la sangre después de la muerte.

El profesor Luna (2009) establece un ranking entre cinco fluidos biológicos considerando 7 aspectos, donde el máximo son 5 estrellas y el mínimo una (*tabla 10*). Así en términos de accesibilidad el humor vítreo tiene 5 estrellas, es decir, es el más fácil de obtener, mientras que el fluido cerebrospinal solo una, es decir, es el que más dificultades presenta a la hora de su obtención.

	Humor vítreo	Fluido pericárdico	Fluido cerebroespinal	Suero femoral	Suero ventrículo derecho
Accesibilidad	*****	**	*	**	**
Precauciones en muestreo	*****	***	**	***	***
Necesidad manipulación (centrifugación ...)	*****	*****	***	***	***
Volumen	*	***	***	*****	*****
Interferencias con tejidos vecinos	****	***	*	*	*
Información general	**	**	**	***	***
Información de tejidos vecinos	*	*****	*****	*****	*

**Tabla 10.** Resumen de la utilidad de los diferentes fluidos disponibles para el análisis bioquímico en el cadáver.

De esta tabla se desprende que con el humor vítreo se deben tener más precauciones a la hora de obtener las muestras, que, con cualquier otro fluido, a diferencia del fluido cerebroespinal, que no requiere precauciones especiales.

Es también el humor vítreo el fluido que más necesita ser manipulado tras su recogida para poder ser analizado.

Los mayores volúmenes de muestra los podemos obtener de suero femoral y de suero del ventrículo derecho, mientras que de humor vítreo podemos obtener muy poco volumen.

El fluido cerebroespinal, el suero femoral y el suero del ventrículo derecho son los que están menos interferidos por los tejidos más próximos, siendo el humor vítreo el más interferido.

De los sueros femoral y del ventrículo derecho podemos obtener más información de carácter general y, por último, los fluidos que nos pueden proporcionar una mayor información de los tejidos vecinos son el fluido pericárdico, el fluido cerebroespinal y el suero femoral.

De forma general en bioquímica clínica se debe hacer una adecuada selección de las muestras y los sitios de muestreo, así como de los procedimientos utilizados. De forma más particular, en medicina forense, se deben tomar muestras que incluyan sangre de los dos ventrículos del corazón, sangre periférica, y fluidos corporales como pueden ser humor vítreo, líquido pericárdico, pleural, cefalorraquídeo y orina (Coe, 1976; Madea y Musshoff, 2007; Maeda et



al., 2009a; Matoba et al., 2012). Estas muestras deben ser recogidas usando jeringuillas estériles, identificando el sitio de muestreo, evitando o minimizando la contaminación y evitando la hemólisis de la sangre. A pesar de las posibles interferencias post-mortem, el uso de la sangre de los dos ventrículos debe ser considerado positivamente, ya que la sangre periférica no siempre está disponible en cantidades suficientes y los resultados de estas muestras reflejan la fisiopatología sistémica en el proceso de muerte (Maeda et al., 2011).

El momento para la toma de la muestra es fundamental para una correcta evaluación bioquímica del cadáver. Las muestras para análisis bioquímicos siempre deben ser extraídas lo más precozmente posible, incluso antes del inicio de la autopsia propiamente dicha. Es decisivo el tiempo transcurrido desde la muerte y el comienzo de la putrefacción, en especial cuando el cadáver va a quedar expuesto a elevadas temperaturas medioambientales, por lo que es recomendable su extracción y procesamiento en el período inmediatamente posterior a la muerte. El establecimiento de la autólisis caracterizado por la hemólisis sanguínea y la opacificación y turbidez del humor vítreo pueden invalidar los resultados obtenidos.

En el caso de las muertes por sumersión el estancamiento y sedimentación de la sangre y el posterior proceso de putrefacción, generan variaciones importantes en la concentración y distribución de muchos marcadores bioquímicos, por ello, para evitar errores en el diagnóstico habría que utilizar muestras de sangre de casos con un periodo post-mortem corto (<48 horas) que permitan la utilización de una amplia gama de marcadores bioquímicos, o si sólo se dispone de muestras de sangre de cadáveres con cierto grado de descomposición, utilizar marcadores bioquímicos que no sufran modificaciones como consecuencia de los procesos asociados a la aspiración de agua.

Lugar de recogida: La creencia de que el lugar elegido para la recogida de las muestras era irrelevante ha demostrado ser inexacta. Diversos estudios de los niveles de glucosa en sangre, insulina, pH, tensión de oxígeno, láctico-deshidrogenasa y ciertas drogas demostraron diferencias significativas entre las muestras extraídas de las cavidades cardíacas derechas e izquierdas o entre la sangre cardíaca y la sangre de los vasos periféricos. Es, por lo tanto, de gran importancia conocer exactamente el lugar de donde se ha recogido la muestra para una correcta interpretación de los resultados.

En general son preferibles las venas periféricas (femoral o subclavia), puesto que los valores postmortem son los que mejor se aproximan a las cifras reales en vida del individuo.

El humor vítreo debe ser extraído con una jeringa pequeña con aspiración suave y gradual. Los conocidos tubos de vacío no son recomendables dado que la succión inicial es muy brusca pudiendo ocasionar el desprendimiento de la retina o de otras estructuras del globo ocular con la consiguiente contaminación de la muestra y la distorsión de los valores obtenidos. Si la extracción se realiza con cuidado pueden obtenerse sin dificultad 2 ó 3 ml de humor vítreo de cada ojo en el adulto y alrededor de 1 ml en los recién nacidos.

Durante muchas décadas el humor vítreo ha sido utilizado para investigaciones bioquímicas post-mortem. El humor vítreo es un fluido que se obtiene del cuerpo vítreo, y podemos decir, que tanto el lugar anatómico que ocupa como su consistencia, hacen que tenga una escasa difusión, comparado con otros fluidos biológicos. También se ha comprobado que el humor vítreo apenas o nunca se contamina en los intervalos posteriores a la muerte. También es mejor que otros fluidos corporales, tales como cefalorraquídeo, líquido pericárdico y líquido articular, ya que se somete a cambios post-mortem más lentamente y es técnicamente más fácil de obtener. Por tanto, este fluido en contraste con la sangre, es adecuado para investigaciones bioquímicas post-mortem.

Desde la segunda mitad del siglo XIX hasta la fecha, se han introducido pruebas bioquímicas en distintos líquidos corporales, encontrándose que el humor vítreo presenta además de las características mencionadas, el hecho de que aún en el más brutal homicidio, con múltiples heridas, los ojos generalmente permanecen intactos y por consiguiente se puede hacer uso del mismo, ya que en él los procesos de autólisis se llevan a cabo más lentamente.

En este sentido, se han hecho análisis para el diagnóstico de enfermedades, presentando cambios en la concentración de electrolitos y en parámetros clínico-químicos. También se han desarrollado estudios del intervalo post-mortem y se ha utilizado para aclarar cuestiones que permiten aportar información a la resolución de casos forenses.

Los constituyentes bioquímicos del humor vítreo, y especialmente el potasio, han sido ampliamente usados en la estimación del llamado Intervalo Post Mortem (IPM), el cual se

define como el período de tiempo transcurrido entre la muerte y el hallazgo del cadáver. Esta estimación resulta importante ya que no solo es significativa por razón del crimen y las implicaciones de la investigación de la Justicia Penal: los errores en la estimación del tiempo de muerte pueden en muchas circunstancias cambiar el rumbo de una investigación, implicar a un inocente o ayudar a liberar al culpable.

Sin embargo, los análisis de humor vítreo presentan una serie de inconvenientes tales como que los métodos analíticos aplicados habitualmente, son calibrados y validados para análisis de orina y de suero y no pueden ser fácilmente aplicados a este fluido.

También se ha visto que los analitos más investigados post-mortem en humor vítreo son potasio, sodio, cloruro, magnesio, calcio, fosfato, urea, creatinina y lactato, siendo sodio, cloruro, creatinina y lactato bastante estables en sus concentraciones postmortem, mientras que los otros analitos mostraron considerables cambios en sus concentraciones.

Estas diferencias en los valores bioquímicos obtenidos se han venido observando durante décadas, la mayoría de autores las atribuían a los aparatos y técnicas de medida, pero muy pocos consideraron que la alta viscosidad del humor vítreo hacía necesario un pretratamiento de la muestra, y que en función del pretratamiento aplicado variarían los resultados analíticos. El humor vítreo tiene una consistencia gelatinosa siendo una mezcla de fibrillas de colágeno y fluidos, que como ya hemos dicho, le confiere una alta viscosidad que hace aconsejable realizar un pretratamiento de las muestras para poder analizarlas. Los métodos de pretratamiento más comúnmente usados en el pasado son: calentamiento; centrifugación; digestión enzimática con hyaluronidasa; baño de ultrasonido; filtración y congelación.

Thierauf et al. en su trabajo publicado en 2009, realizan una metódica investigación de la influencia de los pretratamientos en las determinaciones de las concentraciones de una serie de analitos: sodio, potasio, calcio, cloruro, urea, creatinina, glucosa y lactato. Los pretratamientos estudiados son centrifugación y baño de ultrasonidos y este último conduce a mayores concentraciones y a una mayor precisión en las determinaciones. Por otro lado, se realizaron las medidas de sodio y potasio en muestras no diluidas y diluidas (tras los pretratamientos) y las medidas fueron más precisas y estables en las muestras diluidas.

Blana et al. (2011) publicaron un estudio en el que comparan cuatro métodos de pretratamientos para las muestras de humor vítreo: digestión enzimática con hialuronidasa, calor, ultrasonidos y centrifugación, determinándose los mismos analitos que en el estudio de Thierauf. Estos autores demostraron que el tipo de pretratamiento al que se ha sometido la muestra tiene efectos sobre la medida de las concentraciones de los marcadores químicos e indican la necesidad de desarrollar métodos analíticos calibrados y validados para humor vítreo, ya que los existentes para suero y orina no pueden ser fácilmente aplicados a este fluido.

### 1.2.8. Data de la sumersión

La estimación de la data de la muerte se apoya en los conocimientos sobre el momento de la aparición y la evolución cronológica de los fenómenos cadavéricos. A través de los métodos rutinarios (determinación de las rigideces y livideces) se puede llegar a establecer una data de muerte de forma aproximada con rangos que oscilan entre 6 a 8 horas del fallecimiento; razones por las cuales se han multiplicado las investigaciones tendentes a proporcionar un procedimiento más adecuado para llegar a determinar con mayor exactitud los rangos precisos.

En este sentido, la Tanatoquímica se ha empleado para ello. Entre los elementos inorgánicos, el potasio ha sido uno de los más estudiados y su determinación en el humor vítreo ofrece en la actualidad resultados mucho más fiables, ya que este medio se encuentra aislado por las capas del globo ocular del resto del organismo y por lo tanto no está afectado por la hemolisis. Así, después de ocurrida la muerte, a nivel del humor vítreo existe un proceso de autólisis celular lo que hace que haya un incremento progresivo del potasio a este medio. Por lo que el estudio del incremento de este ión, como se ha evidenciado en modelos matemáticos, constituye un método más preciso para determinar la data de muerte en cadáveres de menos de 24 horas.

La aplicación de este procedimiento contribuirá a establecer la hora del fallecimiento con mayor precisión en cadáveres con data de muerte de menos de 24 horas, ya que posteriormente y, por efecto de la deshidratación ocular, desaparece el humor vítreo. El rango

de la data de muerte con el análisis de potasio en el humor vítreo, es de  $\pm 2$  horas; se produce así un acortamiento en la determinación de las horas de muerte si lo comparamos con los obtenidos en el estudio de los fenómenos cadavéricos rutinarios (livideces, rigideces, putrefacción).

En los cadáveres no recientes, es decir mayor de 24 horas, en donde la putrefacción es manifiesta, juega un papel importante para la determinación de la data de la muerte la Entomología Forense; esta ciencia estudia la progresión sucesiva de artrópodos que utilizan los restos cadavéricos en descomposición, y además llegan con una predecible secuencia. De forma general, se puede afirmar que los métodos rutinarios son utilizados para determinar el tiempo transcurrido desde la muerte cuando éste es corto, pero después de las 72 horas la Entomología Forense puede llegar a ser más exacta y con frecuencia es el único método para determinar el intervalo post-mortem. (Coromoto, 2011).

En cuanto a la sumersión, el diagnóstico del tiempo de permanencia del cadáver en el agua sigue constituyendo hoy un complicado problema, para el que no se dispone de respuestas concretas.

En términos generales, la determinación de la data de la sumersión se basa en la valoración del estado evolutivo en el que se encuentren los fenómenos cadavéricos y en los cambios inducidos por las fases más tempranas de la putrefacción cadavérica, siendo preciso puntualizar que, en algunos casos, podrá no coincidir la data de la sumersión con la data de la muerte.

No es necesario insistir en que aquellos cambios están fuertemente condicionados por la temperatura del medio de sumersión en el que se encuentre el cadáver, siendo bien conocido que a temperaturas bajas los fenómenos destructivos del cadáver se enlentecen.

Se han elaborado diferentes tablas, haciendo una evaluación global de la data a partir de las diferentes manifestaciones o signos que puedan apreciarse externamente en el cadáver, resultando ya clásica la tabla de Devergie, en la que aquellos signos y su correspondiente data eran diferenciados, según se tratara de meses de invierno o de verano.

Más recientemente, se introdujo la tabla de datos tanatológicos propuesta por Reh (1975), elaborada a partir del estudio de 395 cadáveres extraídos del agua, en la que los diferentes signos son valorados de forma diferenciada en cada uno de los meses del año, haciendo especial mención de la temperatura media del agua en cada uno de ellos. En esta tabla se valoran parámetros tales como los cambios cromáticos de la piel, el desarrollo de gases de la putrefacción, manifestaciones de la maceración de la piel, desprendimiento de la epidermis, cabellos y uñas, etc. Es necesario tomar en consideración que los plazos señalados en la misma pueden verse acortados si la sumersión se ha producido en aguas con temperaturas más templadas. Con posterioridad se han confeccionado unos diagramas de correlación de los datos anteriores (Mason y Purdue, 2000).

El grupo de Pérez-Cárceles en su estudio publicado en 2011, no encontraron una correlación significativa entre los niveles de los elementos traza y el intervalo post-mortem, aunque en los casos de sumersión sí encuentran una correlación con el período de permanencia del cuerpo en el agua. Por esta razón y tal y como indican Maeda et al. (2011), están de acuerdo en que la utilización del análisis bioquímico post-mortem debe limitarse al periodo post-mortem precoz, a los tres primeros días después del fallecimiento. Sin embargo, existe el inconveniente de que no siempre es posible obtener información del tiempo de permanencia en el agua.

En este sentido, se ha propuesto un procedimiento por Bray (1985), consistente en medir las concentraciones de potasio y de cloro en el humor vítreo, haciendo el cálculo del intervalo post-mortem, según la siguiente fórmula:

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

El propio autor limita la aplicación de la misma a los casos en que la sumersión se lleve a cabo en aguas frías y que el intervalo post-mortem sea superior a un día, con un margen de error inferior a 0,5 días. Asimismo, señala que los efectos de la temperatura hacen inaplicable la fórmula a los casos de sumersión en meses de verano.

Para otros autores (Durigon 1988), el empleo del humor vítreo, a estos efectos, no es recomendable en los casos de sumersión, ya que se produce una difusión rápida del medio de sumersión a través de los tejidos corneales y conjuntivales.

Además del estudio de las algas en cuerpos sumergidos, a las que nos hemos referido en apartados anteriores, se ha intentado aplicar también el estudio del grado de desarrollo de larvas de mosquitos (Chironomidae), como indicador del tiempo postmortem (Haskell et al. 1989), (Keiper et al. 1997) con los mismos principios básicos por los que se regulan los trabajos sobre la entomología cadavérica. Los resultados obtenidos con el estudio de estos insectos no son muy alentadores, como tampoco las observaciones realizadas sobre invertebrados acuáticos (Hobischak y Anderson, 2002), razón por la cual esta línea de investigación no ha sido muy desarrollada.

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





## **2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS**



La incidencia de la muerte por sumersión está aumentando en todo el mundo, aproximadamente medio millón de personas mueren cada año por esta causa y se estima que dicha cifra está muy por debajo de las cifras reales, ya que muchos casos no son informados o registrados.

En nuestro país la muerte por sumersión es la segunda causa de mortalidad accidental después de los siniestros de tráfico, es por ello que su diagnóstico es una cuestión que se presenta cotidianamente en medicina forense, pero que a la vez representa un problema, a veces, de difícil resolución.

La recuperación de un cadáver del agua plantea siempre múltiples y variadas preguntas a las que es necesario responder, a fin de resolver los diferentes problemas que se presentan desde el punto de vista médico forense. Se ha comprobado que la investigación de cuerpos recuperados del agua es sumamente compleja y difícil, en muchas ocasiones, por tratarse de cadáveres en estado de putrefacción. Por ello, en la mayoría de los casos la información obtenida de hallazgos morfológicos (macroscópicos e histológicos) por sí sola no puede responder a todas las preguntas y es necesario correlacionar estos datos con los resultados de las pruebas analíticas complementarias.

De todas las muertes por asfixia, la muerte por sumersión es la que precisa con mayor frecuencia recurrir a exámenes complementarios para confirmar o excluir una determinada causa de muerte o para proporcionar información adicional que permita la reconstrucción completa de los hechos. Se han utilizado distintos exámenes complementarios con la intención de determinar la causa de la muerte y, aunque se han analizado muchos métodos diagnósticos, el diagnóstico post-mortem de la asfixia por sumersión sigue siendo uno de los más difíciles en patología forense.

El test diagnóstico ideal como prueba definitiva de muerte por sumersión está todavía por descubrir y es necesario realizar más investigaciones.

La determinación de elementos traza en sangre y humor vítreo puede ser aplicada en medicina forense para el diagnóstico de la causa de la muerte. En este sentido, uno de los principios generales que puede ayudar a confirmar el diagnóstico de sumersión es la presencia en la

circulación sanguínea de sustancias químicas presentes en el agua de sumersión que se encuentran en el cuerpo humano en concentraciones muy bajas (elementos traza).

El **objetivo general** del estudio fue analizar distintos elementos químicos en sangre y humor vítreo en distintas causas de muerte y su posible aplicación al diagnóstico de sumersión.

Los **objetivos específicos** fueron:

1. Determinar el tratamiento más adecuado para aplicar a las muestras de sangre y humor vítreo para su posterior análisis. Estudiar la idoneidad de las técnicas de análisis elemental ICP-MS e ICP-OES para la determinación de elementos traza en sangre y humor vítreo.
2. Analizar las concentraciones de 19 elementos químicos en sangre periférica, sangre de ventrículo derecho, sangre del ventrículo izquierdo y humor vítreo en casos de muerte por sumersión en agua salada, muertes por sumersión en agua dulce y muertes por otras causas, y comprobar si existen diferencias estadísticamente significativas en las concentraciones de los elementos químicos entre los grupos.
3. Analizar si existen diferencias estadísticamente significativas en las concentraciones de estos marcadores bioquímicos asociados a la edad y el sexo de los fallecidos.
4. Determinar si existe correlación del intervalo postmortem con las concentraciones de los elementos bioquímicos analizados, para que estos puedan ser utilizados como posibles marcadores de sumersión.
5. Analizar si existe correlación entre los elementos químicos en sangre y humor vítreo y el medio de sumersión.
6. Analizar si existen patrones definidos en los tres grupos diagnósticos y relaciones con los elementos químicos analizados.
7. Evaluar la capacidad discriminadora de los elementos traza de forma individual y conjunta para diagnosticar las muertes por sumersión.

8. Conocer las ratios entre la concentración de los elementos químicos en agua de mar y humor vítreo y de ratios entre la concentración de elementos químicos en agua de mar y sangre, con el fin de establecer los posibles marcadores entre los elementos estudiados.
  
9. Establecer un protocolo en el uso de los marcadores bioquímicos como herramienta complementaria en el correcto diagnóstico post-mortem de la muerte por sumersión.



### **3. MATERIAL Y MÉTODOS**





### 3.1. Casos de autopsias forenses

Hemos estudiado las muestras recogidas de 68 cadáveres seleccionados de las autopsias médico-legales llevadas a cabo en el Instituto de Medicina Legal de Cádiz, siendo aprobado dicho estudio por el Comité de Ética de la Universidad de Murcia. Los casos fueron seleccionados aleatoriamente entre las autopsias médico-legales rutinarias.

De acuerdo con la escena, causa y circunstancias de la muerte, además de los hallazgos de la autopsia, los 68 casos fueron clasificados en tres grupos diagnósticos: sumersión en agua salada, sumersión en agua dulce y no sumersión (*Tabla 11*). La edad media de los sujetos fue de 48,3 años (desviación estándar: 19,5; rango: 15-92 años). El intervalo postmortem medio fue de 26,7 horas (desviación estándar: 37,8; 95% IC: 23,9-29,6 horas; rango: 11-58 horas).

Grupos	N	%
Sumersión en agua salada (SAS)	41	60
Sumersión en agua dulce (SAD)	14	21
No sumersión (NS)	13	19
<b>TOTAL</b>	<b>68</b>	<b>100</b>

*Tabla 11.* Distribución de los casos por grupos diagnósticos.

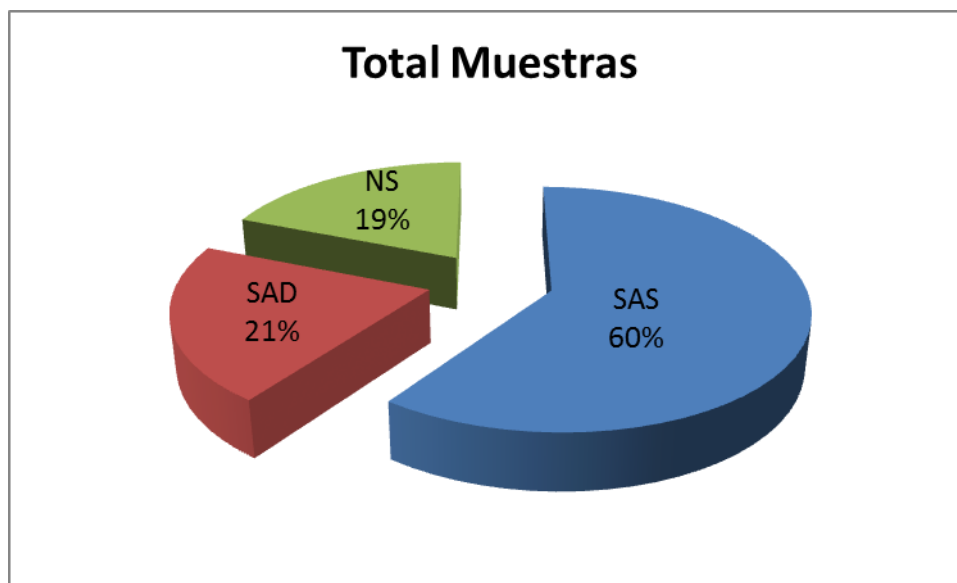
### 3.2. Muestras

Las muestras obtenidas de cada cadáver fueron sangre y humor vítreo del globo ocular derecho, y en el caso de sumersión además 100 ml de agua del lugar del suceso. Las muestras de sangre de cada cadáver se extrajeron de tres localizaciones distintas:

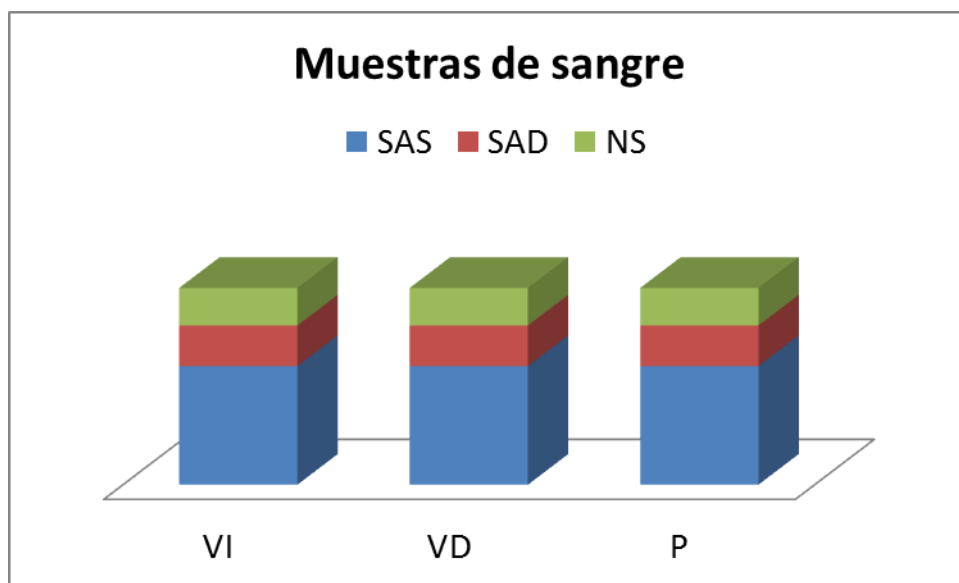
- sangre de ventrículo derecho (VD)
- sangre de ventrículo izquierdo (VI)
- sangre periférica, extraída de la vena femoral ilíaca (P)

Muestras		Grupos diagnósticos		
		Sumersión agua salada	Sumersión agua dulce	No sumersión
Sangre	Ventrículo derecho	41	14	13
	Ventrículo izquierdo	41	14	13
	Sangre periférica	41	14	13
	Humor vítreo	41	14	13
Total		<b>164</b>	<b>56</b>	<b>52</b>

*Tabla 12.* Distribución de las muestras por grupos diagnósticos.



*Figura. 15.* Distribución del total de las muestras por grupos diagnósticos.



*Figura. 16.* Distribución de las muestras de sangre por grupos diagnósticos.



*Figura. 17.* Distribución de las muestras de humor vítreo por grupos diagnósticos.

### 3.3. Recogida de muestras

De cada lugar se extrajeron 5 cc de sangre recogida en un vial con EDTA y para evitar cualquier tipo de contaminación se obtuvieron de la siguiente forma:

- En los casos de sangre de ventrículo (izquierdo y derecho), las muestras se obtuvieron por punción intracardiaca evitando abrir el corazón tras la apertura pericárdica, obteniéndolas bien de venas cavas o de aurícula derecha por un lado y de aorta o ventrículo izquierdo en el lado opuesto.
- En el caso de sangre periférica, las muestras se obtuvieron por punción femoral, bien a través de punción intramuscular o bien con denudamiento del triángulo de Scarpa y exposición de la arteria para su obtención parenteral.

Las muestras recogidas fueron conservadas a  $-70^{\circ}\text{C}$ .



*Figura 18.* Muestras de sangre y humor vítreo.

Las muestras de humor vítreo se obtuvieron del globo ocular derecho, utilizando agujas de calibre 20. El humor vítreo se retiró suavemente por jeringa y se almacenó la muestra congelada a  $-70^{\circ}\text{C}$ . (*Figura 18*). Decidimos analizar el humor vítreo de un solo globo ocular, debido a la controversia que existe sobre las diferencias y similitudes de las concentraciones de este fluido en cada uno de los globos oculares, y en este sentido, hay trabajos que demuestran las dos afirmaciones.

Las muestras de agua extraídas del lugar de sumersión también se conservaron congeladas a  $-70^{\circ}\text{C}$ . (*Figura 19*).



*Figura 19.* Muestras de aguas del lugar de sumersión

### 3.4. Análisis químico

Se llevó a cabo un estudio a doble ciego analizando las muestras en el laboratorio sin conocer los resultados de las autopsias. Todas las determinaciones analíticas se realizaron con un equipo de plasma de acoplamiento inductivo con espectroscopía de masas (ICP-MS) en el Servicio de Apoyo a la Investigación Tecnológica de la Universidad Politécnica de Cartagena. En todas las muestras recogidas se determinaron 19 elementos químicos:

Aluminio	Cadmio	Litio	Plomo
Arsénico	Calcio	Magnesio	Potasio
Bario	Cobre	Manganeso	Selenio
Boro	Estroncio	Molibdeno	Zinc
Bromo	Hierro	Níquel	

#### 3.4.1. Preparación de muestras

Se estudiaron tres métodos de preparación de muestras para la determinación de la concentración de 19 elementos químicos en muestras de sangre humana y humor vítreo post-mortem usando espectrometría de masas de plasma acoplado inductivamente (ICP-MS). Los resultados obtenidos con los tres métodos se compararon para determinar el método de elección.

Los materiales de referencia certificados Seronorm Trace Elements Serum L-2 y Seronorm Trace Elements Whole Blood L-1, fueron sometidos a tres métodos de preparación: *Método 1*, *Método 2* y *Método 3*.

*Método 1:* Digestión por microondas con HNO<sub>3</sub>, HCl y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

*Método 2:* Digestión por microondas con HNO<sub>3</sub>.

*Método 3:* Dilución con agua ultra pura. La muestra de referencia de sangre se diluyó 20 veces. La muestra de referencia de suero se diluyó 10 veces.

#### 3.4.2. Digestión por microondas

La digestión de materiales de referencia y muestras, se realizó en un horno microondas Ethos Plus Milestone con rotor HPR-1000/10S de alta presión (**Figuras 20 y 21**). El procedimiento de digestión más apropiado es la digestión con microondas. Este método reduce en gran medida el tiempo de análisis, su sistema cerrado puede minimizar o eliminar la contaminación, evitar la pérdida de especies volátiles (es decir, Se y As), permite utilizar menor peso de muestra y menos volumen de reactivo, y favorece la seguridad del operador. Beneficios adicionales del sistema de digestión por microondas incluyen la capacidad de digerir matrices complejas que no se prestan fácilmente a la disolución. Con los hornos microondas de laboratorio con control de presión y temperatura se obtienen resultados más controlados y reproducibles que con los métodos convencionales de digestión.

La energía de las microondas es absorbida por las moléculas polares provocando la rotación del dipolo y causando con ello, el calentamiento rápido no sólo de la fase acuosa,

sino también de la propia muestra. Los ácidos utilizados son: el ácido nítrico que es el ácido más común para la oxidación de matrices orgánicas y disuelve la mayoría de los metales formando nitratos solubles con excepciones, por ello a menudo es mezclado con el ácido clorhídrico; el peróxido de hidrógeno es un agente oxidante que añadido al ácido nítrico reduce los vapores nitrosos y acelera la digestión de las muestras orgánicas (Millour, 2011; Agazzi, 2000).

Aunque ICP-MS ha demostrado ser la mejor técnica analítica multielemental para la determinación sensible y rápida de metales traza, la presencia de alto contenido de ácido en las muestras plantea problemas que causan inestabilidad en el plasma e incluso su extinción. La elección de la digestión de la muestra también puede ser la principal fuente de error sistemático. A menudo se emplea la dilución para superar el problema, pero puede afectar a la sensibilidad del método. Por lo tanto, los materiales de referencia se sometieron a otro método de preparación, dilución directa con agua ultrapura.

*Método 1:* Se colocaron las muestras de materiales de referencia (0,50 g) en recipientes de reacción y se digirieron con 9 ml de HNO<sub>3</sub> (65%), 3 ml de HCl (37%) y 2 ml de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30%) en el sistema de digestión por microondas.

*Método 2:* Materiales de referencia (0,50 g) se colocaron en recipientes de reacción y se digirieron con 9 ml de HNO<sub>3</sub> (65%) en el sistema de digestión con microondas.

Las condiciones de digestión para el sistema de microondas se recogen en la **Tabla 13**.

Después de enfriar, las soluciones finales se llevaron a un volumen de 100 ml con agua ultrapura. Un blanco se preparó de la misma manera.

<b>Tabla 13. Programa de microondas</b>			
Fase	Tiempo(min)	Temperatura (°C)	Potencia(W)
<b>1</b>	3	100	700
<b>2</b>	10	165	700
<b>3</b>	5	190	700
<b>4</b>	15	190	700



**Figura 20.** Horno microondas Ethos Plus Milestone.



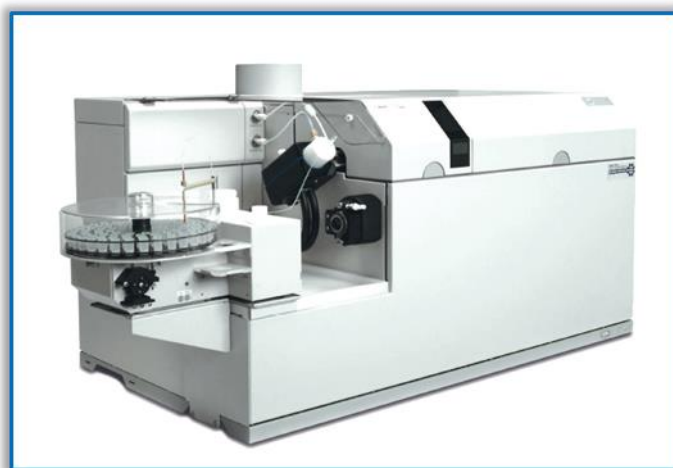
**Figura 21.** Recipientes de reacción del horno microondas.

Materiales de referencia certificados, Seronorm Trace Elements Serum L-2 y Seronorm Trace Elements Whole Blood L-1, fueron adquiridos de SERO AS (Billingstad, Noruega). Para la digestión se utilizaron los ácidos HNO<sub>3</sub> (65%), HCl (37%) de calidad técnica y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30 w/v) para análisis de Panreac AppliChem. Agua ultrapura (18,2 MΩ-cm de resistividad) fue obtenida con el sistema Elix 3/Milli-Q Element System (Millipore, Billerica, MA, USA).



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

La técnica utilizada para el análisis de las muestras fue la espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo, que hizo posible la identificación y cuantificación de los elementos estudiados (McCurdy, 2004; Heitland, 2006; Lu, 2015).



*Figura 22.* ICP-MS Agilent 7500ce

El equipo es un modelo Agilent 7500ce con las siguientes características (*Figura 22*):

- Automuestreador integrado (I-AS)
- Nebulizador concéntrico MicroMist
- Cámara de nebulización tipo Scott doble paso refrigerada por Peltier a 2°C.
- 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 (3 MHz y 2-260 uma)

- Detector simultáneo digital/analógico con 9 órdenes de magnitud de intervalo dinámico lineal.
- Celda de colisión-reacción, con helio como gas de celda.
- Software MassHunter para ICP-MS.

Las condiciones instrumentales fueron optimizadas diariamente y se muestran en **Tabla 14**.

<b>Tabla 14. ICP-MS Condiciones Instrumentales</b>	
RF Power	1500 W
Sample depth	8 mm
Carrier gas	1,0 L/min
Makeup gas	0,3 L/min
Spray chamber temp	2° C
Extract 1	8 V
Extract 2	-58,5 V
Omega bias	-8 V
Omega lens	3 V
Cell entrance	-50 V
QP focus	-14 V
Cell exit	-80 V
Octopole bias	-19 V
QP bias	-17,3 V
Cell gas flow	4,0 ml/min He

La optimización tiene por objeto maximizar la señal analítica y minimizar las interferencias y se llevó a cabo utilizando una solución de 1 µg/L de Li, Co, Y, Ce y Tl en HNO<sub>3</sub> al 1%. La relación de óxidos de  $^{140}\text{CeO}^+ / ^{140}\text{Ce}^+$  y la relación de especies doblemente cargadas de  $^{140}\text{Ce}^{2+} / ^{140}\text{Ce}^+$  se mantuvieron por debajo de 0,7% y 1,4%, respectivamente.

La selección de los estándares internos se hizo tras analizar muestras de sangre en modo semicuantitativo, para determinar qué elementos eran los más adecuados por no estar presentes en las muestras o estar presentes a los niveles más bajos. Se añadieron los elementos Sc, Ga, Rh y Tl a todas las muestras, estándares de calibración y blancos a la misma concentración, 40 µg/L.

Todos los elementos se midieron en modo helio. La cuantificación de todos los isótopos se realizó utilizando los tres puntos centrales de los picos espectrales. Los tiempos de integración por punto se ajustaron a dos segundos. Se realizaron tres repeticiones para cada determinación. La velocidad de la bomba se ajustó a 0,2 rps durante el análisis y el lavado. Los isótopos y los estándares internos utilizados se incluyen en la **Tabla 15**.

El equipo fue calibrado por el método de estándares externos. Las curvas de calibración se realizaron utilizando al menos ocho soluciones de calibración multielementales incluyendo el blanco de calibración y los coeficientes de regresión lineal obtenidos fueron  $R^2 \geq 0,999$  para cada analito. Los rangos de medida se muestran en la **Tabla 15**. La recta de calibración se realizó al comienzo de la secuencia analítica y se midieron patrones de control y blancos cada diez muestras y al final del ensayo.

Los límites de detección instrumentales (IDL) y la concentración equivalente de fondo (BEC), se muestran en la **Tabla 15**. El límite de detección instrumental es definido como 3 veces la desviación estándar del blanco. La concentración equivalente de fondo (BEC) es la señal del blanco expresada como concentración.

**Tabla 15. Isótopos monitorizados, Estándares internos, Rangos de medida, IDLs y BEC**

Elemento	Isótopo (m/z)	Estándar Interno (m/z)	Rango (µg/L)	IDL (µg/L)	BEC (µg/L)
<b>Li</b>	7	45	0 - 200	0,286	0,208
<b>B</b>	11	45	0 - 200	0,687	0,504
<b>Mg</b>	24	45	0 - 10000	0,190	0,621
<b>Al</b>	27	45	0 - 5000	0,269	0,405
<b>K</b>	39	45	0 - 10000	3,957	31,50
<b>Ca</b>	44	45	0 - 10000	3,219	15,71
<b>Mn</b>	55	71	0 - 200	0,031	0,117
<b>Fe</b>	56	71	0 - 5000	0,272	1,732
<b>Ni</b>	60	71	0 - 200	0,010	0,082
<b>Cu</b>	63	71	0 - 200	0,109	0,556
<b>Zn</b>	66	71	0 - 200	0,789	3,017
<b>As</b>	75	71	0 - 200	0,060	0,086
<b>Se</b>	78	71	0 - 200	0,655	0,982
<b>Br</b>	79	71	0 - 2000	0,487	0,718
<b>Sr</b>	88	103	0 - 200	0,030	0,132
<b>Mo</b>	95	103	0 - 200	0,007	0,005
<b>Cd</b>	111	103	0 - 200	0,002	0,004
<b>Ba</b>	137	103	0 - 200	0,019	0,067
<b>Pb</b>	208	205	0 - 200	0,028	0,048

Todas las soluciones utilizadas en el análisis elemental se prepararon con agua ultrapura (18,2 MΩ-cm de resistividad) obtenida con el sistema Elix 3/Milli-Q Element System (Millipore, Billerica, MA, USA).

Ácido nítrico empleado fue Hiperpur HNO<sub>3</sub> (67% v/v) de Panreac.

Las soluciones estándar de 1000 mg/L de los elementos analizados se adquirieron de High Purity Standards (Charleston, EE.UU.) y los patrones de trabajo se prepararon en HNO<sub>3</sub> 1%.

El instrumento se optimizó utilizando una solución de optimización que contenía 7-Li, 59-Co, 89-Y, 140-Ce y 205-Tl (1 µg /L) de High Purity Standards (Charleston, USA).

Soluciones de estándares internos scandium (Sc), galio (Ga), rodio (Rh) y talio (Tl) se adquirieron de 1000 mg/L de High Purity Standards (Charleston, EE.UU.).

El gas de argón utilizado era de pureza espectral (> 99,998%).

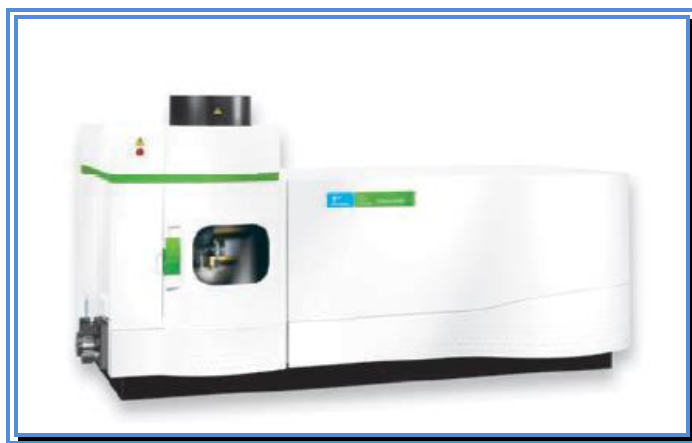
#### 3.4.4. Análisis de materiales de referencia por ICP-MS

El material de referencia certificado Seronorm Trace Elements Serum L-2 y Seronorm Trace Elements Whole Blood, fue sometido a tres métodos de preparación, digestión en el sistema de digestión por microondas (*Método 1 y Método 2*) y dilución con agua ultrapura (*Método 3*). Los análisis se realizaron utilizando las condiciones descritas en las **Tablas 14 y 15**. Estos materiales se eligieron porque representaban diferentes matrices clínicas y contenían una amplia gama de analitos de interés.

### 3.5. Análisis de materiales de referencia por ICP-OES

Los materiales de referencia certificados Seronorm Trace Elements Serum L-2 y Seronorm Trace Elements Whole Blood fueron preparados por dilución con agua Ultrapura y analizados por la técnica analítica: plasma de acoplamiento inductivo con espectrometría de emisión óptica (ICP-OES), para establecer una comparación entre las dos técnicas de análisis elemental que actualmente más se aplican en el análisis de matrices clínicas: ICP-MS e ICP-OES.

#### 3.5.1. Plasma de acoplamiento inductivo con espectrometría óptica (ICP-OES)



*Figura 23.* ICP-OES PerkinElmer® Optima™ 8300

El equipo es un modelo PerkinElmer® Optima™ 8300 con configuración radial y axial y con las siguientes características (*Figura 23*):

- El instrumento está equipado con una fuente de radiofrecuencia de 40 MHz.
- Rejilla Echelle con 79 líneas por mm.
- Detector SCD.
- Antorcha de plasma con 2,0 mm de diámetro interno de inyección.
- Nebulizador concéntrico de vidrio acoplado a una cámara de nebulización ciclónica.

- Se utilizó una interfaz (shear gas) que introducía un fuerte flujo de aire perpendicular a la antorcha para eliminar la baja temperatura en el extremo del plasma.
- Para la introducción de muestras se utilizó un Autosampler 90 plus (PerkinElmer).

Las condiciones instrumentales de funcionamiento se enumeran en la **Tabla 16**.

<b>Tabla 16. ICP-OES Condiciones instrumentales</b>	
RF Power	1500 W
Plasma gas flow rate	8 L/min
Auxiliary gas flow rate	0,2 L/min
Nebulizer gas flow rate	0,7 L/min
Sample flow rate	1 ml/min
View mode	Axial - Radial
Source equilibration time	15 s
Read delay	60 s
Read	Peak area
Replicates	3
Background correction	2-point (manual point correction)
Purge gas	Argon
Shear gas	Air
Gas	Argon

El sistema ICP-OES fue calibrado por el método de estándares externos. Las curvas de calibración se realizaron utilizando al menos ocho soluciones de calibración multi-elementales incluyendo el blanco de calibración. Las soluciones estándar de 1000 mg/L de los elementos analizados se adquirieron de High Purity Standards (Charleston, EE.UU.) y los patrones de trabajo se prepararon con agua ultrapura acidificada con ácido nítrico Hiperpur (Panreac) al 1%. Las soluciones estándar para el análisis de Fe, Ca, Mg y K se prepararon de las siguientes concentraciones 0,5; 1; 5; 10; 25; 50 y 100 mg/L; y para Li, Mn, Co, Cu, Zn, Se, Sr y Cd de 0,05 mg/L, 0,1 mg/L, 0,5 mg/L, 1,0 mg/L, 2,0 mg/L, 5,0 mg/L y 10 mg/L. Las curvas de calibración resultantes tuvieron coeficientes de regresión lineal de  $R^2 \geq 0,999$  para cada analito.

Al igual que con la técnica ICP-MS, se realizó la calibración al comienzo de la secuencia analítica y se evaluó cada diez muestras y al final de la secuencia con uno de los estándares de calibración. Para los fines del control de la contaminación, cada serie de mediciones incluía un blanco de reactivo.

Los límites de detección (LOD) para cada elemento se calcularon como tres veces la desviación estándar de 10 análisis independientes de una solución blanco a la que se le añadió el analito al más bajo nivel de concentración. De la misma forma, los límites de cuantificación (LOQ) fueron calculados como 10 veces la desviación estándar de la misma disolución medida en las mismas condiciones. Los resultados analíticos se muestran en la **Tabla 17**.

También en la **Tabla 17** se muestran las líneas analíticas más sensibles y sin interferencias espectrales en la matriz de la muestra, que fueron utilizadas para el análisis de los elementos estudiados (Broekaert, 2014; Froes, 2015; Padmasubashini, 2016).



<b>Tabla 17. Longitudes de onda analíticas (nm), Límites de detección (LOD) y Límites de cuantificación(LOQ)</b>			
<b>Elementos</b>	<b>Longitudes de onda analíticas (nm)</b>	<b>LOD (µg/L)</b>	<b>LOQ (µg/L)</b>
<b>Li</b>	670.784	6,7	22
<b>Mg</b>	285.213	6,1	20
<b>K</b>	766.490	4,1	14
<b>Ca</b>	317.933	4,8	16
<b>Mn</b>	257.610	5,0	17
<b>Fe</b>	238.204	6,6	22
<b>Co</b>	228.616	5,6	19
<b>As</b>	188.979	30,4	101
<b>Mo</b>	202.031	18,4	61
<b>Cu</b>	327.393	8,7	29
<b>Zn</b>	206.200	5,1	17
<b>Se</b>	196.026	30,9	103
<b>Sr</b>	407.771	6,4	21
<b>Cd</b>	228.802	5,5	18

### 3.6. Análisis Estadístico

El análisis estadístico se realizó con el software IBM® SPSS® Statistics 23. El Análisis de Componentes Principales (PCA) se realizó utilizando el XLSTAT 2016.3 (Addindoft SARL).

#### 3.6.1. Análisis descriptivo de los datos

Se realizó un análisis descriptivo de los datos con el fin de ordenar, presentar, sintetizar y organizar los datos. Se determinaron parámetros de centralización (media y mediana) y parámetros de dispersión (rango, máximo, mínimo y desviación típica).

- *Media*: Valor promedio de un conjunto de valores.
- *Mediana*: Valor de la variable que deja el mismo número de datos antes y después que él.
- *Rango*: Diferencia entre el valor máximo y el valor mínimo de un conjunto de datos. Comparte unidades con los datos.
- *Desviación típica*: Raíz cuadrada de la varianza expresada en las mismas unidades de los datos de la variable objeto de estudio (la varianza es el promedio teórico de las desviaciones cuadráticas de los diferentes valores que puede tomar la variable respecto de su valor medio teórico o esperanza).

En nuestro estudio se han obtenido distintos estadísticos descriptivos de cada una de las variables: media, desviación típica, rango, máximo y mínimo. Y como muchas de las variables analizadas presentaron desviaciones elevadas, se incluyó otra medida de tendencia central como la mediana.

### 3.6.2. Análisis de comparación de medias

Para la comparación de medias se empleó el Test de la U de Mann-Whitney, test no paramétrico utilizado para comparar los valores de dos variables cuantitativas u ordinales de dos muestras independientes que pueden tener tamaños distintos. En nuestro estudio se utiliza para comparar los valores obtenidos entre dos grupos diagnósticos.

Para comparar los valores obtenidos en los distintos grupos diagnósticos se empleó el Test de Kruskal-Wallis, que es un test no paramétrico que se utiliza para comparar los valores de variables cuantitativas u ordinales de tres o más muestras independientes.

En nuestro estudio se han comparado las medias de las concentraciones de los elementos químicos en cada una de las localizaciones sanguíneas de cada uno de los grupos diagnósticos. Se compararon los tres grupos a la vez, y luego dos a dos. De la misma forma se hizo con las muestras de humor vítreo. En todos los test aplicados en este estudio se han considerado diferencias estadísticamente significativas para una probabilidad  $p \leq 0,05$ .

### 3.6.3. Análisis de correlación

Para valorar la asociación entre dos variables cuantitativas hemos aplicado el método conocido como correlación. El coeficiente de correlación de Pearson cuantifica la fuerza de la relación lineal entre dos variables cuantitativas. Su valor oscila entre -1 y 1, 1 indica una relación directa y perfecta y -1 indica una relación inversa y perfecta. Una correlación próxima a 0 indica que no hay relación lineal entre las dos variables.

Cuando las variables estudiadas no siguen una distribución normal se utiliza el coeficiente de Spearman que tiene el mismo significado que el coeficiente de Pearson.

En nuestro estudio, como las variables no se ajustan a una distribución normal, se ha utilizado la Correlación de Spearman para comprobar si existe una correlación positiva entre las concentraciones de los elementos químicos en el agua de sumersión y las concentraciones en sangre en los distintos grupos diagnósticos y entre la concentración de

los elementos en el medio de sumersión y las concentraciones en humor vítreo en los distintos grupos diagnósticos.

#### 3.6.4. Curvas ROC (“Receiver Operating Characteristic”: Curva de característica operativa para el receptor)

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

La exactitud de un test diagnóstico puede definirse en función de su sensibilidad y especificidad. Sin embargo, con mucha frecuencia los resultados de las pruebas diagnósticas están distribuidos en una escala continua, por lo que es necesario seleccionar un punto de corte o valor límite adecuado que permita resumir estos resultados en dos categorías: positivo y negativo. La sensibilidad de una prueba diagnóstica es la probabilidad de obtener un resultado positivo y la especificidad de una prueba indica la probabilidad de obtener un resultado negativo. No existe ninguna manera teórica de medición de estas dos características de una prueba.

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

A modo de referencia, en todo gráfico de curva ROC se traza una línea desde el punto 0,0 al punto 1,1, llamada diagonal de referencia o línea de no-discriminación que describe la

capacidad discriminativa de un test diagnóstico. Así, un test diagnóstico tendrá mayor capacidad discriminativa en la medida que sus puntos de corte tracen una curva ROC lo más lejana posible a la línea de no-discriminación. Cualitativamente, cuanto más próxima es una curva ROC a la esquina superior izquierda, más alta es la exactitud global de la prueba. De la misma forma, si se dibujan en un mismo gráfico las curvas obtenidas con distintas pruebas diagnósticas, aquella que esté situada más hacia arriba y hacia la izquierda tiene mayor exactitud: por simple observación se obtiene una comparación cualitativa. Como ya se ha indicado, los ejes del gráfico de curva ROC adoptan valores entre 0 y 1 (0% y 100%), delimitando un cuadrado de  $\text{área}=1,00$ . Por tanto, un test diagnóstico se considera no-discriminativo si su curva ROC coincide con la línea de no-discriminación, la cual posee un  $\text{área}=0,50$ .

En nuestro estudio, para cada una de las concentraciones de los distintos marcadores químicos estudiados en las tres localizaciones sanguíneas y en humor vítreo se realizó una curva ROC y se calculó el área bajo la curva utilizando un método no paramétrico. El análisis de estas curvas se ha utilizado para evaluar la eficacia diagnóstica de cada marcador bioquímico o su capacidad para discriminar entre sumersión y otras causas de muerte y entre sumersión en agua salada y otras causas de muerte. Superponiendo las curvas correspondientes a las diferentes ecuaciones de regresión se pueden identificar los marcadores que tienen mayor sensibilidad y especificidad. Seleccionamos los marcadores con áreas bajo la curva mayores de 0,70. El punto de corte para cada variable se tomó como el punto más cercano al punto "ideal" de la curva ROC en la que la sensibilidad sería 1 y la 1-especificidad sería 0.

### 3.6.5. Análisis discriminante

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

suponemos que se diferencian los grupos se utilizan como variables independientes (también llamadas variables discriminantes).

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

En nuestro estudio, realizamos el análisis discriminante con aquellos marcadores bioquímicos que mostraban las curvas ROC que mejor discriminaban entre los casos de sumersión en agua salada y los casos de no sumersión, utilizando como variable dependiente grupo diagnóstico y como variables independientes las concentraciones de los distintos elementos traza.

#### 3.6.6. Análisis de componentes principales

El Análisis de Componentes Principales (PCA) es una técnica que permite la identificación de las relaciones entre las variables y las observaciones y la estructura en los datos a detectar. PCA reduce la dimensionalidad de la matriz de datos original mediante la construcción de componentes principales (PC) que son combinaciones lineales de las variables originales. Las primeras componentes principales captan gran parte de la variabilidad en los datos originales. Los datos se autoescalaron y se siguió el criterio de Kaiser, sólo los PC con valores propios mayores que la unidad se mantuvieron.

En nuestro estudio se ha aplicado el análisis de componentes principales para estudiar la posible existencia de agrupaciones y relaciones entre las muestras de sangre de las tres localizaciones en los tres grupos diagnósticos y las medias de las concentraciones de los elementos estudiados.

## **4. RESULTADOS**





#### 4.1. Análisis comparativo de técnicas instrumentales

##### 4.1.1. Resultados del análisis de los materiales de referencia por ICP-MS

El material de referencia certificado Seronorm Trace Elements Serum L-2 y Seronorm Trace Elements Whole Blood, fue sometido a tres métodos de preparación, digestión con el sistema de digestión por microondas (*Método 1 y Método 2*) y dilución con agua ultrapura (*Método 3*). Las concentraciones de los elementos se presentan en las *tablas 18 y 19*.

**Tabla 18. Valores obtenidos y certificados de la concentración de los elementos en Seronorm Trace Elements Whole Blood L-1**

Elemento	Valor certificado		Método 1	Método 2	Método 3
	Valor analítico	Rango aceptable	Valor obtenido(rsd)	Valor obtenido(rsd)	Valor obtenido (rsd)
<b>Mn (µg/L)</b>	20,1±1,9	16,3-23,9	37,66 (2,3)	38,69 (1,6)	19,01 (2,9)
<b>Co (µg/L)</b>	0,23±0,074	0,12-0,34	nd	nd	nd
<b>Cu (mg/L)</b>	0,645±0,02	0,601-0,689	0,768 (3,9)	0,670 (4,8)	0,653 (1,7)
<b>Zn (mg/L)</b>	4,906±0,177	4,552-5,26	4,921(2,0)	4,709(2,4)	5,026(2,4)
<b>As (µg/L)</b>	5,5±1,4	2,7-8,3	nd	nd	5,94(19,3)
<b>Se (µg/L)</b>	75±20	35-115	nd	nd	73,229 (1,4)
<b>Sr (µg/L)</b>	24*±2		nd	nd	24,71 (1,8)
<b>Mo (µg/L)</b>	0,8±0,16	0,56-1,04	nd	nd	nd
<b>Cd (µg/L)</b>	0,67±0,04	0,59-0,75	nd	nd	nd
<b>Fe (mg/L)</b>	335*±8		345,94 (2,3)	340,38 (1,0)	303,4 (2,2)
<b>Mg (mg/L)</b>	16,6*±0,6		27,80 (8,6)	22,71 (5,6)	17,03 (2,2)
<b>K (mg/L)</b>	1130*±22		1306,6 (9,1)	1253,1(2,3)	1226,9 (1,8)
<b>Ca (mg/L)</b>	14,5*±0,4		32,12 (2,34)	22,15 (4,8)	14,1 (1,9)

Nd: no detectado

Rsd: desviación estándar relativa

\*Valores aproximados

**Tabla 19. Valores obtenidos y certificados de la concentración de los elementos en Seronorm Trace Elements Serum L-2**

Elemento	Valor certificado		Método 1	Método 2	Método 3
	Valor analítico	Rango aceptable	Valor obtenido (rsd)	Valor obtenido (rsd)	Valor obtenido (rsd)
<b>Mn (µg/L)</b>	19,9±1,1	17,7-22,1	32,80(4,4)	31,49 (3,7)	20,86 (0,3)
<b>Co (µg/L)</b>	3,2±0,2	2,8-3,6	9,79(6,8)	2,140(2,9)	5,475(5,6)
<b>Li (mg/L)</b>	10,95±0,97	10,29-11,60	11,286 (1,2)	11,197 (1,6)	10,945 (2,0)
<b>Cu (mg/L)</b>	2,887±0,99	2,689-3,085	3,048(1,4)	2,952 (1,2)	2,903(1,6)
<b>Zn (mg/L)</b>	2,52±0,206	2,108-2,932	3,544(2,2)	2,275 (1,0)	2,422 (3,2)
<b>As (µg/L)</b>	0,67*		nd	nd	nd
<b>Sr (µg/L)</b>	36,3*		4,85 (1,5)	11,65 (8,2)	37,82 (1,8)
<b>Mo (µg/L)</b>	0,9*		nd	nd	nd
<b>Cd (µg/L)</b>	0,13*		nd	nd	nd
<b>Fe (mg/L)</b>	2,03±0,13	1,77-2,29	3,22 (1,8)	6,12 (1,0)	2,32 (1,0)
<b>Mg (mg/L)</b>	40,8±4,7	36,1-45,5	30,85 (3,2)	25,69 (1,6)	44,13 (3,9)
<b>K (mg/L)</b>	240*		236,5 (1,8)	252,87 (2,8)	246,85 (1,7)
<b>Ca (mg/L)</b>	145±8	136-154	138,0 (0,9)	138,37 (2,9)	142,6 (1,1)

Nd: no detectado

Rsd: desviación estándar relativa

\*Valores aproximados

Los resultados obtenidos en las muestras diluidas presentan una correspondencia con los valores certificados para los elementos mayoritarios Fe, Mg, K y Ca, y para los minoritarios Mn, Cu, Zn y Sr, tanto en sangre como en suero. También para Li en suero y para Se en sangre. Con los métodos de digestión ácida solo se obtuvieron buenos valores para Cu, Zn y K en sangre y en suero, para el Fe solo en sangre y para Li y Ca sólo en suero.

Para Mo y Cd no se obtuvo concordancia con los valores certificados con ninguno de los métodos de preparación de muestras. Aunque estos elementos son ionizados por el plasma de Ar del 85% al 95%, presentaban niveles de concentración muy bajos que no pudieron ser

detectados por ICP-MS con ninguno de los métodos de preparación de la muestra. Igualmente, los niveles bajos de Co en sangre y de As en el suero, no pudieron ser determinados por ICP-MS.

Para Mn obtuvimos una buena correspondencia con los valores certificados con el *Método 3* en sangre y suero y concentraciones mayores que los valores recomendados con los *Métodos 1 y 2*. Esto se debe a que con la digestión la señal analítica baja se ve afectada por errores en la digestión causados por el gran volumen de extracto final (0,5 g de muestra y 100 ml de extracto final).

Para Sr y Mg obtuvimos una buena concordancia con los valores certificados con el *Método 3* en sangre y suero. Para Sr obtuvimos concentraciones inferiores a las recomendadas con los *Métodos 1 y 2* en sangre y suero y para Mg en suero. Además, se obtuvieron concentraciones mayores de Mg que los valores certificados con los métodos de digestión en sangre. Con la digestión, la señal elevada del analito es susceptible a la supresión de otras especies de la matriz y la señal baja del analito es afectada por errores en la digestión ácida. También es importante señalar que el Mg es un elemento muy común en la naturaleza y la contaminación puede ser un problema. Todos estos factores pueden haber contribuido a la inconsistencia de los resultados obtenidos con los métodos de digestión.

Para Se obtuvimos un buen resultado en sangre con el método de dilución. El selenio es un elemento difícil de cuantificar con precisión por ICP-MS por varias razones: en primer lugar, el selenio tiene un alto potencial de ionización (9,75 eV) que reduce su ionización en el plasma (35%), causando baja sensibilidad y susceptibilidad creciente a la supresión de matriz. En segundo lugar, es un elemento altamente volátil que puede perderse en procedimientos de preparación de muestras de recipientes abiertos, y en tercer lugar todos los isótopos de Se sufren de interferencias severas.

Se obtuvieron mejores correspondencias con los valores recomendados de Fe con ambos métodos de preparación de muestra en sangre total, que contiene concentraciones de Fe mucho más altas (335 mg/L) que, en la muestra de suero, que contiene 2,15 mg/L. Sin embargo, la concordancia con el valor recomendado fue mejor para el Ca en suero que contiene mayores concentraciones de Ca (145 mg/L) que, en sangre, que contenía 14,5

mg/L. Como se ha comprobado anteriormente, el Fe puede ser difícil de determinar por ICP-MS ya que los 4 isótopos sufren de interferencias isobáricas o poliatómicas. Las interferencias poliatómicas derivadas del plasma interfieren con tres de los cuatro isótopos estables de hierro y también, en muestras ricas en calcio, se producen interferencias isobáricas. La celda de colisión/reacción con gas de celda helio elimina todas las interferencias poliatómicas sin crear nuevas interferencias. Sin embargo, es conveniente la medición de tres isótopos como técnica de control de calidad necesaria para identificar las interferencias isobáricas en las muestras. Para el análisis del calcio, el isótopo  $^{40}\text{Ca}$  y el isótopo  $^{44}\text{Ca}$  están sujetos a la interferencia de iones en el plasma que provoca el aumento de los límites de detección para estos isótopos. Normalmente, Ca es muy difícil de determinar a niveles bajos. El método de dilución (*Método 3*) y los métodos de digestión (*Método 1* y *Método 2*) mostraron una buena correspondencia con los valores certificados de Ca en la muestra de suero y sólo el método de dilución en la muestra de sangre. Los métodos de digestión proporcionaron resultados superiores a los valores certificados en sangre por los errores que se producen en la digestión y que se han mencionado anteriormente.

El método de dilución proporcionó una correspondencia con los valores certificados en los materiales de referencia para diez elementos en sangre y suero, mientras que el método de digestión sólo mostró correspondencia para cuatro elementos en sangre y cinco en suero.

#### 4.1.2. Resultados del análisis de los materiales de referencia por ICP-OES

Tras comprobar que con el método de dilución se obtuvieron los mejores resultados, los materiales de referencia certificados Seronorm Trace Elements Serum L-2 y Seronorm Trace Elements Whole Blood fueron preparados por dilución con agua Ultrapura y analizados por ICP-OES. Los resultados se muestran en las **Tablas 20** y **21**.

**Tabla 20. Resultados de los análisis de ICP-OES. Valores certificados y obtenidos de concentraciones elementales en Seronorm Trace Elements Whole Blood L-1**

Elemento	Valor certificado		Valor obtenido (rsd)
	Valor analítico	Rango aceptable	
Li (mg/L)	0,001*		nd
Mn (µg/L)	20,1±1,9	16,3-23,9	nd
Co (µg/L)	0,23±0,074	0,12-0,34	nd
Cu (mg/L)	0,645±0,02	0,60-0,689	0,857 (2,95)
Zn (mg/L)	4,906±0,17	4,55-5,26	3,760
As (µg/L)	5,5±1,4	2,7-8,3	nd
Se (µg/L)	75±20	35-115	nd
Sr (µg/L)	24*±2		nd
Mo (µg/L)	0,8±0,16	0,56-1,04	nd
Cd (µg/L)	0,67±0,04	0,59-0,75	nd
Fe (mg/L)	335*±8		342,2 (0,58)
Mg (mg/L)	16,6*±0,6		17,16 (2,07)
K (mg/L)	1130*±22		1139,6 (3,3)
Ca (mg/L)	14,5*±0,4		12,23 (6,08)

Nd: no detectado

Rsd: desviación estándar relativa

\*Valores aproximados

**Tabla 21. Resultados de los análisis de ICP-OES. Valores certificados y obtenidos de las concentraciones elementales en Seronorm Trace Elements Serum L-2**

Elemento	Valor certificado		Valor obtenido (rsd)
	Valor analítico	Rango aceptable	
Li (mg/L)	10,950±969	10,293-11,607	14,338 (1,286)
Mn (µg/L)	19,9±1,1	17,7-22,1	nd
Co (µg/L)	3,2±0,2	2,8-3,6	nd
Cu (mg/L)	2,887±0,099	2,689-3,085	3,102 (5,296)
Zn (mg/L)	2,520±206	2,108-2,932	1,903 (2,807)
As (µg/L)	0,67*		nd
Se (µg/L)	163±10	143-183	nd
Sr (µg/L)	36,3*		nd
Mo (µg/L)	0,9*		nd
Cd (µg/L)	0,13*		nd
Fe (mg/L)	2,03±0,13	1,77-2,29	1,511 (1,335)
Mg (mg/L)	40,8±4,7	36,1-45,5	36,7621 (1,628)
K (mg/L)	240*		244,097 (4,244)
Ca (mg/L)	145±8	136-154	139,07 (4,95)

Nd: no detectado

Rsd: desviación estándar relativa

\*Valores aproximados

Como muestran los resultados de las *tablas 29 y 30*, hemos obtenido una buena concordancia con los valores certificados para Fe, Mg, K y Ca tanto en sangre como en suero, para Cu en suero y para Zn los valores obtenidos son próximos a los certificados en sangre y suero. Es decir, buena concordancia para los elementos con concentraciones de orden de mg/L y no concordancia para los elementos con concentraciones de orden de µg/L. Como puede observarse, con la técnica ICP-MS se obtuvieron mejores resultados que con la técnica ICP-OES.

4.1.3. Comparación de las técnicas ICP-MS e ICP-OES con el análisis de muestras de humor vítreo.

En las *Tablas 22* y *23* se muestran las concentraciones obtenidas de los elementos estudiados en 12 muestras humanas de humor vítreo analizadas por las dos técnicas.

**Tabla 22. Resultados de los análisis de ICP-MS de muestras de humor vítreo**

Elemento	Media	Desviación estándar	Mínimo	Máximo	Rango
Li (µg/L)	1,28	1,22	0,00	3,33	3,33
Mn (µg/L)	0,24	0,54	0,00	1,50	1,50
Co (µg/L)	0,39	0,99	0,00	3,30	3,30
Cu (µg/L)	16,04	10,58	0,00	35,32	35,32
Zn (mg/L)	0,568	0,323	0,015	1,003	0,987
As (µg/L)	1,28	1,66	0,00	4,42	4,42
Se (µg/L)	5,49	3,27	0,00	9,15	9,15
Sr (µg/L)	44,32	17,51	15,24	66,38	51,14
Mo (µg/L)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Cd (µg/L)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Fe (µg/L)	33,09	32,05	0,00	72,84	72,84
Mg (mg/L)	24,15	6,16	12,46	35,23	22,78
K (mg/L)	410,82	156,59	176,58	613,85	437,27
Ca (mg/L)	34,86	23,21	4,25	78,87	74,61

**Tabla 23. Resultados de los análisis de ICP-OES de muestras de humor vítreo**

Elemento	Media	Desviación estándar	Mínimo	Máximo	Rango
<b>Mg (mg/L)</b>	24,45	6,74	12,17	34,62	22,45
<b>K (mg/L)</b>	393,77	138,21	183,32	591,54	408,22
<b>Ca (mg/L)</b>	32,79	28,00	3,66	95,98	92,32

En las muestras de humor vítreo, muchos de los elementos analizados por ICP-MS mostraron concentraciones muy bajas como es el caso de Li, Mn, Co, Se y As y para Cd y Mo no se detectó ninguna señal. Cu, Sr y Fe mostraron concentraciones algo más altas, pero por debajo de 45  $\mu\text{g/L}$  y Zn alrededor de 0,5 mg/L. Por otro lado, Mg, K y Ca mostraron concentraciones elevadas.

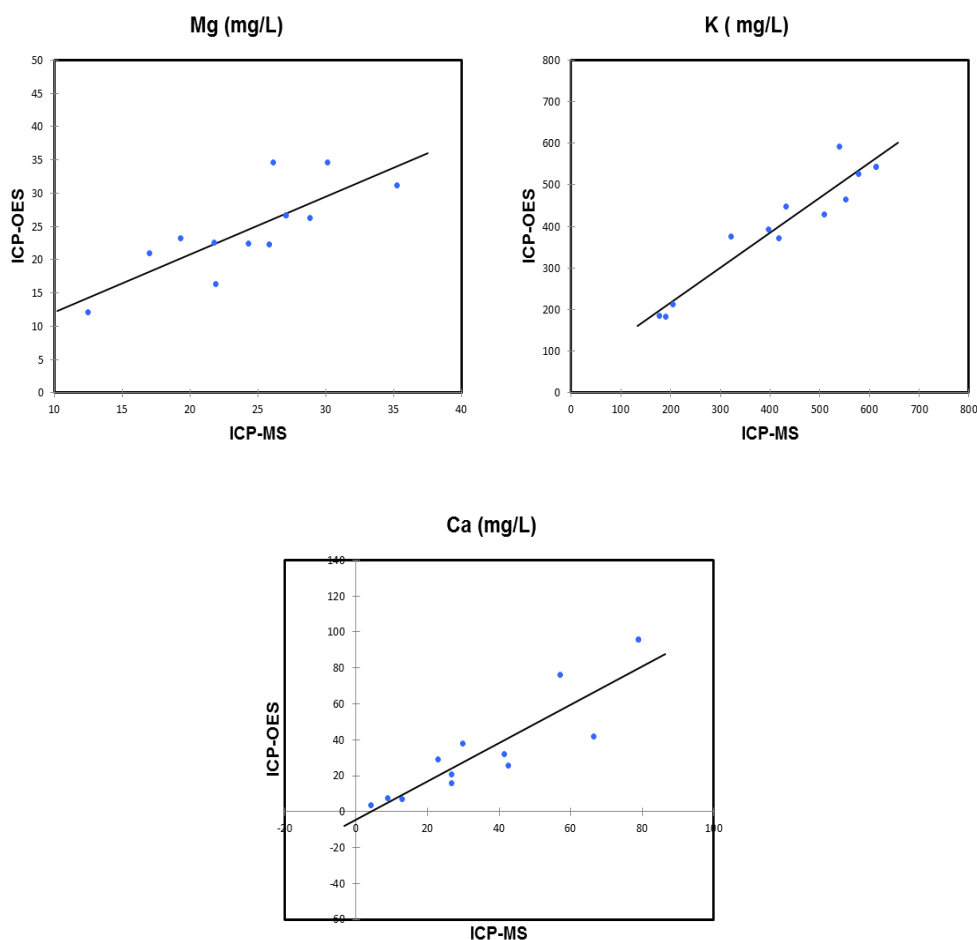
Para casi todos los elementos analizados por ICP-OES, no se detectó ninguna señal excepto para los tres elementos de mayor concentración: K, Ca y Mg. Estos resultados se deben a dos razones, por un lado, los límites de detección no son demasiado bajos y la sensibilidad de la técnica es moderada y por otro, es necesario diluir las muestras para su análisis debido a la consistencia, naturaleza y alta viscosidad del humor vítreo.

Se realizó un análisis de regresión lineal para verificar la relación entre las dos técnicas de análisis estudiadas en la determinación de Mg, K y Ca en muestras de humor vítreo (*Tabla 24*). Las gráficas se muestran en la *Figuras 24-26*.

**Tabla 24. Análisis de regresión lineal de los resultados con ICP-MS vs. ICP-OES en muestras de humor vítreo**

Elementos	R <sup>2</sup>	Slope	y-Intercepts	$\rho$
<b>Mg</b>	0,627	0,867	3,516	0,002
<b>K</b>	0,908	0,841	48,315	0,000
<b>Ca</b>	0,788	1,071	-4,541	0,000





**Figuras 24-26.** Rectas de regresión lineal de los resultados con la técnica ICP-MS vs técnica ICP-OES en muestras de humor vítreo.

Los análisis de regresión mostraron una muy buena correlación entre los dos métodos ( $R^2 > 0,90$ ) para K. Se obtuvieron asociaciones menores ( $R^2 < 0,80$ ) entre las dos técnicas de análisis para Mg y Ca. Para los tres elementos mostrados en la **Tabla 24**, los coeficientes de determinación son estadísticamente significativos con  $p < 0,005$ , lo que indica que hay una asociación entre los dos métodos de análisis por regresión lineal. No se obtuvo ninguna asociación entre las dos técnicas de análisis para los restantes elementos estudiados. Esto se relaciona con las bajas concentraciones de los analitos en muestras de humor vítreo y el factor de dilución a aplicar, lo que conduce a una escasa sensibilidad y estabilidad en el análisis por ICP-OES.

#### 4.2. Análisis descriptivo de las muestras y de las diferencias según sexo, edad e intervalo post-mortem

La muestra final está compuesta por 68 casos de autopsias forenses, de los cuales 57 fueron hombres (83,8%) y 11 mujeres (16,2%). La distribución según el grupo diagnóstico se muestra en la **Tabla 25**.

La media de edad de los sujetos fue de 48,38 años (SD= 19,52; rango= 15-92 años). Según el grupo diagnóstico los valores descriptivos de la edad se muestran en la **Tabla 25**.

El intervalo post-mortem medio fue de 26,7 horas (SD= 37,8; 95% CI: 23,9-29,6 horas; rango= 11-58 h). Los valores descriptivos del intervalo post-mortem distribuidos por grupo diagnóstico se muestran en la **Tabla 25**.

Grupos	Sexo	Edad (años)		Intervalo post-mortem (horas)		
		Hombre/Mujer	Media	SD	Media	SD
<b>Sumersión</b>		47/8	46,74	19,551	27,69	12,365
<b>Sumersión agua salada</b>		36/5	44,39	19,944	29,29	13,216
<b>Sumersión agua dulce</b>		11/3	54,75	16,432	23,00	8,115
<b>No sumersión</b>		10/3	55,08	18,666	23,00	8,727
<b>TOTAL</b>		57/11	48,38	19,527	26,79	11,845

**Tabla 25.** Distribución de los casos por grupo diagnóstico, sexo, edad e intervalo post-mortem.

### 4.3. Análisis de las concentraciones de los elementos químicos en muestras de sangre

La **Tabla 26** muestra los valores (media, desviación estándar, mediana, mínimo, máximo y rango) obtenidos para los marcadores bioquímicos en la sangre periférica (P), sangre del ventrículo izquierdo (VI) y sangre del ventrículo derecho (VD) en el grupo diagnóstico sumersión en agua salada (SAS). En ella se observa que los elementos que presentan mayores concentraciones en la sangre de las tres localizaciones son K, Mg, Ca, Br, Zn y Cu en niveles de mg/L. El resto de los elementos presentan concentraciones en niveles de  $\mu\text{g/L}$ , entre los que se encuentra el Sr que llega a alcanzar 1 mg/L en la sangre del ventrículo izquierdo y boro con una concentración de 535  $\mu\text{g/L}$  en VI, seguidos del resto de elementos entre los que encontramos Se, Al, Ba, Mn y Cd. Y, por último, los que presentan menor concentración As, Li, Ni, Mo y Pb.

La **Figura 27** muestra el perfil elemental de los elementos minoritarios ( $\mu\text{g/L}$ ) en la sangre periférica del grupo diagnóstico de SAS. La **Figura 28** muestra el perfil elemental de los elementos mayoritarios (mg/L) en la sangre periférica del grupo diagnóstico SAS. De la misma manera, las **Figuras 29 y 30** para la sangre del ventrículo izquierdo, y las **Figuras 31 y 32** para la sangre del ventrículo derecho. Se observa que los perfiles de los elementos minoritarios son similares en las tres localizaciones sanguíneas siendo los elementos que presentan mayor concentración Sr, B, Al y Se, destacando las concentraciones más altas para Sr y B en la sangre del ventrículo izquierdo, seguidas de las de la sangre del ventrículo derecho y finalmente las de la sangre periférica. Le siguen en concentración Ba, Mn y Cd mostrando mayores niveles en la sangre del ventrículo derecho. Muestran concentraciones muy bajas en las tres localizaciones sanguíneas Pb, Mo, Ni, Li y As. En cuanto a los elementos mayoritarios, los de mayor concentración en la sangre ventricular son por este orden K, Mg y Ca, seguidos de Br en la sangre del ventrículo izquierdo y de Fe en la sangre del ventrículo derecho, mientras que en la sangre periférica el K es el más concentrado seguido de Ca, Mg y Fe.

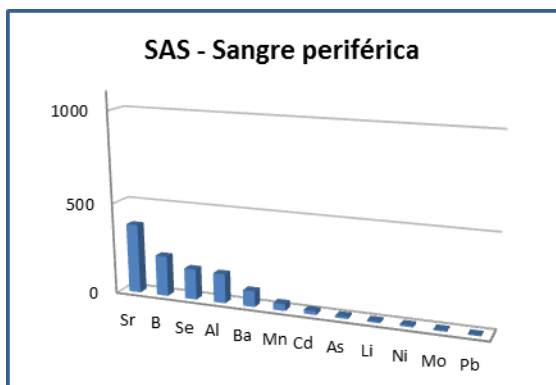
La **Figura 27a** muestra las concentraciones de todos los elementos estudiados en la sangre de las tres localizaciones del grupo diagnóstico SAS en escala logarítmica. Observamos en esta figura que los elementos que muestran mayor concentración en la sangre del ventrículo izquierdo frente a las otras dos localizaciones sanguíneas son Mg, Ca, Br, Sr, B y Li, mientras

que el resto de elementos estudiados presentan una mayor concentración en la sangre del ventrículo derecho, salvo el Ni con una concentración muy baja y similar en las tres localizaciones sanguíneas.

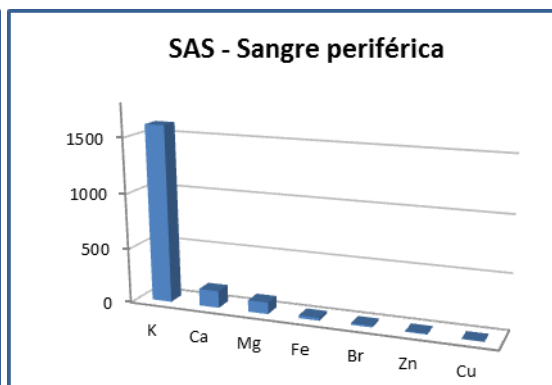
Resultados

<i>Tabla 26. Sumersión en agua salada. Sangre periférica (N=41), sangre ventrículo izquierdo (N=41), sangre ventrículo derecho(N=41)</i>							
		Media	Mediana	Desviación estándar	Mínimo	Máximo	Rango
Li (µg/L)	P	8,54	4,71	12,12	0,00	58,8	58,8
	VI	21,03	11,01	24,39	0,00	99,95	99,95
	VD	12,7	8,3	18,73	0,00	111,03	111,03
B (µg/L)	P	221,18	146,75	260,63	0,00	1143	1143
	VI	535,38	295	643,49	0,00	2483,39	2483,39
	VD	330,06	194,18	434,27	0,00	2612,5	2612,5
Mn (µg/L)	P	36,81	9,74	83,74	0,00	487,34	487,34
	VI	52,88	20,1	70,23	0,00	290	290
	VD	182,48	80,9	331,73	0,00	1809	1809
Ni (µg/L)	P	8,43	0,00	40,08	0,00	257	257
	VI	6,09	0,00	23,62	0,00	151	151
	VD	8,81	0,00	28,12	0,00	150,82	150,82
Cu (µg/L)	P	1161,78	1044,42	421,34	301	2514,06	2213,06
	VI	1203,16	970,35	694,2	296,35	3131,79	2835,44
	VD	2174,64	1536,83	1793,96	90,95	8126,01	8035,06
Zn (µg/L)	P	7468,16	2926,5	15123,36	1582,46	71518	69935,54
	VI	7715,65	3793,98	14081,97	1142,89	79746	78603,11
	VD	12936,69	5428,81	21799,01	484,51	121490	121005,49
As (µg/L)	P	11,74	5,85	15,2	0,00	63,46	63,46
	VI	12,78	5,52	19,87	0,00	97,87	97,87
	VD	17,05	8,66	24,66	0,00	110	110
Se (µg/L)	P	168,19	150,62	139,4	0,00	968	968
	VI	161,58	125,02	165,78	0,00	1080	1080
	VD	201,74	185,53	154,33	0,00	1061	1061
Sr (µg/L)	P	380,15	237,54	395,34	62,44	1609,9	1547,4
	VI	1062,2	628,47	1143,8	134,59	5413,3	5278,7
	VD	613,91	328,56	709,89	106,97	3823,9	3716,9
Mo (µg/L)	P	6,86	0,00	24,28	0,00	148,16	148,16
	VI	7,81	0,00	17,73	0,00	84,73	84,73
	VD	34,28	7,98	66,44	0,00	311,6	311,6
Cd (µg/L)	P	19,57	2,59	41,62	0,00	182,54	182,54
	VI	64,77	10,76	114,51	0,00	568,43	568,43
	VD	157,58	49,52	256,15	0,00	1337,68	1337,68
Ba (µg/L)	P	86,36	25,01	245,6	1,16	1273	1271,84
	VI	82,02	28,56	214,05	1,02	1129	1127,98
	VD	103,29	29,46	229,59	1,69	1139	1137,31
Pb (µg/L)	P	3,36	0,00	5,77	0,00	23,51	23,51
	VI	6,69	3,5	9,87	0,00	41,09	41,09
	VD	22,62	5,44	71,38	0,00	456	456
Al (µg/l)	P	160,32	49,01	463,02	0,00	2239	2239
	VI	174,63	55,36	412,62	0,00	2117	2117
	VD	223,15	63,74	613,23	0,00	2995	2995
Fe (µg/L)	P	24745,37	6282,63	61654,31	1590	284795,6	283205,6
	VI	21258,53	9227,89	34986,13	2,02	178214	178211,98
	VD	29167,94	14079	42851,9	1746,82	202299	200552,18
Br (mg/L)	P	14,51	10,6	13,8	3,7	74,84	71,14
	VI	22,04	17,61	14,62	6,6	70,27	63,67
	VD	16,86	15,29	9,55	5,74	56,94	51,2
Mg (mg/L)	P	105,91	88,69	63,38	44,76	317,8	273,04
	VI	204,48	141,56	161,34	68,4	770,54	702,14
	VD	155,91	114,24	159,74	64,3	1062,52	998,22
K (mg/L)	P	1607,22	1417,4	813,21	694,15	4963,5	4269,35
	VI	1487,01	1301,12	680,22	693,66	4109,76	3416,11
	VD	1748,43	1568,17	632,14	897,42	3739,34	2841,92
Ca (mg/L)	P	154,39	148,14	64,06	0,00	491,96	491,96
	VI	168,68	153,27	84,68	0,00	509,8	509,8
	VD	150,91	137,92	72,57	36,66	511,44	474,78

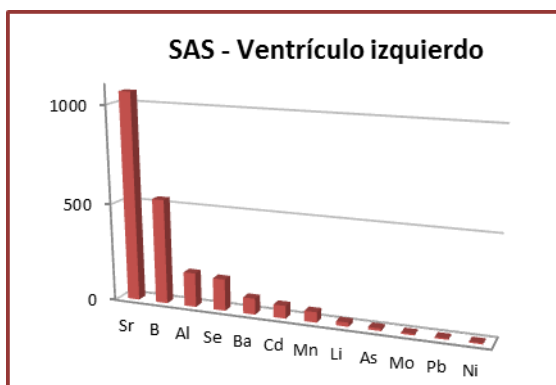
P: Sangre periférica; VI: Sangre ventrículo izquierdo; VD: Sangre ventrículo derecho



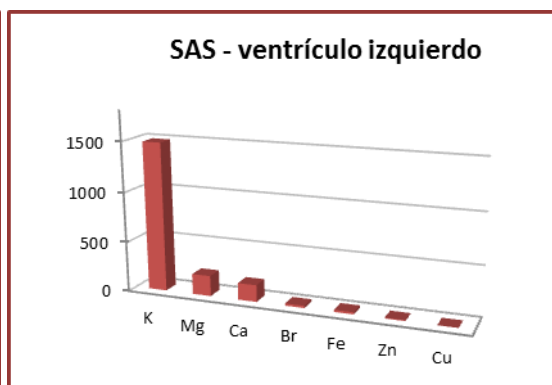
**Figura 27.** Perfil elemental, elementos minoritarios ( $\mu\text{g/L}$ ) en sangre periférica del grupo SAS.



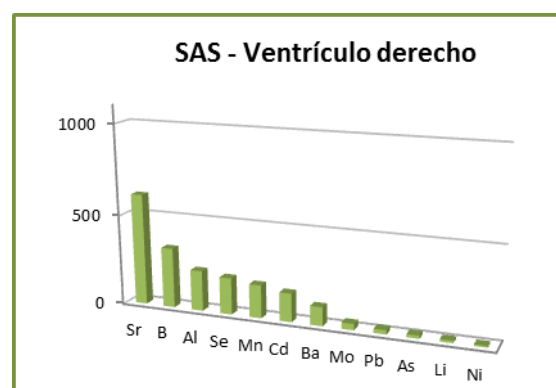
**Figura 28.** Perfil elemental, elementos mayoritarios ( $\text{mg/L}$ ) en sangre periférica del grupo SAS.



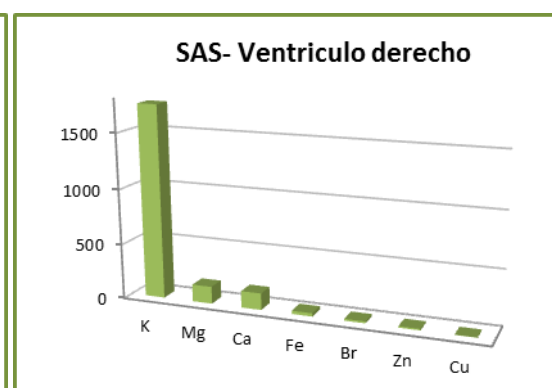
**Figura 29.** Perfil elemental, elementos minoritarios ( $\mu\text{g/L}$ ) en sangre del ventrículo izquierdo del grupo SAS.



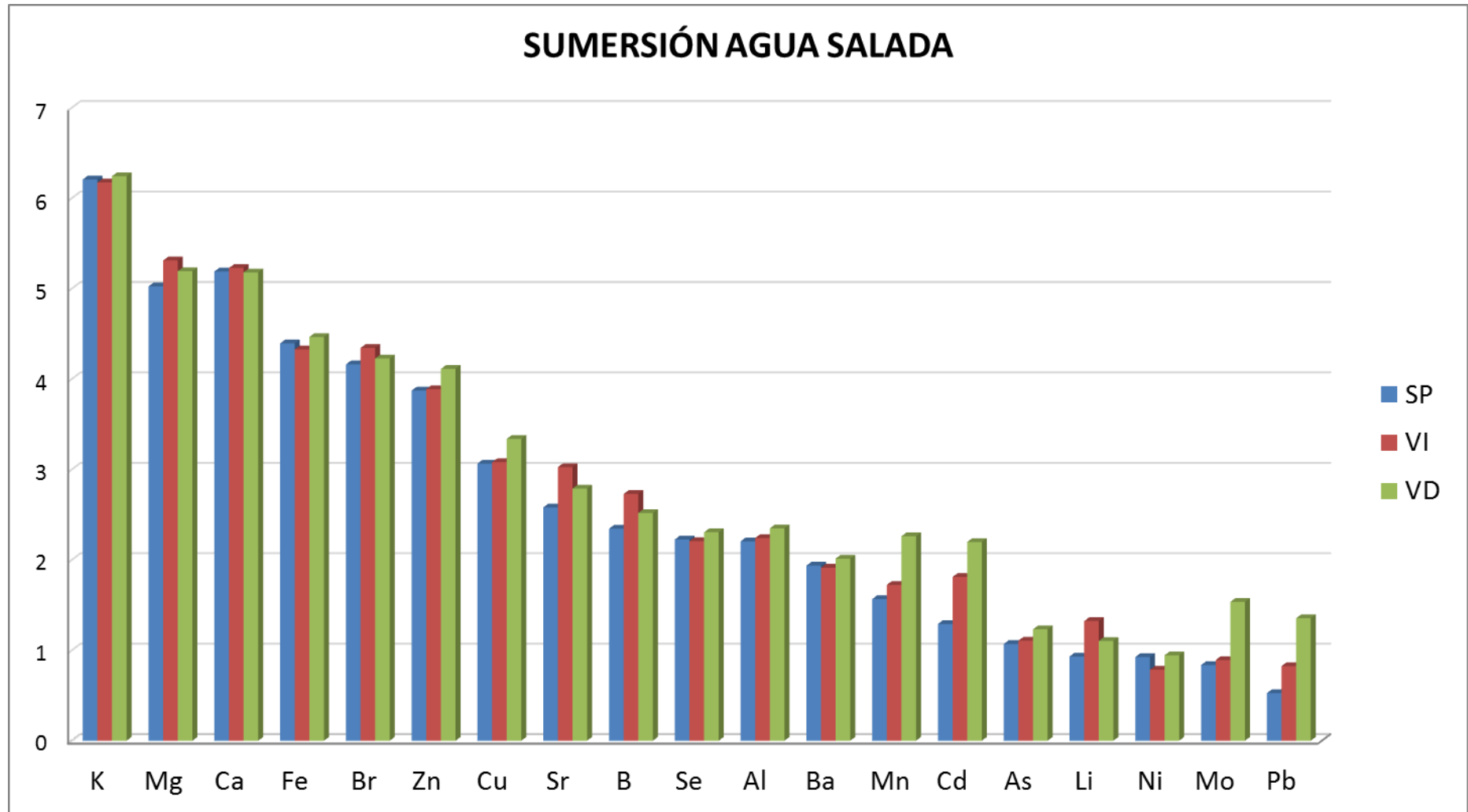
**Figura 30.** Perfil elemental, elementos mayoritarios ( $\text{mg/L}$ ) en sangre del ventrículo izquierdo del grupo SAS.



**Figura 31.** Perfil elemental, elementos minoritarios ( $\mu\text{g/L}$ ) en sangre del ventrículo derecho del grupo SAS.



**Figura 32.** Perfil elemental, elementos mayoritarios ( $\text{mg/L}$ ) en sangre del ventrículo derecho del grupo SAS.



*Figura 27a.* Concentraciones de todos los elementos en la sangre de las tres localizaciones de los casos de sumersión en agua salada en escala logarítmica.

La **Tabla 27** muestra los valores (media, desviación estándar, mediana, mínimo, máximo y rango) obtenidos para los marcadores bioquímicos en la sangre periférica (P), sangre del ventrículo izquierdo (VI) y sangre del ventrículo derecho (VD) en el grupo diagnóstico sumersión en agua dulce (SAD), observándose que los elementos que presentan mayores concentraciones en la sangre de las tres localizaciones son K, Ca, Mg, Fe, Br, Zn y Cu en niveles de mg/L, el resto de los elementos presentan concentraciones en niveles de  $\mu\text{g/L}$ , entre los que están Se, B y Sr con concentraciones en torno a 100  $\mu\text{g/L}$  en la sangre periférica y en la sangre del ventrículo izquierdo, destacando en la sangre del ventrículo derecho Cd, Se y Mn con concentraciones en torno a 200  $\mu\text{g/L}$ . El resto de elementos presentan bajas concentraciones.

La **Figura 33** muestra el perfil elemental de los elementos minoritarios ( $\mu\text{g/L}$ ) en la sangre periférica del grupo diagnóstico de SAD. La **Figura 34** muestra el perfil elemental de los elementos mayoritarios (mg/L) en la sangre periférica del grupo diagnóstico SAD. De la misma manera, las **Figuras 35** y **36** para la sangre del ventrículo izquierdo, y las **Figuras 37** y **38** para la sangre del ventrículo derecho. Se observa que los perfiles de los elementos minoritarios muestran variaciones en las tres localizaciones sanguíneas siendo los elementos que presentan mayor concentración Se, B y Sr en sangre periférica y en sangre del ventrículo izquierdo, mientras que Cd, Se y Mn son los elementos más concentrados en la sangre del ventrículo derecho, seguidos de B, Sr, Al y Mo en esta última localización. En cuanto a los elementos mayoritarios, los perfiles son similares en las tres localizaciones sanguíneas, y son de mayor a menor concentración K, Ca, Mg, Fe, Br, Zn y Cu.

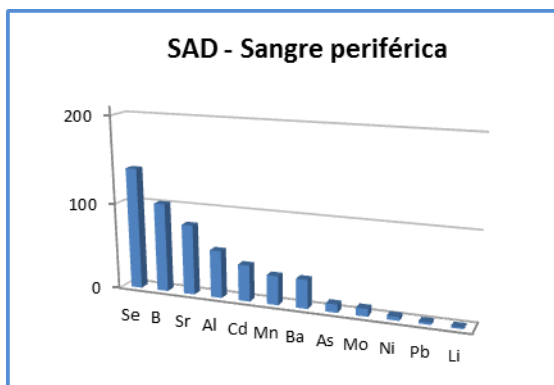
La **Figura 33a** muestra las concentraciones de todos los elementos estudiados en la sangre de las tres localizaciones del grupo diagnóstico SAD en escala logarítmica. Observamos en esta figura que los elementos que muestran ligeramente mayor concentración en la sangre del ventrículo izquierdo frente a las otras dos localizaciones sanguíneas son Ca, Fe, Sr, B y Ba, mientras que el resto de elementos estudiados presentan una mayor concentración en la sangre del ventrículo derecho, salvo el Br que muestra una concentración algo mayor en sangre periférica.



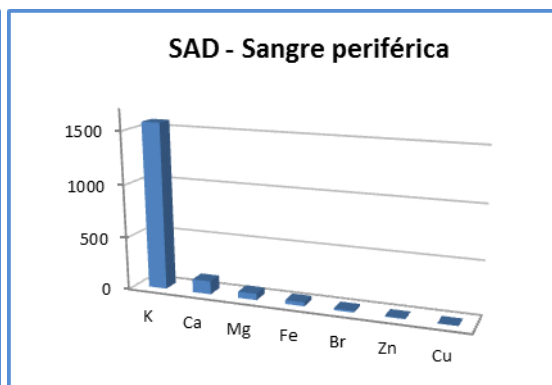
Resultados

Tabla 27. Sumersión en agua dulce. Sangre periférica(N=14), sangre ventrículo izquierdo (N=13), sangre ventrículo derecho(N=13)							
		Media	Mediana	Desviación estándar	Mínimo	Máximo	Rango
Li (µg/L)	P	1,81	0,75	2,16	0,00	5,97	5,97
	VI	2,18	2,14	2,50	0,00	7,97	7,97
	VD	1,81	0,00	2,21	0,00	5,60	5,60
B (µg/L)	P	102,05	57,39	109,77	0,00	328,51	328,51
	VI	114,15	77,55	134,63	0,00	437,46	437,46
	VD	99,61	69,69	110,21	0,00	375,08	375,08
Mn (µg/L)	P	33,22	20,83	45,51	0,00	146,93	146,93
	VI	47,40	34,52	51,66	0,00	167,59	167,59
	VD	175,49	129,12	138,14	5,34	417,30	411,96
Ni (µg/L)	P	4,35	1,64	5,57	0,00	15,52	15,52
	VI	5,30	0,68	11,02	0,00	40,49	40,49
	VD	4,64	0,43	6,40	0,00	20,42	20,42
Cu (µg/L)	P	1264,8	1212,1	371,74	700,94	1948,5	1247,5
	VI	1165,9	1042,0	302,61	820,55	1620,5	799,98
	VD	2082,2	1905,9	793,89	964,17	3326,7	2362,5
Zn (µg/L)	P	5633,3	4473,9	3719,1	1106,5	13284,1	12177,6
	VI	4786,5	3532,8	3412,8	1257,6	14686,4	13428,8
	VD	12662,0	8943,6	9834,1	2046,7	34204,5	32157,8
As (µg/L)	P	9,43	5,91	9,60	0,00	34,09	34,09
	VI	8,28	6,48	8,48	0,00	28,23	28,23
	VD	13,67	8,46	14,90	0,00	47,63	47,63
Se (µg/L)	P	139,86	128,82	48,59	65,36	229,46	164,10
	VI	136,16	145,68	58,47	10,56	199,64	189,08
	VD	177,66	190,68	63,82	85,56	286,78	201,22
Sr (µg/L)	P	80,61	81,77	27,30	40,65	116,47	75,82
	VI	108,00	82,21	75,72	32,54	308,19	275,65
	VD	79,74	76,86	34,48	31,66	144,37	112,71
Mo (µg/L)	P	8,88	2,80	13,21	0,00	45,32	45,32
	VI	7,71	2,04	11,90	0,00	36,86	36,86
	VD	74,92	35,27	81,26	0,00	257,27	257,27
Cd (µg/L)	P	41,63	9,75	75,97	0,00	263,58	263,58
	VI	45,43	7,99	80,86	0,00	285,14	285,14
	VD	207,56	89,28	326,28	0,00	1196,7	1196,7
Ba (µg/l)	P	33,10	30,83	17,48	6,10	70,35	64,25
	VI	50,74	36,77	52,15	8,23	208,93	200,70
	VD	36,75	33,55	20,57	6,37	76,18	69,81
Pb (µg/L)	P	2,52	0,00	4,95	0,00	16,93	16,93
	VI	3,31	0,00	7,44	0,00	27,26	27,26
	VD	9,76	7,40	11,07	0,00	34,42	34,42
Al (µg/L)	P	54,59	57,57	43,15	0,00	135,87	135,87
	VI	46,87	53,44	33,81	0,00	113,29	113,29
	VD	76,47	75,15	62,47	0,00	176,86	176,86
Fe (µg/L)	P	36790,9	14714,2	69005,2	3824,8	262280,0	258455,1
	VI	41867,3	11054,9	81323,7	4418,7	293080,0	288661,2
	VD	39954,4	22316,6	54802,6	3745,7	206480,0	202734,2
Br (mg/L)	P	17,03	12,83	11,76	4,77	48,99	44,22
	VI	11,42	11,37	4,34	4,23	18,89	14,66
	VD	14,75	13,62	9,13	5,43	37,75	32,32
Mg (mg/L)	P	61,08	58,49	15,46	36,95	91,65	54,70
	VI	56,96	56,84	12,86	36,74	79,80	43,06
	VD	70,13	71,23	14,35	47,89	95,94	48,05
K (mg/L)	P	1573,4	1565,4	530,88	639,03	2458,5	1819,5
	VI	1410,8	1248,2	446,86	705,27	2245,8	1540,6
	VD	1682,9	1759,5	405,98	1145,7	2617,7	1472,0
Ca (mg/L)	P	125,18	125,49	26,96	69,91	170,00	100,09
	VI	129,19	124,71	33,00	86,31	228,23	141,92
	VD	104,90	100,70	26,60	50,74	158,45	107,71

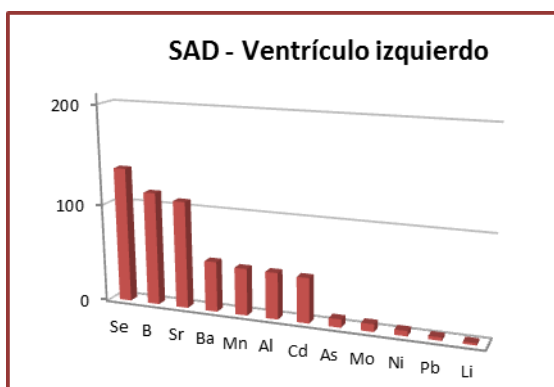
P: Sangre periférica; VI: Sangre ventrículo izquierdo; VD: Sangre ventrículo derecho



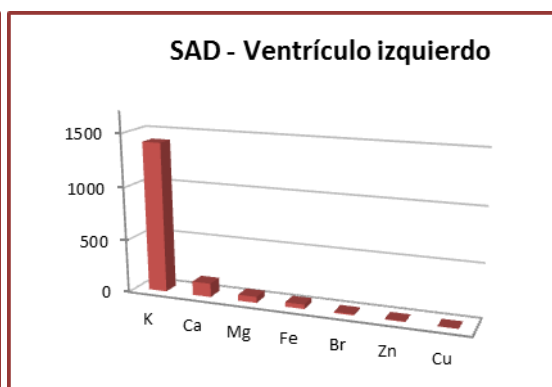
**Figura 33.** Perfil elemental, elementos minoritarios ( $\mu\text{g/L}$ ) en sangre periférica del grupo SAD.



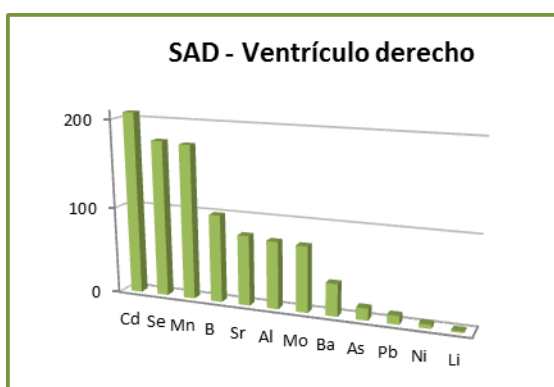
**Figura 34.** Perfil elemental, elementos mayoritarios ( $\text{mg/L}$ ) en sangre periférica del grupo SAD.



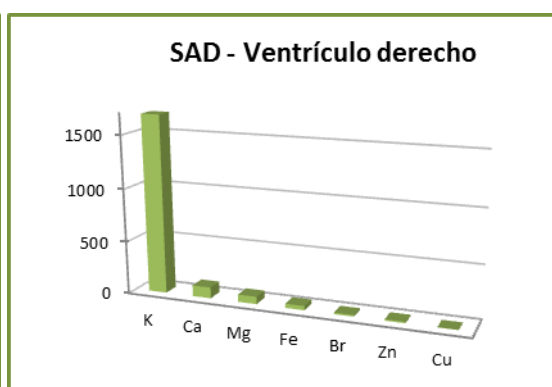
**Figura 35.** Perfil elemental, elementos minoritarios ( $\mu\text{g/L}$ ) en sangre del ventrículo izquierdo del grupo SAD.



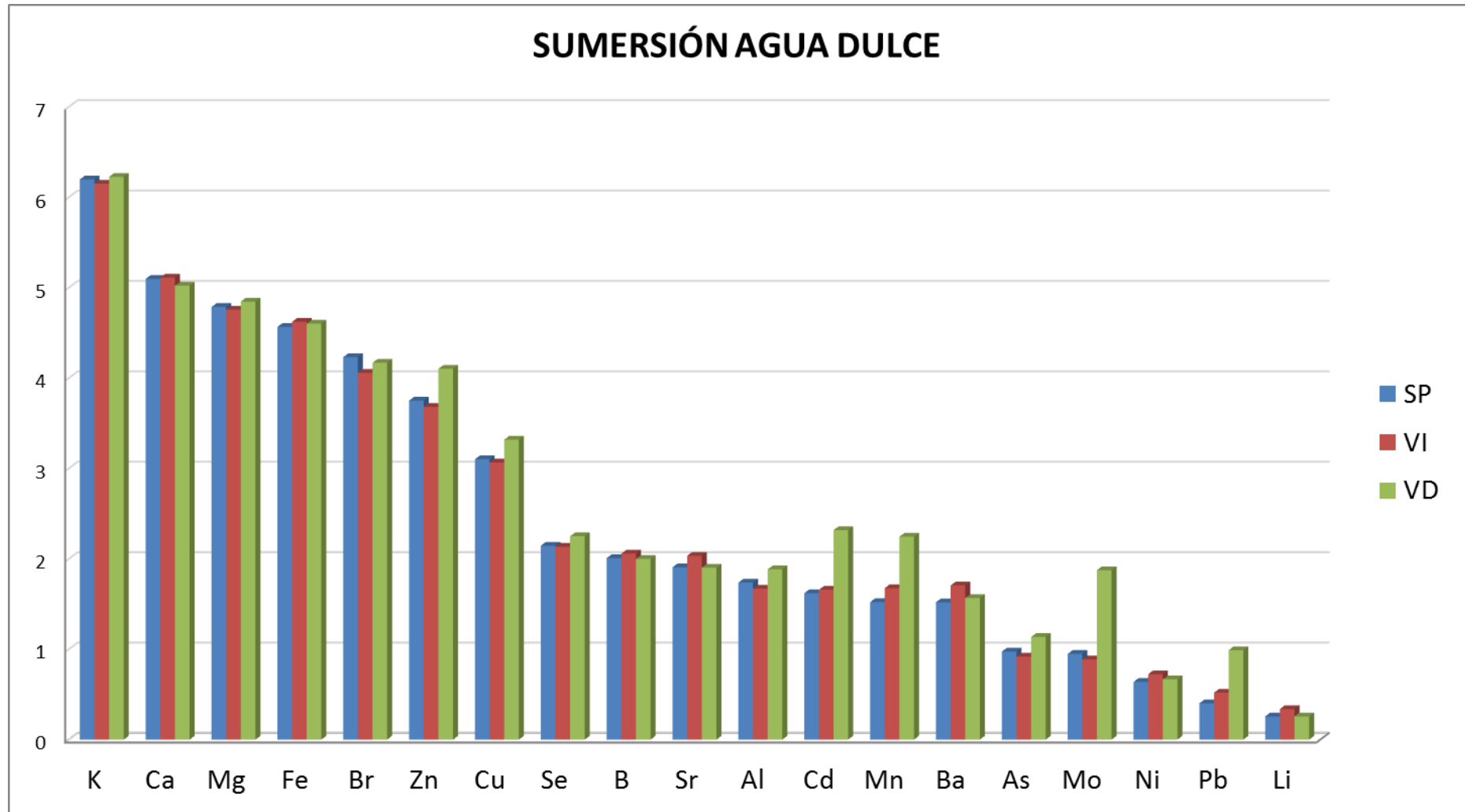
**Figura 36.** Perfil elemental, elementos mayoritarios ( $\text{mg/L}$ ) en sangre del ventrículo izquierdo del grupo SAD.



**Figura 37.** Perfil elemental, elementos minoritarios ( $\mu\text{g/L}$ ) en sangre del ventrículo derecho del grupo SAD.



**Figura 38.** Perfil elemental, elementos mayoritarios ( $\text{mg/L}$ ) en sangre del ventrículo derecho del grupo SAD.



**Figura 33a.** Concentraciones de todos los elementos químicos en la sangre de las tres localizaciones de los casos de sumersión en agua dulce, en escala logarítmica.

La **Tabla 28** muestra los valores (media, desviación estándar, mediana, mínimo, máximo y rango) obtenidos para los marcadores bioquímicos en la sangre periférica (SP), sangre del ventrículo izquierdo (VI) y sangre del ventrículo derecho (VD) en el grupo diagnóstico no sumersión (NS). Se observa que los elementos que presentan mayores concentraciones en la sangre de las tres localizaciones son por este orden K, Ca, Mg, Fe, Br, Zn y Cu en niveles de mg/L, presentando el Fe mayor concentración que el Br en la sangre del ventrículo derecho. El resto de los elementos presentan concentraciones en niveles de  $\mu\text{g/L}$ , entre los que se encuentran Se y B con concentraciones en torno a 100  $\mu\text{g/L}$  en sangre periférica y en sangre del ventrículo izquierdo, y Cd, Se, B y Mn en sangre del ventrículo derecho con concentraciones entre 100  $\mu\text{g/L}$  y 170  $\mu\text{g/L}$ . El resto de elementos presentan bajas concentraciones.

La **Figura 39** muestra el perfil elemental de los elementos minoritarios ( $\mu\text{g/L}$ ) en la sangre periférica del grupo diagnóstico de NS. La **Figura 40** muestra el perfil elemental de los elementos mayoritarios (mg/L) en la sangre periférica del grupo diagnóstico NS. De la misma manera, las **Figuras 41 y 42** para la sangre del ventrículo izquierdo, y las **Figuras 43 y 44** para la sangre del ventrículo derecho. Se observa que los perfiles de los elementos minoritarios muestran variaciones en las tres localizaciones sanguíneas siendo los elementos que presentan mayor concentración Se y B en sangre periférica y en sangre del ventrículo izquierdo, mientras que Cd, Se, B y Mn son los elementos más concentrados en la sangre del ventrículo derecho. Los perfiles de los elementos mayoritarios son similares en las tres localizaciones sanguíneas, los elementos de mayor a menor concentración son K, Ca, Mg, Br, Fe, Zn y Cu en sangre periférica y en sangre del ventrículo izquierdo, mientras que en la sangre del ventrículo derecho la concentración de Fe es mayor que la de Br.

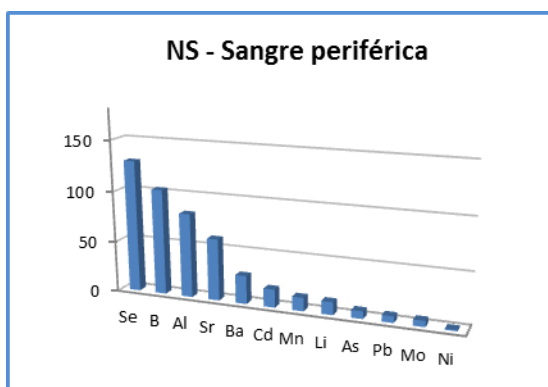
La **Figura 39a** muestra las concentraciones de todos los elementos estudiados en la sangre de las tres localizaciones del grupo diagnóstico NS en escala logarítmica. A diferencia de los otros dos grupos diagnósticos, prácticamente no se observan mayores concentraciones de los elementos estudiados en la sangre del ventrículo izquierdo, salvo ligeramente para Sr y Li. El resto de los elementos analizados muestran mayor concentración en la sangre del ventrículo derecho frente a las otras dos localizaciones sanguíneas, salvo Ca, Al y Ba con concentraciones algo mayores en sangre periférica.

Resultados

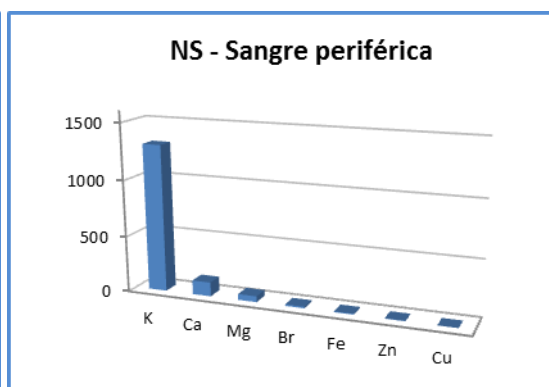
**Tabla 28. No Sumersión. Sangre periférica(N=13), sangre ventrículo izquierdo (N=13), sangre ventrículo derecho(N=13)**

		Media	Mediana	Desviación estándar	Mínimo	Máximo	Rango
Li (µg/L)	P	12,46	0,00	42,28	0,00	153,09	153,09
	VI	13,65	0,00	47,05	0,00	170,19	170,19
	VD	12,86	0,00	43,85	0,00	158,75	158,75
B (µg/L)	P	103,51	65,33	112,88	0,00	404,55	404,55
	VI	104,51	78,41	107,9	0,00	402,14	402,14
	VD	114,85	96,95	105,95	0,00	314,35	314,35
Mn (µg/L)	P	13,24	3,03	25,12	0,00	87,03	87,03
	VI	24,86	16,89	33,07	0,34	125,63	125,29
	VD	101,94	93,85	94,75	0,00	297,82	297,82
Ni (µg/L)	P	1,33	0,00	1,95	0,00	6,02	6,02
	VI	1,84	0,00	4,32	0,00	15,29	15,29
	VD	2,53	0,00	5,46	0,00	15,28	15,28
Cu (µg/L)	P	1095,3	1107,62	326,02	468,18	1741,44	1273,26
	VI	1389,98	1479,17	817,93	445,93	3736,89	3290,96
	VD	2050,67	1703,12	1307,16	594,35	4773,19	4178,84
Zn (µg/L)	P	3337,56	2577,64	2771,77	734,14	10525,28	9791,14
	VI	4314,52	3625,98	3608,8	1192,75	15179,85	13987,11
	VD	8712,88	6176,72	7803,12	1745,58	27759,63	26014,05
As (µg/L)	P	7,38	7,84	7,48	0,00	19,39	19,39
	VI	9,61	7,06	11,95	0,00	36,16	36,16
	VD	12,99	11,13	16,4	0,00	46,94	46,94
Se (µg/L)	P	129,34	107,96	62,03	43,04	231,58	188,54
	VI	141,32	134,08	71,84	36,21	262,03	225,82
	VD	163,4	163,46	84,8	44,05	297,03	252,99
Sr (µg/L)	P	60,51	53,28	13,66	45,44	86,52	41,09
	VI	65,59	56,29	24,72	41,81	120,03	78,22
	VD	61,61	58,08	17,42	40,64	99,10	58,46
Mo (µg/L)	P	5,88	3,1	11,45	0,00	43,35	43,35
	VI	9,19	6,16	11,45	0,93	44,13	43,2
	VD	38,58	45,97	33,36	1,06	107,83	106,77
Cd (µg/L)	P	17,75	6,54	28,25	0,00	100,65	100,65
	VI	64,43	30,46	58,7	0,00	160,49	160,49
	VD	172,71	142,71	171,46	0,00	600,52	600,52
Ba (µg/L)	P	27,69	26,27	30,91	2,64	97,75	95,1
	VI	19,56	21,47	10,5	2,55	32,26	29,71
	VD	22,97	22,62	13,72	4,42	46,5	42,09
Pb (µg/L)	P	6,31	4,76	7,91	0,00	29,76	29,76
	VI	7,98	5,98	7,37	0,00	24,01	24,01
	VD	16,59	10,8	17,67	0,00	55,84	55,84
Al (µg/L)	P	82,39	70,52	74,52	21,66	251,88	230,22
	VI	57,3	52,99	39,37	3,58	117,94	114,36
	VD	80,17	60,15	52,2	33,03	232,37	199,34
Fe (µg/L)	P	7382,12	5522,99	6451,89	950,77	21715,04	20764,28
	VI	7180,4	4670,15	5248,34	0,00	17451,82	17451,82
	VD	19085,29	17293,9	20106,33	0,00	74716,24	74716,24
Br (mg/L)	P	13,51	11,83	9,07	4,97	35,06	30,09
	VI	10,04	8,85	6,03	5,24	28,22	22,98
	VD	14,08	11,7	7,17	6,73	26,14	19,41
Mg (mg/L)	P	52,76	49,57	21,54	32,58	105,21	72,63
	VI	57,69	59,33	22,04	29,44	111,38	81,94
	VD	67,73	69,06	26,21	35,5	111,35	75,85
K (mg/L)	P	1306,33	1174,1	552,61	544,36	2563,71	2019,34
	VI	1267,82	1367,61	356,23	827,89	1758,01	930,12
	VD	1534,59	1668,52	602,88	566,94	2473,59	1906,65
Ca (mg/L)	P	125,58	130,93	35,37	38,08	187,77	149,69
	VI	120,95	118,8	19,07	97,52	161,87	64,36
	VD	105,53	104,53	16,2	87,22	141,48	54,26

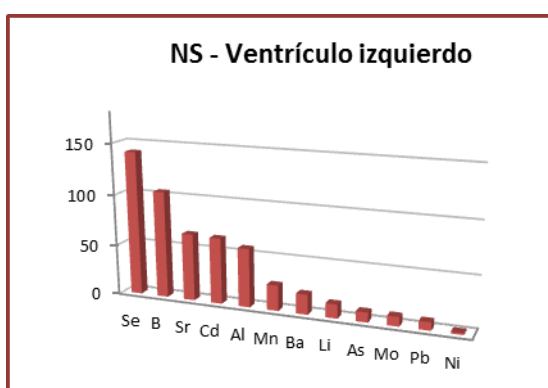
P: Sangre periférica; VI: Sangre ventrículo izquierdo; VD: Sangre ventrículo derecho



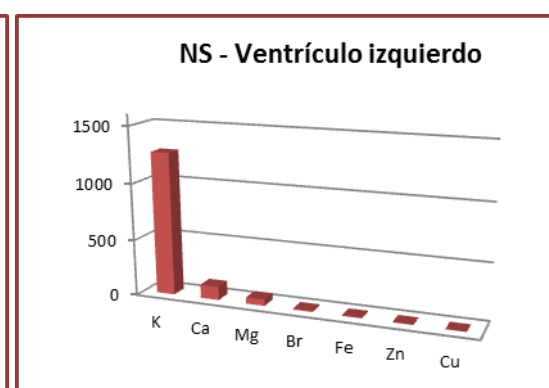
**Figura 39.** Perfil elemental, elementos minoritarios ( $\mu\text{g/L}$ ) en sangre periférica del grupo NS.



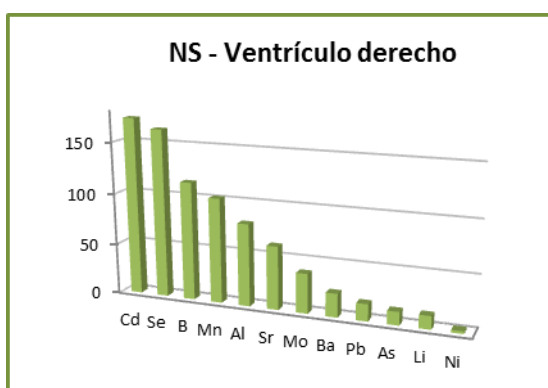
**Figura 40.** Perfil elemental, elementos mayoritarios ( $\text{mg/L}$ ) en sangre periférica del grupo NS.



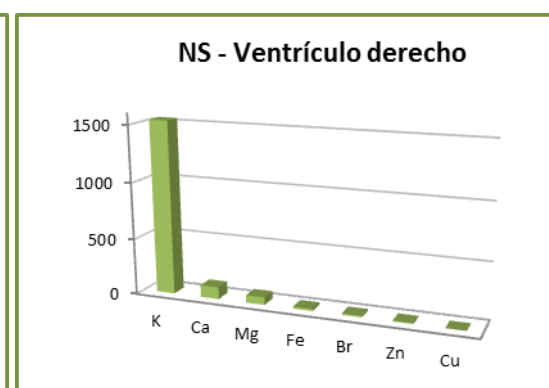
**Figura 41.** Perfil elemental, elementos minoritarios ( $\mu\text{g/L}$ ) en sangre del ventrículo izquierdo del grupo NS.



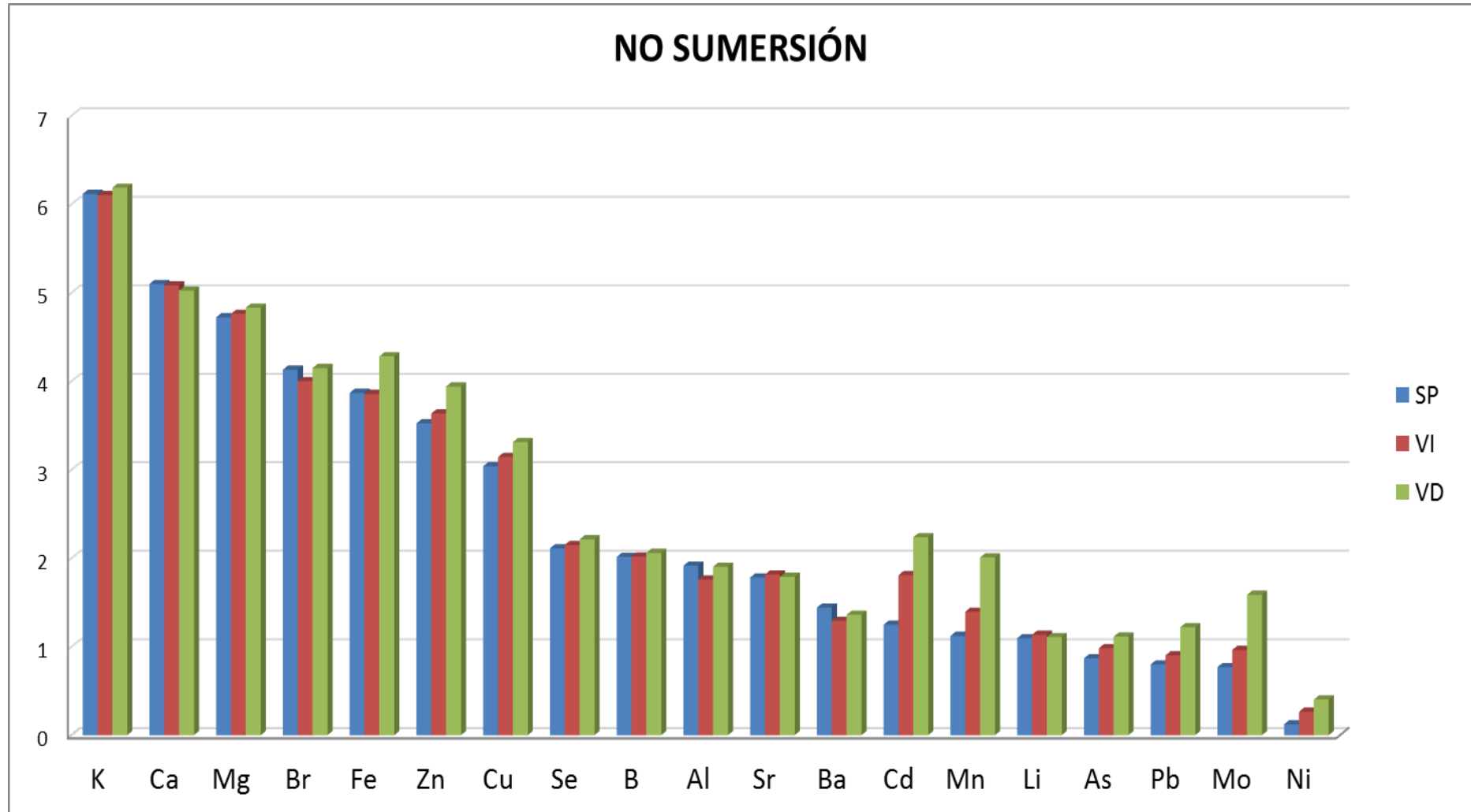
**Figura 42.** Perfil elemental, elementos mayoritarios ( $\text{mg/L}$ ) en sangre del ventrículo izquierdo del grupo NS.



**Figura 43.** Perfil elemental, elementos minoritarios ( $\mu\text{g/L}$ ) en sangre del ventrículo derecho del grupo NS.



**Figura 44.** Perfil elemental, elementos mayoritarios ( $\text{mg/L}$ ) en sangre del ventrículo derecho del grupo NS.



**Figura 39a.** Concentraciones de todos los elementos químicos en la sangre de las tres localizaciones del grupo diagnóstico no sumersión, en escala logarítmica.

Si analizamos los tres grupos diagnósticos conjuntamente se observa que los valores medios más altos de B, Sr, Mg y Ca en sangre se obtuvieron en los casos de sumersión en agua de mar en comparación con otras causas de muerte.

Bario y aluminio también mostraron concentraciones medias más altas en los casos de sumersión en agua salada debido a dos casos con alta concentración, posiblemente por contaminación.

Las muestras de sangre en los casos de sumersión en agua de mar contienen mayores concentraciones de Li que las de sumersión en agua dulce y no sumersión, sólo en un caso de no sumersión se obtuvieron concentraciones más altas y tras la eliminación de esa muestra, la concentración media de Li en los casos de no sumersión fue inferior a 1 ppb.

La media de la concentración de Fe es significativamente mayor en los casos de sumersión en agua dulce en comparación con otras causas.

Manganeso, cadmio y molibdeno muestran valores bajos en los tres tipos de muerte y la concentración de Zn está entre 4 mg/L y 14 mg/L en todas las causas de muerte estudiadas, pero cabe destacar que las concentraciones de estos cuatro elementos son más altas en sangre del ventrículo derecho que en sangre del ventrículo izquierdo y que en sangre periférica para los cuatro elementos.

Los niveles de Br, Cu, Se y K son similares en todos los casos y Ni, As y Pb muestran concentraciones muy bajas.

Observando los gráficos de elementos minoritarios vemos que en el grupo de SAS (*Figuras 27, 29 y 31*) los elementos que presentan una mayor concentración en este grupo diagnóstico son primero el Sr seguido del B en las tres localizaciones sanguíneas estudiadas, destacando los mayores valores obtenidos en la sangre del ventrículo izquierdo, seguidos de la sangre del ventrículo derecho y finalmente la sangre periférica. En cuanto a los elementos mayoritarios (*Figuras 28, 30 y 32*), el perfil es similar en las tres localizaciones sanguíneas para este grupo diagnóstico, SAS, la mayor concentración la presenta K en la sangre del ventrículo derecho, le siguen Mg y Ca y por último Br, Fe, Zn y Cu, mostrando



Mg y Br mayor concentración en la sangre del ventrículo izquierdo, y Zn y Cu en la sangre del ventrículo derecho.

Para los grupos SAD y NS el perfil de los elementos minoritarios (*Figuras 33, 35 y 37* para SAD y *Figuras 39, 41 y 43* para NS) es diferente al del grupo SAS ya que presentan concentraciones más bajas de los elementos. El Sr ya no es el elemento que presenta mayor concentración y también hay que destacar una mayor concentración de casi todos los elementos de este grupo en la sangre del ventrículo derecho. El perfil de los elementos mayoritarios en los grupos SAD (*Figuras 34, 36 y 38*) y NS (*Figuras 40, 42 y 44*), es similar al del grupo SAS en las tres localizaciones sanguíneas, siendo el K el elemento que presenta una mayor concentración en los tres casos, destacando el nivel más alto en las muestras de sangre del ventrículo derecho.

#### **4.4. Análisis de las diferencias en las concentraciones de los elementos químicos entre los casos de muerte por sumersión en agua salada, sumersión en agua dulce y no sumersión**

Para evaluar la influencia de la causa de la muerte en los valores de los elementos químicos estudiados, aplicamos el Test de Kruskal-Wallis, análisis estadístico de comparación de medias para más de dos muestras independientes (*Tabla 29*) y el Test de Mann-Whitney para dos muestras independientes (*Tabla 30*).

**Tabla 29. Test Kruskal Wallis. Diferencias estadísticas en sangre en sumersión en agua salada, sumersión en agua dulce y no sumersión. (*P*, probabilidad)**

	Sangre periférica	Sangre ventrículo izquierdo	Sangre ventrículo derecho
	SAS-SAD-NS	SAS-SAD-NS	SAS-SAD-NS
Li	,000	,000	,002
B	,026	,000	,002
Mn	,155	,406	,273
Ni	,556	,472	,534
Cu	,573	,721	,426
Zn	,035	,941	,174
As	,168	,254	,732
Se	,788	,641	,433
Sr	,000	,000	,000
Mo	,309	,018	,073
Cd	,307	,258	,449
Ba	,259	,021	,206
Pb	,123	,042	,588
Al	,028	,019	,042
Fe	,139	,027	,399
Br	,361	,023	,723
Mg	,003	,000	,003
K	,388	,330	,799
Ca	,002	,003	,000

SAS: Sumersión en agua salada; SAD: Sumersión en agua dulce; NS: No sumersión

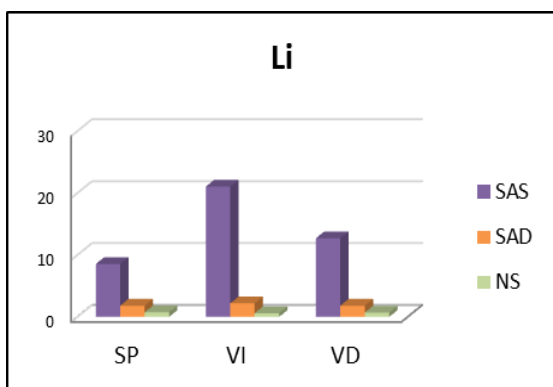
**Tabla 30. Test de Mann-Whitney. Diferencias estadísticas en sangre en sumersión en agua salada, sumersión en agua dulce y no sumersión. (*P*, probabilidad)**

	Sangre periférica			Sangre ventrículo izquierdo			Sangre ventrículo derecho		
	SAS-SAD	SAS-NS	SAD-NS	SAS-SAD	SAS-NS	SAD-NS	SAS-SAD	SAS-NS	SAD-NS
Li	,001	,031	,286	,001	,001	,180	,004	,003	,476
B	,024	,045	,942	,001	,000	,980	,001	,006	,626
Mn	,808	,046	,088	,939	,228	,270	,144	,817	,191
Ni	,522	,842	,261	,850	,277	,302	,891	,413	,266
Cu	,884	,522	,264	,701	,739	,397	,158	,590	,590
Zn	,015	,939	,047	,817	,898	,739	,077	,489	,209
As	,045	,316	,590	,074	,316	,897	,396	,755	,736
Se	,961	,663	,467	,343	,522	,898	,158	,042	,663
Sr	,000	,000	,065	,000	,000	,096	,000	,000	,174
Mo	,252	,027	,846	,958	,006	,157	,029	,130	,397
Cd	,182	,187	,845	,959	,142	,173	,538	,166	,720
Ba	,207	,739	,133	,061	,017	,005	,555	,397	,054
Pb	,261	,275	,051	,045	,718	,020	,589	,681	,288
Al	,117	,005	,437	,007	,047	,590	,141	,005	,980
Fe	,357	,270	,052	,001	,022	,020	,343	,739	,191
Br	,133	,939	,369	,048	,017	,158	,555	,427	,939
Mg	,012	,004	,073	,000	,000	,980	,003	,004	,457
K	,438	,427	,207	,590	,130	,397	,663	,939	,489
Ca	,002	,003	,771	,008	,002	,626	,001	,000	,939

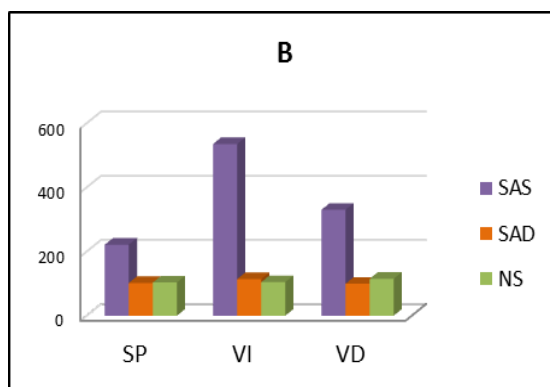
Se observaron diferencias estadísticamente significativas para Li, B, Sr, Al, Mg y Ca entre los tres grupos diagnósticos (SAS-SAD-NS) en la sangre analizada de las tres localizaciones. Además, en la sangre del ventrículo izquierdo también se observaron diferencias entre los tres grupos diagnósticos para Br, Ba y Fe. Cuando los grupos se compararon de dos en dos, hallamos diferencias estadísticamente significativas en sangre periférica y ambos ventrículos, cuando se relacionaron los casos de SAS con SAD y NS para Li, B, Sr, Mg y Ca (**Figuras 45 a 49**). Por lo tanto, los niveles de Li, B, Sr, Mg y Ca en sangre periférica y en sangre de los dos ventrículos, nos permiten diferenciar los casos de sumersión en agua salada de sumersión en agua dulce, así como de otras causas de muerte.

El bromo (**Figura 50**) mostró diferencias estadísticamente significativas en la sangre del ventrículo izquierdo en casos de sumersión en agua de mar en comparación con los casos de sumersión en agua dulce y otras causas de muerte. En la figura también se observa mayor concentración de Br en la sangre del ventrículo izquierdo en los casos de sumersión en agua de mar.

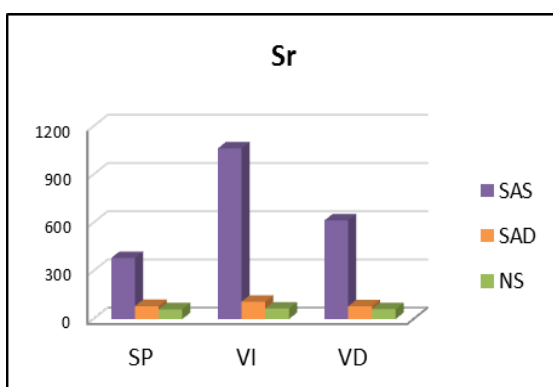
Se observaron diferencias estadísticamente significativas para Fe (**Figura 51**) en la sangre del ventrículo izquierdo en todos los grupos diagnósticos, además de mayores niveles en los casos de SAD. Para Zn se encontraron diferencias en SP en SAD comparado con SAS y NS y para Ba en VI entre NS y los dos grupos de sumersión. Para el resto de marcadores químicos no encontramos diferencias significativas.



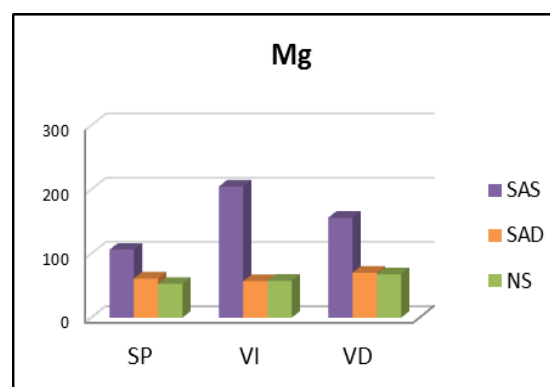
**Figura 45.** Valores medios de las concentraciones de Li en las tres localizaciones sanguíneas de los tres grupos diagnósticos, entre los que existen diferencias estadísticamente significativas.



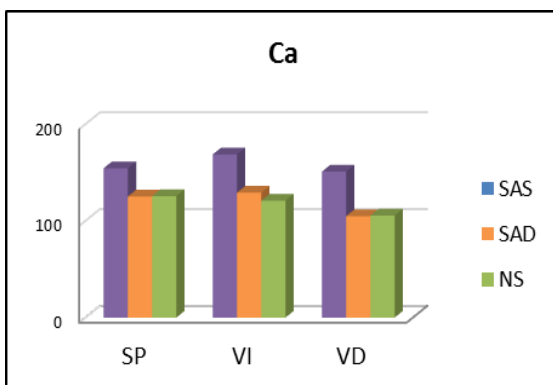
**Figura 46.** Valores medios de las concentraciones de B en las tres localizaciones sanguíneas de los tres grupos diagnósticos, entre los que existen diferencias estadísticamente significativas.



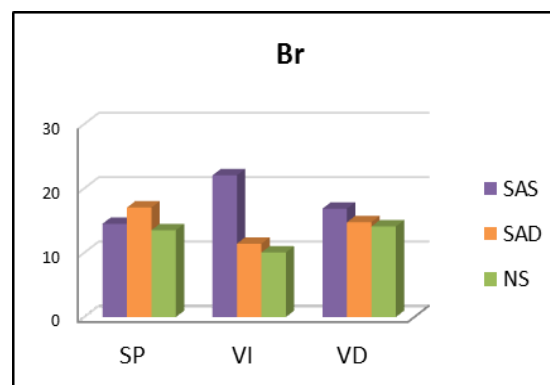
**Figura 47.** Valores medios de las concentraciones de Sr en las tres localizaciones sanguíneas de los tres grupos diagnósticos entre los que existen diferencias estadísticamente significativas.



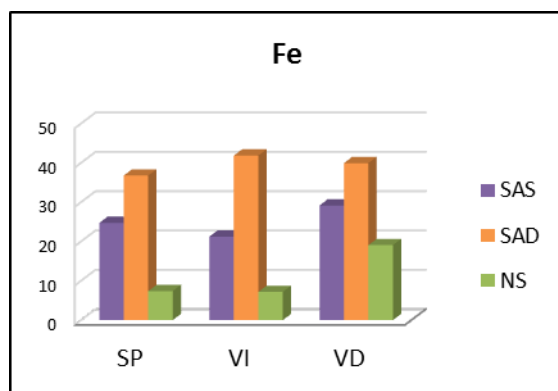
**Figura 48.** Valores medios de las concentraciones de Mg en las tres localizaciones sanguíneas de los tres grupos diagnósticos, entre los que existen diferencias estadísticamente significativas.



**Figura 49.** Valores medios de las concentraciones de Ca en las tres localizaciones sanguíneas de los tres grupos diagnósticos, entre los que existen diferencias estadísticamente significativas.



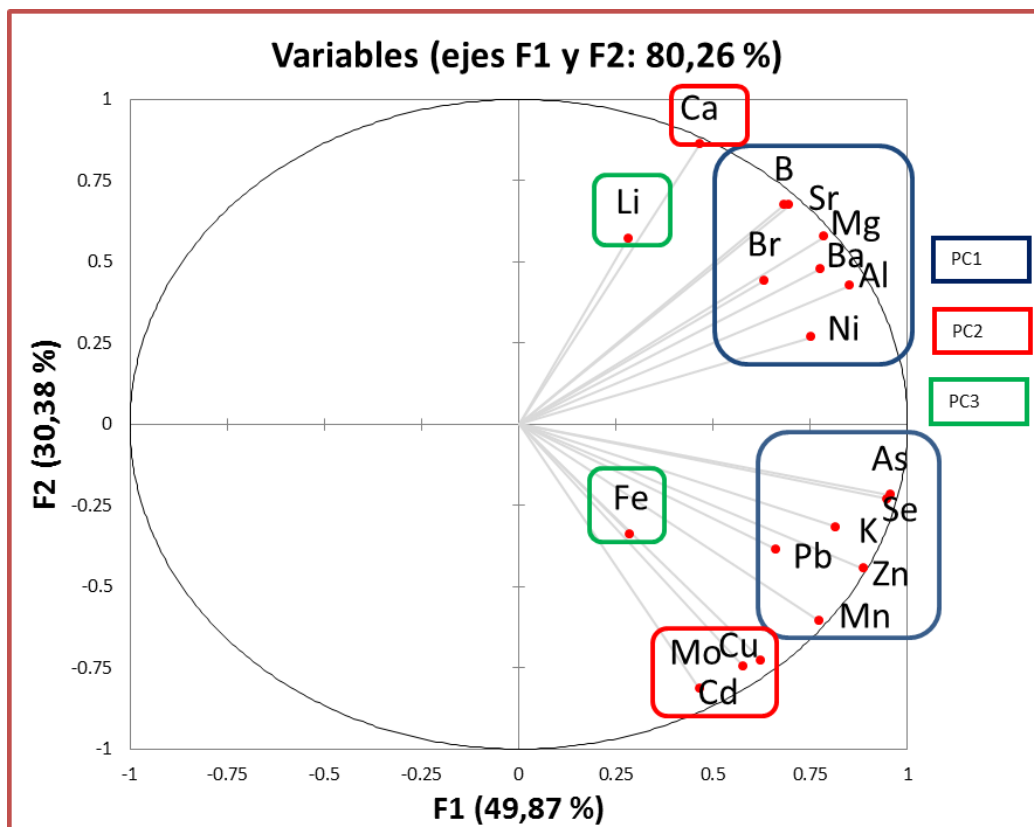
**Figura 50.** Valores medios de las concentraciones de Br en las tres localizaciones sanguíneas de los tres grupos diagnósticos. Existen diferencias estadísticamente significativas en ventrículo izquierdo.



**Figura 51.** Valores medios de las concentraciones de Fe en las tres localizaciones sanguíneas de los tres grupos diagnósticos. Existen diferencias estadísticamente significativas en ventrículo izquierdo.

#### 4.5. Análisis de agrupaciones y relaciones en los tres grupos diagnósticos y todos los elementos químicos analizados

Se estudiaron los resultados del análisis de muestras de los tres grupos diagnósticos (SAS-SAD-NS) utilizando herramientas estadísticas, con el fin de verificar la presencia de agrupaciones y relaciones entre las muestras y las variables. Las medias de las concentraciones de los elementos estudiados se utilizaron como variables para realizar un análisis exploratorio con el Análisis de Componentes Principales (PCA). Los tres primeros componentes principales retuvieron el 92,1% de la variabilidad del sistema (PC1:49,9%; PC2: 30,4%; PC3: 11,9%). Se obtuvo un círculo de correlación (**Figura 52**) para estudiar las relaciones entre las variables analizadas, en este círculo se observa que el eje horizontal está unido a Ni, Al, Ba, As Se, K, Zn, Pb, Mn, Sr, Br, B y Mg y el eje vertical está unido con Ca, Cu, Mo y Cd. Litio y hierro están unidos con PC3.

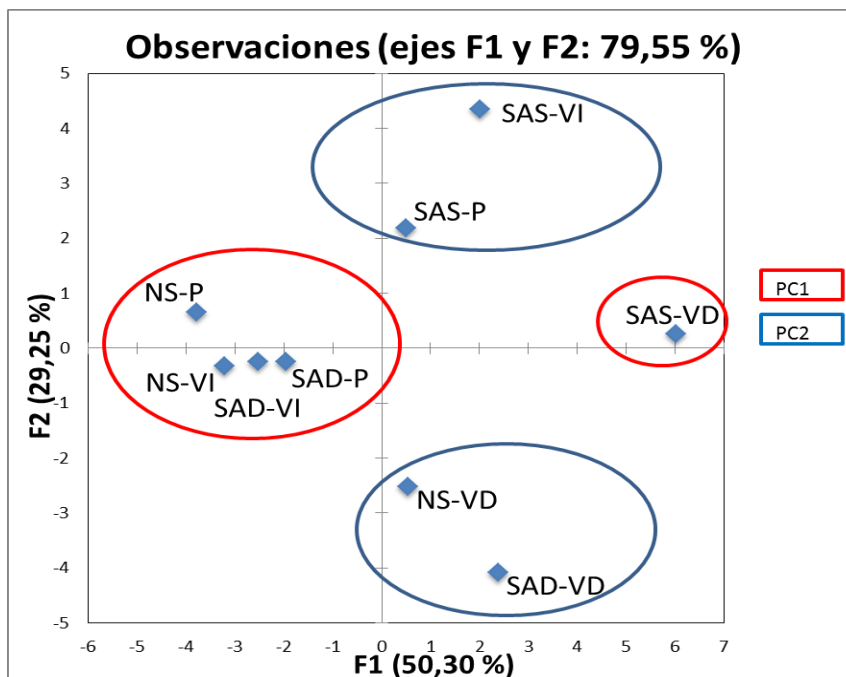


*Figura 52.* Círculo de correlación F1/F2. Relaciones entre variables.

La *Figura 53* muestra el gráfico de puntuaciones de PC1/PC2 donde se puede observar la tendencia de agrupación entre las muestras de sangre de ventrículo izquierdo, ventrículo derecho y sangre periférica en los tres grupos diagnósticos. La observación del gráfico nos permite ver como las muestras de sangre de las tres localizaciones del grupo SAS se encuentran agrupadas en el cuadrante superior derecho y separadas del resto de muestras de sangre, lo cual ya nos indica que tienen características diferentes en cuanto a su composición elemental con respecto a las muestras de los otros dos grupos diagnósticos. Por otro lado, las muestras de sangre del ventrículo derecho de los grupos SAD y NS se agrupan separadas del resto de muestras en el cuadrante inferior derecho, lo que nos da idea de su similitud, y el resto de muestras de sangre analizadas se agrupan en los cuadrantes izquierdos.

El eje horizontal está vinculado a sangre de ventrículo derecho en casos de sumersión en agua de mar (SAS-VD) y sangre del ventrículo izquierdo y sangre periférica en casos de sumersión en agua dulce (SAD-SP y SAD-VI) y en casos de no sumersión (NS-SP y NS-

VI). El eje vertical está unido a sangre periférica y sangre del ventrículo izquierdo en casos de sumersión en agua de mar (SAS-SP y SAS-VI) y con sangre de ventrículo derecho en casos de sumersión en agua dulce y no sumersión (SAD-VD y NS-VD).



**Figura 53.** Gráfico de puntuaciones PC1/PC2. Agrupaciones entre muestras de sangre de las tres localizaciones.

La observación del círculo de correlación F1/F2 (*Figura 52*) nos permite ver como los elementos se agrupan en dos grandes grupos, uno que se sitúa en el cuadrante superior derecho, en el que se encuentran los elementos que en términos generales presentan mayores concentraciones en las muestras de sangre de las tres localizaciones del grupo de SAS (Ni, Al, Ba, Br, Mg, Sr, B, Ca, Li). Y el otro grupo de elementos situado en el cuadrante inferior derecho que engloba los elementos que presentan mayores concentraciones en la sangre del ventrículo derecho en los grupos diagnósticos SAD y NS (As, Se, K, Zn, Mn, Pb, Mo, Cu, Cd, Fe).

Todos los elementos agrupados en PC1 presentan la concentración más alta en muestras de SAS-VD, excepto Mg, B, Br y Sr con los valores más altos en SAS-VI, debido a su proximidad al eje vertical, donde están las muestras de SAS-VI con valores máximos. Los elementos agrupados en PC1 con valores negativos de F2 (Mn, Cu, Zn, As, Se, Pb, K),

presentan la segunda concentración más alta en las muestras SAD-VD seguidas por las muestras NS-VD. Por otro lado, los elementos agrupados en PC1 con valores positivos de F2 (Ni, Ba, Al, Mg, Br, B y Sr) presentan mayor concentración en muestras de SAS en todas las localizaciones.

Los elementos agrupados en PC2 con valores positivos de F2 (Ca) presentan la concentración más alta en muestras de SAS-VI seguidas por muestras de SAS-VD y SAS-SP, mientras que aquellas con valores negativos de F2 (Mo y Cd) tienen la concentración más alta en muestras SAD-VD, seguido de muestras NS-VD y muestras SAS-VD. El Cu, aunque está agrupado en PC2 se encuentra próximo a los elementos del grupo PC1, por ello aunque las concentraciones de Cu en sangre del ventrículo derecho son similares en los tres grupos diagnósticos la concentración más alta la presentan las muestras de SAS-VD, seguidas de SAD-VD y de NS-VD. Los elementos agrupados en PC3 con valor negativo de F2 (Fe), presentan la concentración más alta en muestras de SAD en todas las localizaciones, mientras que Li presenta los valores más bajos en muestras de SAD y los más altos en muestras SAS-VI.

#### **4.6. Análisis de concentraciones y diferencias de los elementos químicos en el medio de sumersión y de correlación entre los elementos químicos en sangre y en el medio de sumersión.**

La **tabla 31** muestra los valores (media, desviación estándar, mediana, mínimo, máximo y rango) obtenidos para los marcadores bioquímicos en el medio de sumersión, agua salada y agua dulce y las diferencias estadísticamente significativas entre los dos tipos de medios de sumersión.



<b>Tabla 31. Media, mediana, desviación estándar, mínimo, máximo y rango de los marcadores bioquímicos en el medio de sumersión, agua de mar (N=37) y agua dulce (N=16). Diferencias significativas entre AS y AD</b>								
		Media	Mediana	Desviación estándar	Mínimo	Máximo	Rango	P <sup>a</sup>
Li µg/L	AS	153,11	146,05	41,84	64,15	245,02	180,87	,000
	AD	13,36	7,37	15,29	0,00	56,99	56,99	
B µg/L	AS	3423,7	3493,5	989,04	1242,0	5090,8	3848,8	,000
	AD	136,45	103,28	132,89	39,03	602,37	563,35	
Mn µg/L	AS	25,92	0,00	94,44	0,00	549,36	549,36	,000
	AD	178,58	3,73	653,87	0,00	2629,2	2629,2	
Ni µg/L	AS	8,60	0,00	36,61	0,00	221,85	221,85	,007
	AD	16,27	2,38	36,79	0,00	139,32	139,32	
Cu µg/L	AS	5,28	0,00	19,43	0,00	114,94	114,94	,000
	AD	31,40	8,63	68,94	0,00	279,38	279,38	
Zn µg/L	AS	111,71	0,00	397,54	0,00	2117,6	2117,6	,012
	AD	72,75	29,04	134,31	0,00	517,00	517,00	
As µg/L	AS	5,12	3,86	7,72	0,00	44,31	44,31	,341
	AD	23,25	1,07	62,17	0,24	229,21	228,97	
Se µg/L	AS	4,93	5,20	1,64	2,35	8,43	6,08	,007
	AD	3,44	3,58	3,46	0,00	12,54	12,54	
Sr µg/L	AS	7551,4	7589,8	2509,4	2759,2	12510,9	9751,6	,000
	AD	739,13	343,58	1074,1	6,88	3618,0	3611,1	
Mo µg/L	AS	9,70	5,41	8,56	0,00	25,18	25,18	,000
	AD	5,60	0,75	18,13	0,00	73,44	73,44	
Cd µg/L	AS	0,05	0,00	0,31	0,00	1,88	1,88	,176
	AD	0,12	0,00	0,32	0,00	0,97	0,97	
Ba µg/L	AS	25,32	10,46	33,50	1,76	130,30	128,54	,005
	AD	294,51	35,81	1032,6	5,90	4166,1	4160,2	
Pb µg/L	AS	7,70	0,00	17,11	0,00	93,25	93,25	,159
	AD	0,58	0,00	0,97	0,00	3,41	3,41	
Al µg/L	AS	34,30	0,00	150,51	0,00	904,76	904,76	,943
	AD	36,39	0,00	143,58	0,00	574,81	574,81	
Fe µg/L	AS	94,89	1,37	338,94	0,00	1568,2	1568,2	,660
	AD	175,48	0,84	605,09	0,00	2430,3	2430,3	
Br mg/L	AS	66,82	65,56	21,51	21,82	110,44	88,62	,000
	AD	0,70	0,23	1,06	0,05	4,25	4,20	
Mg mg/L	AS	1221,9	1196,8	358,18	460,83	2047,3	1586,5	,000
	AD	24,55	13,84	26,76	0,54	97,15	96,61	
K mg/L	AS	398,42	403,53	116,24	146,30	679,33	533,03	,000
	AD	69,36	6,97	195,76	2,11	788,31	786,20	
Ca mg/L	AS	409,11	429,34	146,75	19,81	677,78	657,97	,000
	AD	85,06	46,75	112,93	5,34	454,71	449,38	

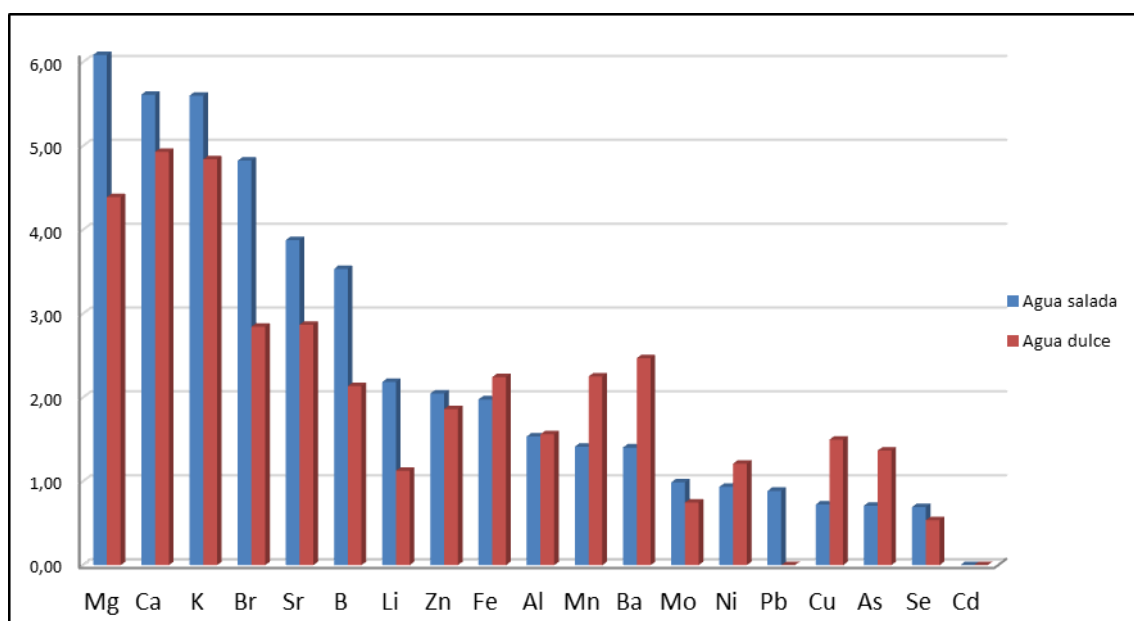
AS: Agua salada; AD: Agua dulce

En la **Tabla 31** y en la **Figura 54** se observa que las concentraciones de Li, B, Sr, Br, Mg, K y Ca son significativamente más altas en agua de mar que en agua dulce.

Observamos una alta concentración de Zn en agua de mar, pero también una alta desviación estándar.

Las concentraciones de Ba, Fe y Mn son mayores en agua dulce en comparación con las de agua de mar. Sólo en una muestra de agua dulce obtuvimos una concentración de Ba más alta debido a probablemente a contaminación (4166 ppb), eliminando esa muestra, la concentración media de Ba en agua dulce es 36,4 ppb.

Se observaron diferencias estadísticamente significativas entre casi todos los elementos estudiados en los dos medios de sumersión, con excepción de Al, Fe, As, Cd y Pb, presentando los tres últimos elementos bajas concentraciones.



**Figura 54.** Valores medios de las concentraciones ( $\mu\text{g/L}$  en escala logarítmica) de los elementos químicos en las aguas de sumersión.

Cuando analizamos los casos de sumersión en conjunto y comparamos con el medio de sumersión, encontramos correlaciones estadísticamente significativas en Li, Sr, Mg, B y Ca entre el medio de sumersión y sangre periférica, sangre del ventrículo izquierdo y sangre del ventrículo derecho (*Tabla 32*).

**Tabla 32. Correlaciones entre diferentes variables en agua de sumersión y sangre de las tres localizaciones en los casos de sumersión.**

	Agua - P		Agua -VI		Agua - VD	
	Coef. Correlación	<i>p</i>	Coef. Correlación	<i>p</i>	Coef. Correlación	<i>p</i>
<b>Li</b>	,587**	,003	,593**	,000	,749**	,000
<b>Sr</b>	,522**	,004	,682**	,000	,674**	,000
<b>Mg</b>	,451*	,016	,648**	,000	,686**	,000
<b>B</b>	,445*	,040	,585**	,009	,458**	,009
<b>Ca</b>	,544**	,000	,661**	,000	,542**	,003

\*\**. La correlación es significativa al nivel 0.01 (bilateral).*

\**. La correlación es significativa al nivel 0.05 (bilateral)*

#### 4.7. Análisis de las diferencias en las concentraciones de los elementos químicos entre los casos de muerte por sumersión en agua salada, agua dulce y no sumersión mediante las curvas ROC y el Análisis discriminante

Estudiamos las curvas ROC expresadas como las concentraciones de todos los marcadores bioquímicos en ambos ventrículos y en sangre periférica, prestando especial atención al área que representa el diagnóstico correcto entre dos individuos fallecidos, uno por sumersión y otro por otras causas, por otro lado, entre un individuo fallecido por sumersión en agua salada y otro fallecido por otras causas, y por último, entre un individuo fallecido por sumersión en agua dulce y otro fallecido por otras causas, y seleccionando los marcadores bioquímicos con áreas bajo la curva mayores de 0,70. La *Figura 55* muestra la curva ROC de los elementos químicos analizados con áreas mayores de 0,70 en los casos de sumersión, la *Figura 56* muestra la curva ROC para los casos de sumersión en agua salada y la *Figura 57* para sumersión en agua dulce. Las *Tablas 33, 34 y 35* muestran el valor de las áreas bajo las curvas ROC, la desviación estándar, la probabilidad, y los límites

superior e inferior del área de cada curva en los casos de sumersión, sumersión en agua salada y sumersión en agua dulce, respectivamente.

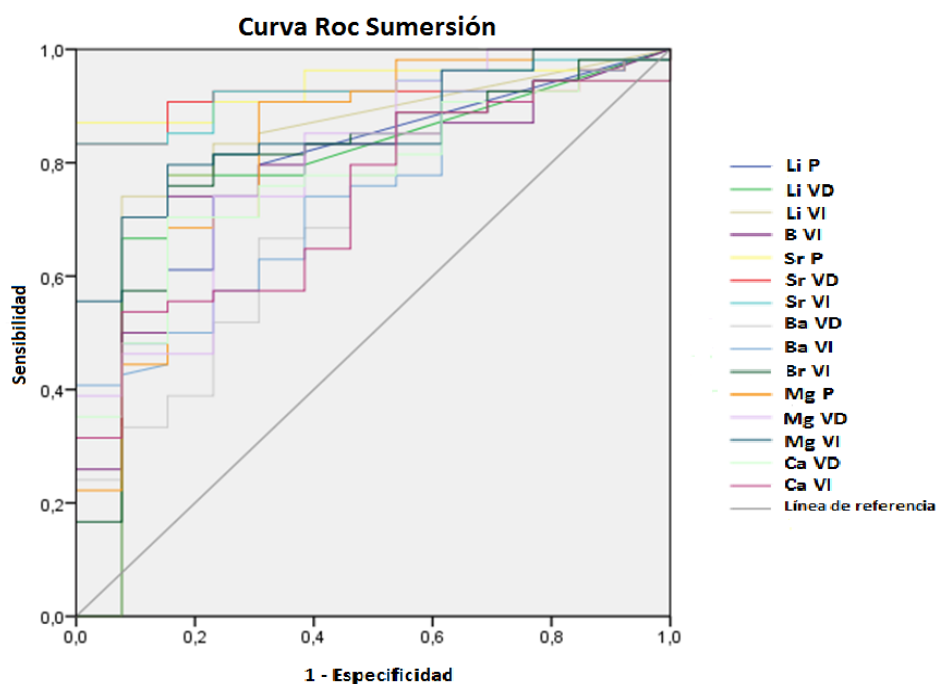
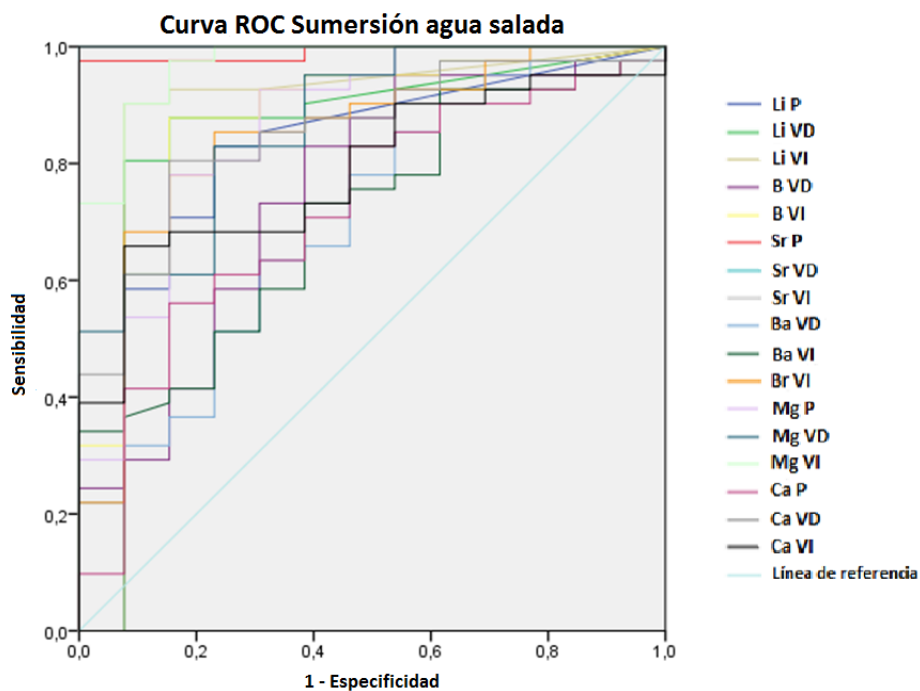


Figura 55. Curva ROC de los elementos químicos en sangre en los casos de sumersión.

Variable	Área	Error estándar	$p$	Límite inferior	Límite superior
Li P	,763	,080	,003	,607	,919
Li VD	,783	,076	,002	,634	,933
Li VI	,822	,075	,000	,675	,969
B VI	,783	,066	,002	,655	,912
Sr P	,934	,030	,000	,876	,993
Sr VD	,917	,035	,000	,849	,985
Sr VI	,926	,032	,000	,864	,988
Ba VD	,708	,079	,021	,554	,862
Ba VI	,736	,069	,009	,601	,870
Br VI	,802	,068	,001	,669	,935
Mg P	,826	,070	,000	,689	,964
Mg VD	,801	,067	,001	,668	,933
Mg VI	,856	,048	,000	,762	,951
Ca VD	,769	,063	,003	,645	,893
Ca VI	,732	,069	,010	,597	,868

Tabla 33. Áreas bajo las curvas ROC de los elementos químicos en los casos de sumersión, error estándar, probabilidad y límites superior e inferiores del área.



**Figura 56.** Curva ROC de los elementos químicos en sangre en los casos de sumersión en agua salada.

Variable	Área	Error estándar	<i>p</i>	Límite inferior	Límite superior
Li P	,805	,079	,001	,650	,960
Li VD	,850	,076	,000	,701	,999
Li VI	,879	,075	,000	,732	1,000
B VD	,750	,082	,007	,591	,910
B VI	,874	,059	,000	,758	,991
Sr P	,991	,010	,000	,970	1,000
Sr VD	1,000	,000	,000	1,000	1,000
Sr VI	1,000	,000	,000	1,000	1,000
Ba VD	,704	,084	,028	,540	,868
Ba VI	,708	,078	,025	,556	,860
Br VI	,846	,065	,000	,720	,973
Mg P	,863	,063	,000	,739	,987
Mg VD	,869	,055	,000	,761	,977
Mg VI	,970	,023	,000	,925	1,000
Ca P	,720	,081	,017	,562	,879
Ca VD	,852	,056	,000	,741	,962
Ca VI	,788	,064	,002	,663	,913

**Tabla 34.** Áreas bajo las curvas ROC de los elementos químicos en los casos de sumersión en agua salada, error estándar, probabilidad y límite superior e inferiores del área.

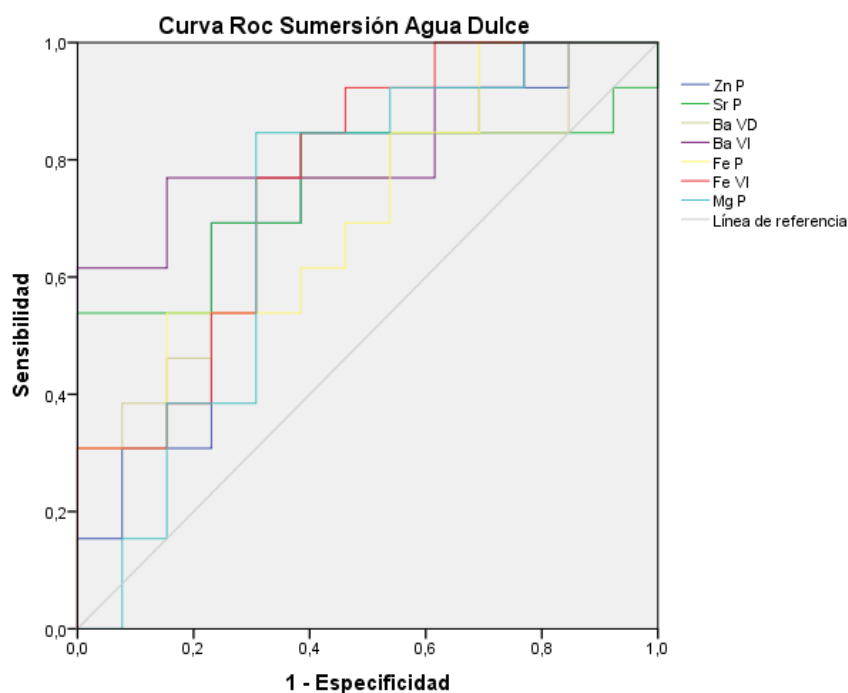


Figura 57. Curva ROC de los elementos químicos en sangre en los casos de sumersión en agua dulce.

Variable	Área	Error estándar	p	Límite inferior	Límite superior
Zn PB	,722	,103	,054	,520	,924
Sr PB	,757	,102	,026	,557	,958
Ba RV	,722	,102	,054	,522	,922
Ba LV	,822	,086	,005	,653	,992
Fe PB	,710	,102	,069	,511	,909
Fe LV	,769	,094	,020	,586	,952
Mg PB	,710	,108	,069	,499	,922

Tabla 35. Áreas bajo las curvas ROC de los elementos químicos en los casos de sumersión en agua dulce, error estándar, probabilidad y límites superior e inferiores del área.

Al analizar las curvas ROC observamos como las concentraciones de Li, Sr y Mg en sangre ventricular y periférica, las concentraciones de Ba y Ca en ambos ventrículos y la concentración de Br y B en el ventrículo izquierdo mostraron la mayor capacidad de discriminación para sumersión en general y sumersión en agua de mar. Al analizar los casos de sumersión en agua salada por separado, observamos que además de los parámetros enumerados, también presentan gran capacidad para discriminar entre la

muerte por sumersión en agua salada frente a otras causas de muerte, la concentración de calcio en sangre periférica y la concentración de boro en ventrículo derecho. En los casos de sumersión en agua dulce la mayor capacidad de discriminación la muestran las concentraciones de Fe y Zn, además de las de Mg, Ba y Sr.

También realizamos un análisis discriminante con aquellos marcadores químicos que mostraban las curvas que mejor discriminaban entre los casos de sumersión y los casos de no sumersión. Utilizamos como variable dependiente el grupo diagnóstico, estableciendo dos grupos: por un lado, las muertes por sumersión y por otro, otras causas de muerte y como variables independientes las concentraciones de los elementos traza. En la **Tabla 36** se muestran los porcentajes correctos de clasificación utilizando los elementos traza de manera individual y conjunta. De la misma forma, realizamos otro análisis discriminante estableciendo como grupos por un lado las muertes por sumersión en agua salada y por otro las muertes por otras causas para definir la variable dependiente. Los resultados obtenidos se muestran en la **Tabla 37**.

	Sumersión (% clasificación correcta)	No Sumersión (% clasificación correcta)	Total (%clasificación correcta)
Li (P, VD, VI)	87,0	15,4	73,1
B (VI)	46,3	92,3	55,2
Sr (P, VD, VI)	59,3	100	67,2
Ba (VD, VI)	18,5	100	34,3
Br (VI)	18,5	100	34,3
Mg (P,VD, VI)	55,6	92,3	62,7
Ca (P, VD, VI)	59,3	84,6	64,2
Li (P, VD, VI) B (VI) Sr (P, VD, VI) Ba (VD, VI) Br (VI) Mg (P,VD, VI) Ca (P, VD, VI)	74,1	84,6	76,1

**Tabla 36.** Análisis discriminante usando los elementos químicos en sumersión.

	Sumersión agua salada (% clasificación correcta)	No Sumersión (% clasificación correcta)	Total (%clasificación correcta)
Li ( P, VD, VI)	56,1	92,3	64,8
B (VD,VI)	46,3	92,3	57,4
Sr (P, VD, VI)	70,7	100	77,8
Ba (VD, VI)	19,5	100	38,9
Br (VI, VD)	65,9	95,3	72,2
Mg (P,VD, VI)	61,0	100	70,4
Ca (P, VD, VI)	58,5	92,3	66,7
Li ( P, VD, VI)			
B (VI, VD)			
Sr (P, VD, VI)	82,9	100	87,0
Mg (P,VD, VI)			
Ca (P, VD, VI)			
Li ( P, VD, VI)			
B (VI, VD)			
Sr (P, VD, VI)			
Br (VI)	80,5	92,3	83,3
Mg (P,VD, VI)			
Ca (P, VD, VI)			

**Tabla 37.** Análisis discriminante usando los elementos químicos en sumersión en agua salada.

El análisis discriminante mostró que, en los casos de sumersión, la determinación conjunta de Li en sangre periférica y sangre de los dos ventrículos permitió una correcta identificación del 73% del total de los casos. La determinación conjunta de Sr en las tres localizaciones sanguíneas permitió una clasificación correcta del 59% de los casos de sumersión, al igual que con Ca en las tres localizaciones sanguíneas. Una similar capacidad discriminante, aunque inferior a la del Sr y Ca mostraron las concentraciones sanguíneas de Mg. Boro, bario y bromo mostraron una pobre capacidad discriminante para los casos de sumersión. Por último, se observó, que la determinación conjunta de Li, Sr, Mg y Ca en las tres localizaciones sanguíneas, además de B y Br en la sangre del ventrículo izquierdo y Ba en la sangre de los dos ventrículos permitió una correcta identificación del 74% de los casos de sumersión, no mejorando significativamente la capacidad discriminante al eliminar elementos del grupo.



En el caso de las muertes por sumersión en agua salada, las concentraciones sanguíneas de Sr en ambos ventrículos y en la sangre periférica mostraron la mayor capacidad discriminante permitiendo la correcta identificación en el 71% de los casos. Se obtuvieron resultados similares con las concentraciones sanguíneas de Br en sangre del ventrículo izquierdo y derecho y Mg en todas las localizaciones sanguíneas, y una menor capacidad discriminante mostraron las concentraciones sanguíneas de Li y Ca en las tres localizaciones sanguíneas y B en la sangre ventricular. La determinación conjunta de Li, Sr, Mg y Ca en ambos ventrículos y sangre periférica y B en ambos ventrículos permitió la identificación correcta en el 83% de los casos. Al añadir la determinación de bromo en sangre del ventrículo izquierdo, no mejoró significativamente la clasificación correcta de los casos de sumersión en agua salada.

#### **4.8. Análisis descriptivo de las muestras de humor vítreo**

La **Tabla 38** muestra los valores (media, desviación estándar, mediana, mínimo, máximo y rango) obtenidos para los marcadores bioquímicos en el humor vítreo (HV) extraído del globo ocular derecho de cada uno de los cadáveres de los tres grupos diagnósticos estudiados, sumersión en agua salada (SAS), sumersión en agua dulce (SAD) y no sumersión (NS).

Resultados

**Tabla 38. Media, mediana, desviación estándar, mínimo, máximo y rango de los marcadores químicos en humor vítreo en los casos de sumersión en agua salada (SAS, N=41), sumersión en agua dulce (SAD, N=14) y no sumersión (NS, N=13)**

		Media	Mediana	Desviación estándar	Mínimo	Máximo	Rango
Li (µg/L)	SAS	5,87	2,06	11,21	0,00	51,73	51,73
	SAD	1,43	0,83	1,71	0,00	4,60	4,60
	NS	12,43	0,00	37,11	0,00	143,83	143,83
B (µg/L)	SAS	166,11	56,36	311,94	0,00	1599,6	1599,6
	SAD	54,57	24,90	92,56	0,00	381,05	381,05
	NS	43,39	19,22	53,33	0,00	160,27	160,27
Mn (µg/L)	SAS	3,90	3,90	7,51	0,00	40,79	40,79
	SAD	8,23	2,09	17,94	0,00	81,67	81,67
	NS	1,38	0,00	2,39	0,00	7,81	7,81
Ni (µg/L)	SAS	57,22	0,00	165,81	0,00	1053,4	1053,4
	SAD	40,03	1,15	79,27	0,00	262,31	262,31
	NS	1,17	0,00	2,43	0,00	7,53	7,53
Cu (µg/L)	SAS	25,34	17,50	32,21	0,00	191,44	191,44
	SAD	19,56	16,34	15,99	0,00	69,70	69,70
	NS	13,21	11,78	10,91	0,00	38,32	38,32
Zn (µg/L)	SAS	730,15	591,52	782,73	15,68	5340,3	5324,6
	SAD	655,05	438,61	887,93	11,07	4291,3	4280,3
	NS	666,09	817,27	509,94	0,00	1686,72	1686,7
As (µg/L)	SAS	3,30	1,79	5,56	0,00	34,00	34,00
	SAD	3,45	3,52	2,96	0,00	9,57	9,57
	NS	5,38	0,71	13,05	0,00	48,20	48,20
Se (µg/L)	SAS	10,64	8,89	11,04	0,00	53,20	53,20
	SAD	13,33	12,09	8,65	0,00	38,41	38,41
	NS	3,45	2,44	3,54	0,00	9,92	9,92
Sr (µg/L)	SAS	203,06	60,81	429,18	12,30	1955,5	1943,2
	SAD	43,32	39,81	21,30	15,05	81,74	66,69
	NS	37,67	35,90	12,71	15,24	64,25	49,01
Mo (µg/L)	SAS	0,32	0,00	1,29	0,00	7,51	7,51
	SAD	2,76	0,00	10,08	0,00	48,28	48,28
	NS	0,54	0,05	0,80	0,00	2,88	2,88
Cd (µg/L)	SAS	0,59	0,00	1,56	0,00	10,06	10,06
	SAD	0,30	0,00	0,63	0,00	2,79	2,79
	NS	0,06	0,00	0,10	0,00	0,33	0,33
Ba (µg/L)	SAS	24,86	18,93	21,22	5,65	142,00	136,35
	SAD	22,67	14,38	21,14	1,85	96,99	95,15
	NS	23,33	23,77	17,04	0,00	47,26	47,26
Pb (µg/L)	SAS	0,95	0,00	2,86	0,00	19,07	19,07
	SAD	0,95	0,00	2,02	0,00	7,71	7,71
	NS	3,15	0,00	4,42	0,00	11,90	11,90
Al (µg/L)	SAS	38,45	28,98	62,47	0,00	437,10	437,10
	SAD	20,78	8,81	26,09	0,00	78,32	78,32
	NS	41,21	24,62	64,93	0,00	294,56	294,56
Fe (µg/L)	SAS	519,05	62,75	1556,0	0,00	10083,9	10083,9
	SAD	171,61	131,83	146,65	21,25	508,97	487,72
	NS	18,02	0,00	29,25	0,00	82,88	82,88
Br (mg/L)	SAS	6,13	3,48	9,11	0,63	62,22	61,59
	SAD	3,28	2,54	1,96	1,08	9,20	8,12
	NS	4,56	6,06	4,81	2,02	19,38	17,36
Mg (mg/L)	SAS	45,09	26,07	60,77	3,85	296,88	293,02
	SAD	23,98	23,57	3,91	16,82	31,98	15,15
	NS	24,18	22,42	6,58	18,48	49,47	31,00
K (mg/L)	SAS	498,43	477,23	228,05	100,02	1478,4	1378,3
	SAD	475,73	416,37	164,12	321,86	923,83	601,97
	NS	401,66	414,19	95,96	176,58	552,14	375,56
Ca (mg/L)	SAS	61,91	65,57	41,06	4,25	222,47	218,22
	SAD	49,67	52,23	17,81	13,18	78,91	65,73
	NS	62,13	70,32	21,00	8,91	90,21	81,31

SAS: Sumersión agua salada; SAD: Sumersión agua dulce; NS: No sumersión.

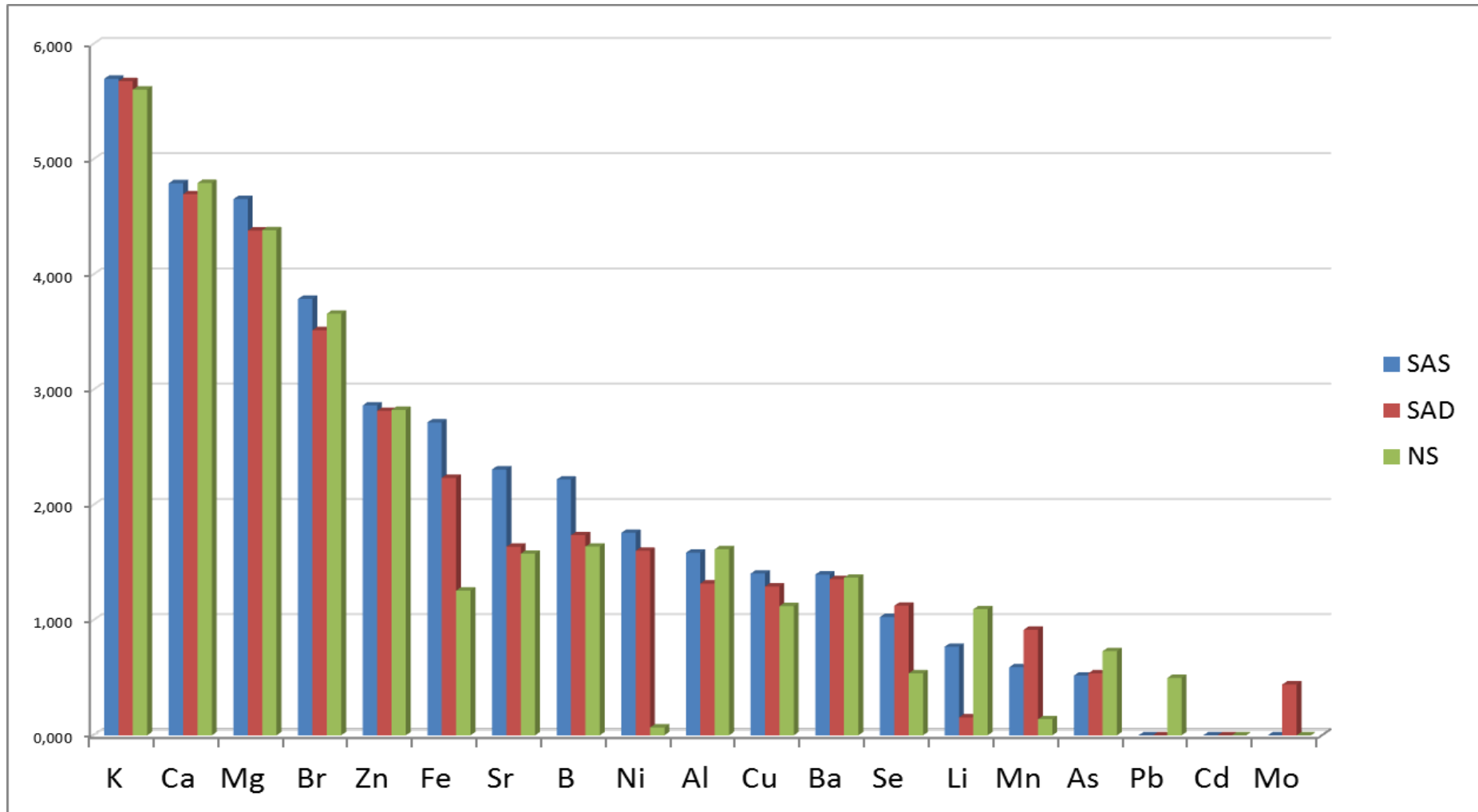
Las concentraciones más altas de B, Sr, Fe, Br y Mg en HV se obtuvieron en los casos de sumersión en agua de mar en comparación con los casos de ahogamiento en agua dulce y no sumersión.

El valor medio de las concentraciones de hierro fue significativamente mayor en los casos de sumersión en agua de mar en comparación con otras causas. De las 41 muestras de SAS analizadas, sólo 6 de ellas tenían niveles superiores a 1100 ppb de Fe, lo que puede deberse a contaminación, el resto no excedió de 600 ppb de Fe, mostrando concentraciones similares a las muestras de SAD. Las muestras de NS mostraron concentraciones bajas de Fe.

Las muestras de HV de SAS contenían mayores concentraciones de Li que las de SAD y NS, sólo en un caso de NS se obtuvieron concentraciones más altas debido a la contaminación. Eliminando esa muestra, la concentración media de Li en HV en los casos de no sumersión, es inferior a 1 ppb.

Las concentraciones de Se fueron ligeramente más altas en los casos de SAS y SAD. Los niveles de Mn, Cu, Zn, Ba, Al, Ca y K fueron similares en todos los casos y As, Mo, Cd y Pb mostraron concentraciones muy bajas.

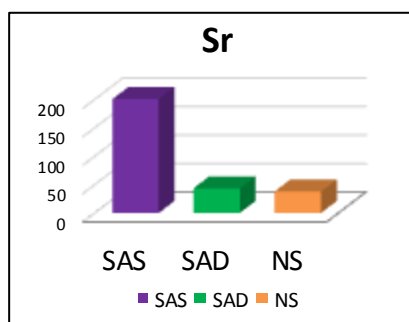
La **Figura 58** es un gráfico de barras agrupadas, en los que se muestran los niveles medios en escala logarítmica de los analitos investigados en las muestras de HV.



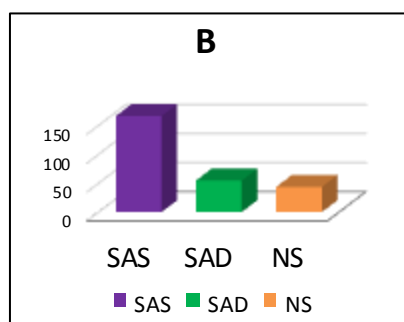
**Figura.58.** Concentración media ( $\mu\text{g/L}$  en escala logarítmica) de los elementos químicos es las muestras de humor vítreo de SAS, SAD y NS.

Como se observa, el perfil de la concentración elemental es similar en los tres grupos diagnósticos, observándose mayor concentración de Mg, Br, Fe, Sr y B en el grupo de sumersión en agua salada. En cuanto a los elementos minoritarios, los que mostraron concentraciones más elevadas fueron Cu, Ba y Al con similares niveles en los tres grupos y el Ni con muy baja concentración en el grupo de no sumersión frente a los otros dos grupos diagnósticos.

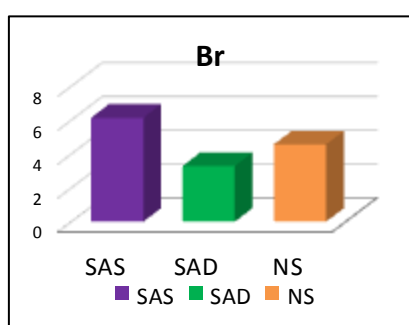
Las **Figuras 59 a 62** muestran una comparación de las concentraciones de Sr, B, Mg y Br respectivamente en muestras de HV entre los tres grupos diagnósticos, y como puede observarse, el grupo SAS se destaca frente a los otros, registrando la concentración más alta en los cuatro elementos.



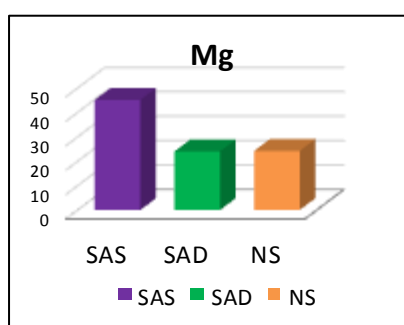
**Figura 59.** Concentraciones de Sr en HV.



**Figura 60.** Concentraciones de B en HV.



**Figura 61.** Concentraciones de Br en HV.



**Figura 62.** Concentraciones de Mg en HV.

#### 4.9. Análisis de las diferencias en las concentraciones de los elementos químicos en humor vítreo, entre los casos de muerte por sumersión en agua salada, sumersión en agua dulce y no sumersión

Para evaluar la influencia de la causa de la muerte en los valores de los elementos químicos estudiados, aplicamos el Test de Kruskal-Wallis, análisis estadístico de comparación de medias para más de dos muestras independientes y el Test de Mann-Whitney para dos muestras independientes (*Tabla 39*).

<b>Tabla 39. Test Kruskal Wallis y Test de Mann-Whitney. Diferencias estadísticas en humor vítreo en SAS, SAD y NS (<i>P</i>, probabilidad)</b>				
	<b>SAS-SAD-NS</b>	<b>SAS-SAD</b>	<b>SAS-NS</b>	<b>SAD-NS</b>
<b>Li</b>	,004	,024	,004	,257
<b>B</b>	,004	,005	,016	,990
<b>Ni</b>	,066	,178	,167	,017
<b>Se</b>	,000	,068	,001	,000
<b>Sr</b>	,000	,002	,000	,604
<b>Al</b>	,124	,047	,741	,135
<b>Fe</b>	,000	,140	,000	,000
<b>Mg</b>	,025	,064	,017	,503
<b>K</b>	,120	,380	,043	,294
<b>Ca</b>	,141	,165	,468	,031
<b>Br</b>	,032	,015	,132	,356

SAS: Sumersión en agua salada; SAD: Sumersión en agua dulce; NS: No sumersión

En la *Tabla 39* sólo se muestran los elementos que presentan diferencias estadísticamente significativas. Se observaron diferencias estadísticamente significativas para Li, B, Se, Sr, Fe, Mg y Br entre los tres grupos diagnósticos (SAS-SAD-NS).

Boro y estroncio mostraron valores más altos en los casos de SAS y diferencias estadísticamente significativas en comparación con los valores observados después de SAD y NS, como le ocurre al litio.

Bromo y aluminio mostraron diferencias estadísticamente significativas en los casos de sumersión en agua de mar en comparación con la sumersión en agua dulce.

Para Se y Fe encontramos diferencias estadísticamente significativas entre otras causas de muerte y los dos grupos de sumersión.

Observamos diferencias estadísticamente significativas para Mg y K entre los casos de sumersión en agua de mar y los casos de no sumersión y para Ni y Ca entre los casos de sumersión en agua dulce y no sumersión.

#### **4.10. Análisis de ratios entre la concentración de los elementos en agua de mar y humor vítreo y de ratios entre la concentración de elementos en agua de mar y sangre**

La **Tabla 40** muestra la relación entre las concentraciones de los elementos en agua de mar (AS) y en humor vítreo (HV) y la relación entre las concentraciones de los elementos en agua de mar y sangre periférica (SP), sangre del ventrículo izquierdo (VI) y sangre del ventrículo derecho (VD).

**Tabla 40. Ratio de las concentraciones de los elementos entre agua de mar y humor vítreo y entre agua de mar y sangre periférica, sangre de ventrículo izquierdo y de ventrículo derecho**

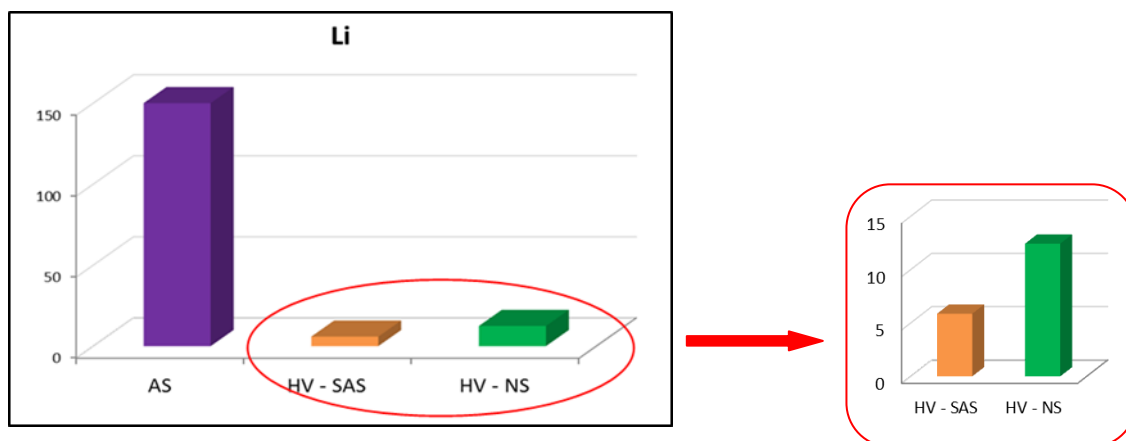
Elemento	AS/HV	AS/P	AS/VI	AS/VD
Li	12,31	12,29	11,22	11,91
B	78,91	33,08	32,76	29,81
Mn	18,73	1,96	1,04	0,25
Ni	7,38	6,47	4,67	3,40
Cu	0,40	0,00	0,00	0,00
Zn	0,17	0,03	0,03	0,01
As	0,95	0,69	0,53	0,39
Se	1,43	0,04	0,03	0,03
Sr	200,44	124,80	115,13	122,57
Mo	18,02	1,65	1,06	0,25
Cd	0,82	0,00	0,00	0,00
Ba	1,09	0,91	1,29	1,10
Pb	2,44	1,22	0,96	0,46
Al	0,83	0,42	0,60	0,43
Fe	5,27	0,01	0,01	0,00
Br	14,66	4,94	6,66	4,75
Mg	50,53	23,16	21,18	18,04
K	0,99	0,30	0,31	0,26
Ca	6,59	3,26	3,38	3,88

AS: Agua salada; HV: Humor vítreo; P: Sangre periférica; VI: Ventrículo izquierdo; VD: Ventrículo derecho

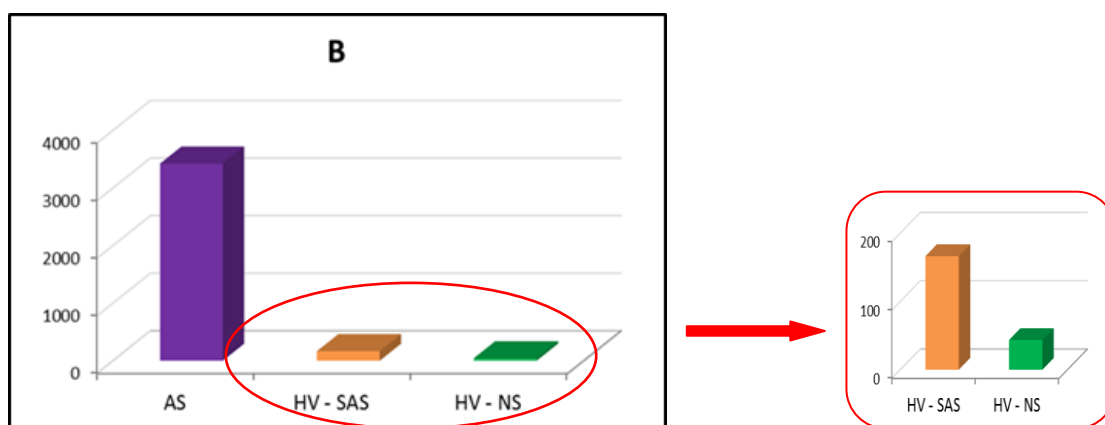
Estroncio, B, Mg, Br y Li muestran las relaciones más altas AS/HV y en sangre, Sr, B, Mg y Li muestran los valores más altos de las ratios AS/Sangre (SP, VI y VD), inferiores a los valores obtenidos para HV (*Figura 68*). Manganeso y molibdeno no tienen interés debido a niveles muy bajos en muestras de HV.

En nuestro estudio, Li, B, Sr, Br y Mg están presentes en cantidades elevadas en el agua de sumersión y en cantidades muy pequeñas en el humor vítreo de los casos de no sumersión (*Figuras 63-67*), pero sólo se observaron diferencias entre las muestras de SAS y las muestras de NS para las concentraciones de B, Sr y Mg. Por lo que B, Sr y Mg en HV podrían ser marcadores útiles para el diagnóstico de sumersión.

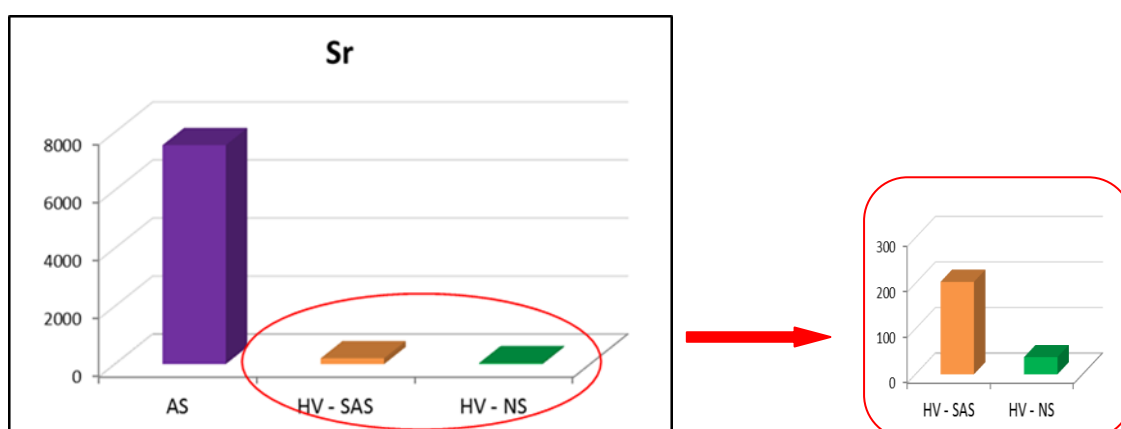




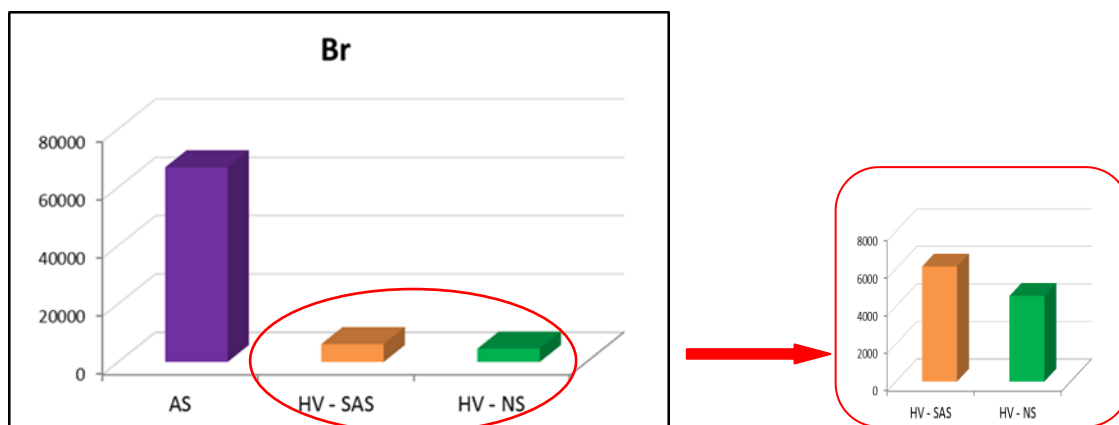
**Figura 63.** Concentraciones de Li en agua de mar y en humor vítreo en el grupo de sumersión en agua salada y no sumersión.



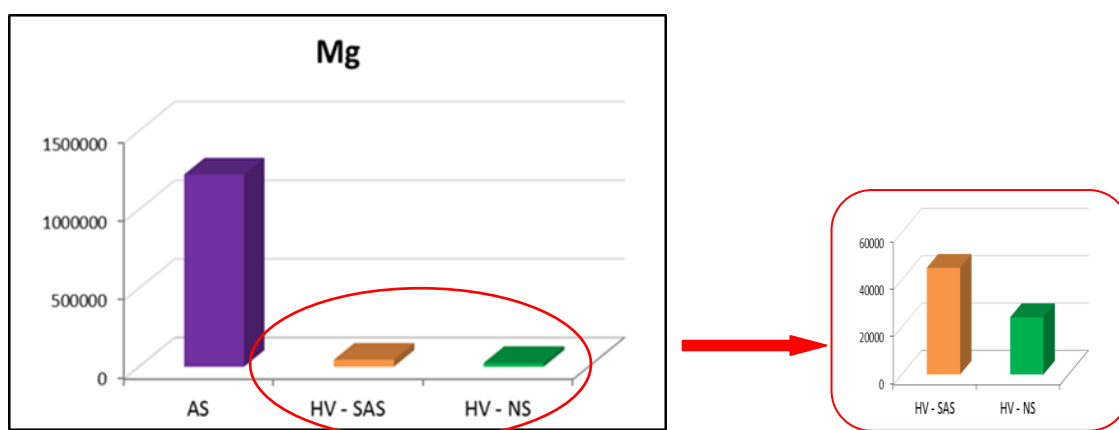
**Figura 64.** Concentraciones de B en agua de mar y en humor vítreo en el grupo de sumersión en agua salada y no sumersión.



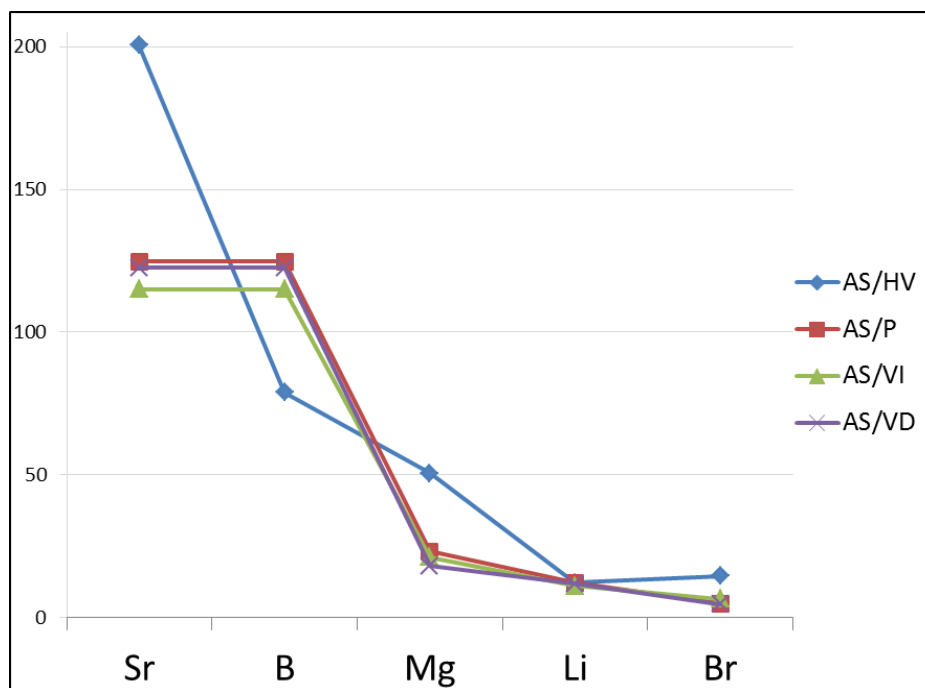
**Figura 65.** Concentraciones de Sr en agua de mar y en humor vítreo en el grupo de sumersión en agua salada y no sumersión.



*Figura 66.* Concentraciones de Br en agua de mar y en humor vítreo en el grupo de sumersión en agua salada y no sumersión.



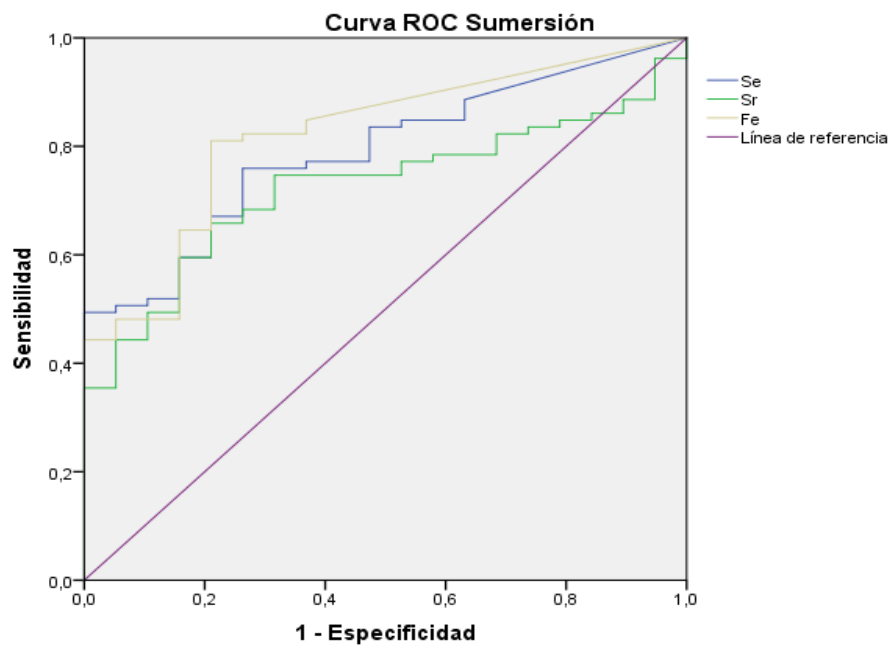
*Figura 67.* Concentraciones de Mg en agua de mar y en humor vítreo en el grupo de sumersión en agua salada y no sumersión.



**Figura 68.** Ratios AS/HV, AS/P, AS/VI y AS/VD de Sr, B, Mg, Li y Br

#### 4.11. Análisis de las diferencias en las concentraciones de los elementos químicos en humor vítreo entre los casos de muerte por sumersión en agua salada y no sumersión mediante las curvas ROC y el Análisis discriminante

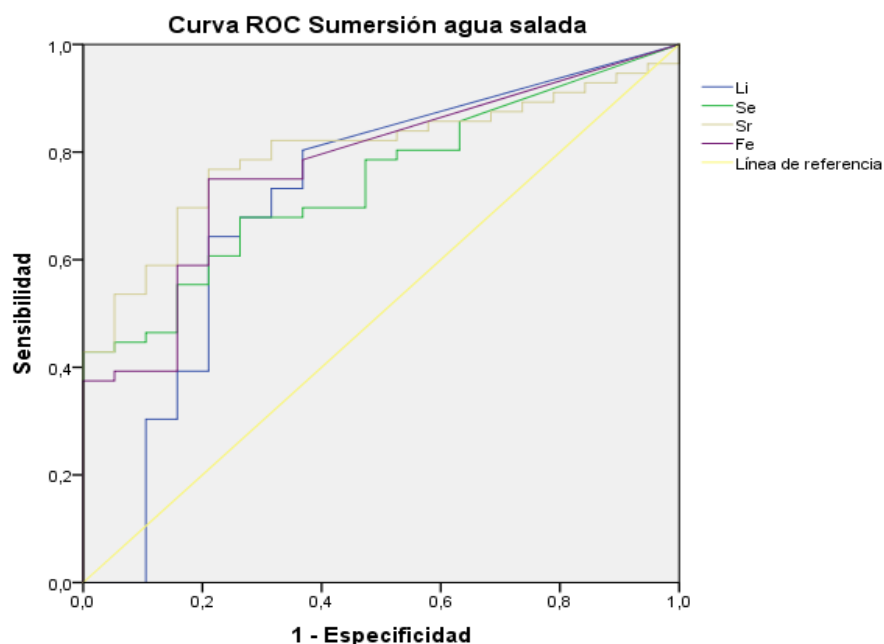
Estudiamos las curvas ROC expresadas como las concentraciones de todos los marcadores bioquímicos en humor vítreo, prestando especial atención al área que representa el diagnóstico correcto entre dos individuos fallecidos, uno por sumersión y otro por otras causas, y por otro lado, entre un individuo fallecido por sumersión en agua salada y otro fallecido por otras causas, y seleccionando los marcadores bioquímicos con áreas bajo la curva mayores de 0,70. La **Figura 69** muestra la curva ROC de los elementos químicos analizados con áreas mayores de 0,70 en los casos de sumersión y la **Figura 70** muestra la curva ROC para los casos de sumersión en agua salada. Las **Tablas 41** y **42** muestran el valor de las áreas bajo las curvas ROC, la desviación estándar, la probabilidad y los límites superior e inferior del área de cada curva en los casos de sumersión y de sumersión en agua salada, respectivamente.



**Figura 69.** Curva Roc de los elementos químicos en humor vítreo en los casos de sumersión.

Variable	Área	Error estándar	$p$	Límite inferior	Límite superior
Se	,788	,049	,000	,693	,884
Sr	,725	,052	,002	,622	,826
Fe	,821	,048	,000	,726	,915

**Tabla 41.** Áreas bajo las curvas ROC de los elementos químicos en los casos de sumersión, error estándar, probabilidad y límites superior e inferiores del área.



**Figura 70.** Curva ROC de los elementos químicos en humor vítreo en los casos de sumersión en agua salada.

Variable	Área	Error estándar	<i>p</i>	Límite inferior	Límite superior
Li	,714	,076	,005	,564	,864
Se	,744	,058	,002	,632	,857
Sr	,798	,052	,000	,697	,899
Fe	,774	,058	,000	,662	,887

**Tabla 42.** Áreas bajo las curvas ROC de los elementos químicos en los casos de sumersión en agua salada, error estándar, probabilidad y límites superior e inferiores del área.

Al analizar las curvas ROC observamos como las concentraciones de Se, Sr y Fe en humor vítreo mostraron la mayor capacidad de discriminación para sumersión en general, con áreas bajo la curva mayores de 0,7. Otros elementos que no se indican en la tabla, pero cuyas curvas mostraron áreas muy próximas a 0,7, fueron Li con área 0,680 ( $p=0,015$ ) y Mg con 0,644 ( $p=0,052$ ). Al analizar los casos de sumersión específicamente en agua salada, observamos que las concentraciones de Li, Se, Sr y Fe en humor vítreo también presentan gran capacidad para discriminar entre la muerte por sumersión en agua salada frente a otras causas de muerte. En este caso encontramos que las curvas de boro, magnesio y potasio presentaban áreas muy próximas a 0,7, así el boro mostró un área de 0,679 ( $p=0,021$ ), el área de magnesio fue de 0,679 ( $p=0,021$ ) y la del potasio 0,649 ( $p=0,053$ ).

También realizamos un análisis discriminante con aquellos marcadores químicos que mostraban las curvas que mejor discriminaban entre los casos de sumersión y los casos de no sumersión. Utilizamos como variable dependiente el grupo diagnóstico, estableciendo dos grupos: por un lado, las muertes por sumersión y por otro las muertes por otra causa y como variables independientes las concentraciones de los elementos traza. En la **Tabla 43** se muestran los porcentajes correctos de clasificación utilizando los elementos traza de manera individual y conjunta. De la misma forma, realizamos otro análisis discriminante estableciendo como grupos por un lado las muertes por sumersión en agua salada y por otro las muertes por otra causa para definir la variable dependiente. Los resultados obtenidos se muestran en la **Tabla 44**.

	Sumersión (% clasificación correcta)	No Sumersión (% clasificación correcta)	Total (% clasificación correcta)
Ca	53,2	57,9	54,1
Se	60,8	78,9	64,3
Li	83,5	73,7	81,6
B			
Se			
Ca			
Li	84,8	68,4	81,6
B			
Se			
Sr			
Ca			

**Tabla 43.** Análisis discriminante usando los elementos químicos en sumersión.

	Sumersión agua salada (% clasificación correcta)	No Sumersión (% clasificación correcta)	Total (% clasificación correcta)
Se	57,9	78,9	63,2
Ca	45,6	57,9	48,7
Li			
Fe			
Se	64,9	73,7	67,1
Sr			
Li			
B			
Se	89,5	68,4	84,2
Sr			
Ca			
Br			

**Tabla 44.** Análisis discriminante usando los elementos químicos en sumersión en agua salada.

El análisis discriminante mostró que, en los casos de sumersión, la determinación de Ca en humor vítreo permitió una correcta identificación del 54% del total de los casos y la determinación de Se permitió la clasificación correcta del 64% de los casos. La determinación conjunta de Li, B, Se y Ca permitió una clasificación correcta del 83,5% de los casos de sumersión, consiguiendo una mayor capacidad discriminante (84,8%) al añadir Sr al grupo.

En el caso de las muertes por sumersión en agua salada, las concentraciones de Se y Ca en humor vítreo de forma individual mostraron la mayor capacidad discriminante permitiendo la correcta identificación en el 58% de los casos de sumersión en agua salada para el Se y de casi el 46% para el calcio. Obtuvimos una pobre capacidad discriminante para la determinación de forma individual del resto de elementos estudiados. La determinación conjunta de Li, Fe, Se y Sr en humor vítreo permitió la identificación correcta en el 65% de los casos. Al eliminar el hierro y añadir Ca, Br y B, se mejoró significativamente la capacidad discriminante permitiendo la clasificación correcta de 89,5% de los casos de sumersión en agua salada y el 84,2% del total de los casos.

#### 4.12. Análisis de correlación entre elementos químicos en humor vítreo y sangre

Cuando analizamos todos los casos (N=68) de manera conjunta encontramos correlaciones estadísticamente significativas entre las concentraciones de B, Li, Ni, Sr, K, Ca Mg y Br en cada una de las tres localizaciones sanguíneas estudiadas y humor vítreo (*Tabla 45*)

		<b>B (P)</b>	<b>B (VD)</b>	<b>B (VI)</b>
<b>B (HV)</b>	r	0,790	0,662	0,610
	p	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
		<b>Li (P)</b>	<b>Li (VD)</b>	<b>Li (VI)</b>
<b>Li (HV)</b>	r	0,716	0,541	0,572
	p	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
		<b>Ni (P)</b>	<b>Ni (VD)</b>	<b>Ni (VI)</b>
<b>Ni (HV)</b>	r	0,566	0,356	0,57
	p	0,001	0,046	0,001
		<b>Sr (P)</b>	<b>Sr (VD)</b>	<b>Sr (VI)</b>
<b>Sr (HV)</b>	r	0,509	0,543	0,460
	p	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
		<b>K (P)</b>	<b>K (VD)</b>	<b>K (VI)</b>
<b>K (HV)</b>	r	0,657	0,669	0,644
	p	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
		<b>Ca (P)</b>	<b>Ca (VD)</b>	<b>Ca (VI)</b>
<b>Ca (HV)</b>	r	0,463	0,385	0,484
	p	0,001	0,009	0,001
		<b>Mg (P)</b>	<b>Mg (VD)</b>	<b>Mg (VI)</b>
<b>Mg (HV)</b>	r	0,514	0,496	0,472
	p	<0,0001	0,001	0,001
		<b>Br (P)</b>	<b>Br (VD)</b>	<b>Br (VI)</b>
<b>Br (HV)</b>	r	0,343	0,369	0,584
	p	0,020	0,024	<0,0001

r: coeficiente de correlación; p: probabilidad; HV: Humor vítreo; P: Sangre periférica; VI: sangre de ventrículo izquierdo; VD: sangre de ventrículo derecho

**Tabla 45.** Correlaciones estadísticamente significativas entre las concentraciones de elementos químicos en sangre y humor vítreo en todos los casos de muerte.



Cuando los casos de sumersión (N=55) se analizaron exclusivamente, encontramos correlaciones estadísticamente significativas para B, Li, Sr, K y Br entre las concentraciones en cada una de las tres localizaciones sanguíneas analizadas y el humor vítreo (*Tabla 46*).

		<b>B (P)</b>	<b>B (VD)</b>	<b>B (VI)</b>
<b>B (HV)</b>	r	0,941	0,355	0,775
	p	< 0,0001	0,039	< 0,0001
		<b>Li (P)</b>	<b>Li (VD)</b>	<b>Li (VI)</b>
<b>Li (HV)</b>	r	0,820	0,367	0,638
	p	< 0,0001	0,04	< 0,0001
		<b>Sr (P)</b>	<b>Sr (VD)</b>	<b>Sr (VI)</b>
<b>Sr (HV)</b>	r	0,881	0,414	0,676
	p	< 0,0001	0,011	< 0,0001
		<b>K (P)</b>	<b>K (VD)</b>	<b>K (VI)</b>
<b>K (HV)</b>	r	0,646	0,599	0,579
	p	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
		<b>Br (P)</b>	<b>Br (VD)</b>	<b>Br (VI)</b>
<b>Br (HV)</b>	r	0,580	0,627	0,799
	p	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001

r: coeficiente de correlación; p: probabilidad; HV: Humor vítreo; P: Sangre periférica; VI: sangre de ventrículo izquierdo; VD: sangre de ventrículo derecho

**Tabla 46.** Correlaciones estadísticamente significativas entre las concentraciones de elementos químicos en sangre y humor vítreo en los casos de muerte por sumersión.

Cuando se compararon los casos de sumersión con el medio de sumersión, encontramos correlaciones estadísticamente significativas entre el medio de sumersión y el humor vítreo para Sr ( $r=0,520$ ;  $p=0,005$ ); Br ( $r=0,455$ ;  $p=0,010$ ) y Li ( $r=0,492$ ;  $p=0,009$ ).

**4.13. Análisis de correlación de los elementos en sangre y humor vítreo con el intervalo postmortem y la edad de los sujetos**

No hallamos correlaciones significativas entre las concentraciones de los parámetros bioquímicos en sangre en las tres localizaciones, y las concentraciones en humor vítreo ni con el intervalo post mortem, ni con la edad de los sujetos.

## **5. DISCUSIÓN**



La muerte por sumersión es un problema de salud pública importante. Es considerada como la segunda causa de muerte no intencional, tras las producidas por accidentes de tráfico (Beeck et al., 2005), y representa más de medio millón de muertes anuales en todo el mundo (Salomez y Vincent, 2004). Este número está infraestimado debido a la falta de notificación y registro de muchos casos (De Nicola et al., 1997), por las dificultades en su diagnóstico.

El diagnóstico de la causa y el establecimiento de la etiología en casos de sumersión se consideran un desafío para los patólogos forenses. Generalmente se acepta que no todas las personas cuyos cuerpos son recuperados del agua habrían muerto por sumersión. Después de establecer el hecho de que la persona estaba viva antes de entrar en el agua, la cuestión clave de si la víctima murió por sumersión debe ser resuelta. En la mayoría de estos casos es necesario cotejar por un lado los hallazgos de autopsia con los resultados obtenidos en la realización del mayor número de pruebas complementarias, para determinar la causa de la muerte (Romero, 2007).

Por todo ello, el diagnóstico post mortem de ahogamiento continúa siendo uno de los más difíciles en la patología forense y con mayor frecuencia necesita exámenes complementarios para confirmar o descartar ciertas causas de muerte o para proporcionar información que permita reconstruir el evento. La prueba diagnóstica ideal como prueba definitiva de sumersión todavía debe ser establecida, y son necesarias más investigaciones (Piette y De Letter, 2006).

El análisis de marcadores químicos en fluidos biológicos tales como sangre, suero y orina, ha sido utilizado durante años para proporcionar información sobre toxicidad y como herramienta diagnóstica en gran número de enfermedades. La determinación de elementos traza en sangre, suero y humor vítreo puede ser aplicada en medicina forense para el diagnóstico de la causa de la muerte. En este sentido, uno de los principios generales que puede ayudar a confirmar el diagnóstico de sumersión es la presencia en la circulación sanguínea de sustancias químicas presentes en el agua de sumersión que se encuentran en el cuerpo humano en concentraciones muy bajas (elementos traza). El marcador ideal, como sugieren Piette y De Letter (2006), debería ser capaz de atravesar la membrana alveolo-capilar y penetrar en la circulación sanguínea, no siendo capaz de llegar a la misma por cualquier otro medio (aparato digestivo) ni debido a fenómenos de difusión postmortem y, además, debería

estar presente en altas concentraciones en el agua de sumersión y en concentraciones muy bajas en el cuerpo humano.

El humor vítreo comparado con el líquido cefalorraquídeo y la sangre, es el compartimento de líquido más comúnmente analizado en las investigaciones bioquímicas, debido a los cambios autolíticos retardados que sufre y su fácil extracción sin contaminación. Investigaciones previas refieren que la bioquímica del humor vítreo postmortem imita de forma marcada la bioquímica sérica ante-mortem, de esta manera, los constituyentes bioquímicos del humor vítreo, y especialmente el potasio, han sido ampliamente utilizados en la estimación del llamado intervalo post-mortem (IPM). Otros marcadores también se han estudiado para este fin, como sodio y cloro (Rose y Collins en 2015), pero en la actualidad, es el potasio el que proporciona resultados más fiables.

El análisis bioquímico del HV también se utiliza para el diagnóstico post-mortem de enfermedades metabólicas (por ejemplo, diabetes mellitus, desequilibrios electrolíticos, retención de urea). En este sentido, podemos citar algunos trabajos en los que se han estudiado diferentes marcadores químicos en humor vítreo para el diagnóstico de la causa de la muerte, así, entre los más recientes figura el de Mitchell et al. en 2013 que sostiene que el análisis bioquímico de humor vítreo es una prueba accesoria aceptada para la investigación de la causa de la muerte, para ello determinaron los niveles de Na, Cl, K y Ca, entre otros parámetros bioquímicos en humor vítreo postmortem y estudiaron su contribución en la determinación de la causa de la muerte.

Rose y Collins en 2015 recogen los valores normales de una serie de parámetros bioquímicos, tales como Na, Cl, K y Cr entre otros, en humor vítreo para poder entender la química vítrea postmortem, y observan como los niveles de potasio aumentan con el tiempo, mientras que los de cloro y sodio son más estables que el K y reflejan los niveles premortem hasta 120 horas después de la muerte. Por lo tanto, los niveles aumentados y/o disminuidos de estos analitos en el análisis postmortem pueden ser indicativos y útiles para diagnosticar muchas enfermedades previas.

En 2016 Belsey y Flanagan en su artículo: *“Postmortem biochemistry: Currents applications”* hacen una recopilación de los diferentes tests bioquímicos que con mayor frecuencia se aplican en

los fluidos biológicos para la determinación de la causa de la muerte. Así entre los elementos químicos que se determinan en humor vítreo está el potasio para calcular el intervalo postmortem, ya que después de la muerte la concentración en humor vítreo se incrementa rápidamente, por lo que concentraciones de potasio mayores de 15 mmol/L sugieren descomposición postmortem. Para el cloro el valor de referencia en humor vítreo es de 105 a 135 mmol/L y un valor más elevado indica muerte por sumersión en agua de mar. De la misma manera para el sodio, valores superiores a los niveles de referencia, 135 a 145 mmol/L, son indicativos de muerte por sumersión en agua de mar.

Son muy escasas y recientes las investigaciones en humor vítreo para el diagnóstico de muerte por sumersión. Entre los trabajos que hemos encontrado en los que se ha estudiado la determinación de elementos químicos en humor vítreo como posibles marcadores para el diagnóstico de sumersión, destacan el de Byard et al., 2011, en el que se analizan los niveles de sodio en humor vítreo de sujetos fallecidos por sumersión en agua salada y en agua dulce, y se encontraron que las concentraciones de sodio eran superiores en los casos de sumersión en agua de mar. Estos hallazgos les llevaron a afirmar que el nivel de sodio en humor vítreo es una prueba de fácil realización que puede ser un complemento útil para la investigación de posibles muertes por sumersión.

Posteriormente Cala et al. en 2013 sugerían en su estudio que el análisis de cloro y sodio en humor vítreo es una prueba valiosa para determinar la causa de la muerte en casos en los que los cuerpos se recuperan del agua del mar.

También en el trabajo de Mitchell et al. (2013) citado anteriormente en el que observaron que las determinaciones de cloro y sodio en humor vítreo podían contribuir al diagnóstico postmortem de sumersión. Por el contrario, las determinaciones de K y Ca no contribuyeron al diagnóstico postmortem de la causa de la muerte.

Más recientemente, en 2016, Anne et al. sometieron a inmersión globos oculares bovinos y afirmaron que la elevación postmortem de cloruro sódico en humor vítreo puede ayudar a diferenciar las muertes por sumersión en agua salada de las muertes por inmersión no relacionadas con sumersión. Observaron que tras la inmersión de los globos oculares bovinos en agua de mar durante una hora no se elevaban los niveles de cloruro sódico en humor

vítreo, mostrándose una diferencia significativa a partir de las 6 horas de inmersión. Por ello Anne y sus colaboradores concluyen que, suponiendo propiedades físicas similares en seres humanos, cualquier elevación en los niveles postmortem de cloruro sódico vítreo en cuerpos sumergidos en agua de mar durante menos de una hora, no debería orientar al diagnóstico de muerte por sumersión.

En nuestro estudio hemos analizado varios marcadores bioquímicos en humor vítreo de globo ocular derecho para evaluar la eficacia de diferentes parámetros bioquímicos en el diagnóstico post-mortem de sumersión. En los primeros estudios que se realizaron sobre el humor vítreo, se asumió que las concentraciones de este fluido eran idénticas en los dos globos oculares, como ya lo indicaron en 1963 Adelson et al. en sus estudios sobre el potasio. Más recientemente, Gagajewski et al. (2004) analizaron Na, K, Cl, glucosa y acetona, entre otros analitos, en el humor vítreo de ambos globos oculares y no encontraron diferencias entre ellos. Thierauf et al. (2009) tampoco encontraron diferencias significativas entre los vítreos de los dos ojos cuando determinaron las concentraciones de Na, Cl, K, Ca, glucosa y urea.

Sin embargo, otras investigaciones han demostrado la existencia de concentraciones diferentes en el humor vítreo de los dos ojos. En este sentido, Balasooriya et al. en 1984 encontraron concentraciones diferentes de K, Na y urea en el humor vítreo de los dos ojos. De la misma forma concluyen Sparks et al. (1989) en el análisis de potasio para la determinación del intervalo postmortem. Más tarde, Pounder et al. (1998) también encontraron diferencias en las concentraciones de electrolitos tales como Na, K y Cl entre las muestras de humor vítreo extraídas de los dos globos oculares. En el caso de sodio y cloro las diferencias fueron atribuidas a la manipulación de las muestras antes del análisis, pero en el caso del potasio las diferencias en las concentraciones fueron más significativas, lo cual comprometía la utilidad del potasio vítreo en la determinación del intervalo postmortem.

En cualquier caso, las causas de estas diferencias no están finalmente clarificadas y en cierto modo se atribuyen a ligeras diferencias en el muestreo y a las concentraciones no homogéneas de los diferentes compuestos dentro del humor vítreo. En este sentido, hay que mencionar el trabajo de Bito en 1970 que analizó las concentraciones de Mg, K y Ca en humor vítreo de conejos, gatos, perros y monos Rhesus, y observó la existencia de gradientes de concentración



significativos dentro del compartimento vítreo de todas las especies estudiadas, excepto de los monos. Estos gradientes de concentración, reflejan los flujos continuos de los tres cationes entre la sangre y los fluidos intraoculares.

Por todo lo expuesto, Belsey et al. (2016) sugieren que lo ideal sería extraer el humor vítreo de ambos globos oculares independientemente y analizarlos por separado, aunque a veces esto no sea posible, por ejemplo, en el caso de niños de muy corta edad. Ante la disparidad de criterios, decidimos analizar el humor vítreo extraído del globo ocular derecho de los cadáveres de los tres grupos diagnósticos.

En una primera fase de nuestro trabajo, analizamos tres métodos de preparación de muestras de fluidos biológicos para la determinación elemental utilizando la técnica de Espectrometría de masas de plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS). Por un lado, dilución con agua ultrapura, por otro, digestión en horno microondas con ácido nítrico, ácido clorhídrico y peróxido de hidrógeno, y por último, digestión en horno microondas con ácido nítrico. Los resultados de los análisis de los materiales de referencia certificados Seronorm Trace Elements Serum L-2 y Seronorm Trace Elements Whole Blood L-1 mostraron que, de los elementos analizados, el método de dilución proporcionó una buena correspondencia con los valores recomendados en los materiales de referencia para diez elementos en sangre y suero, mientras que el método de digestión sólo mostró una buena correspondencia para cuatro elementos en sangre y cinco en suero. Por lo tanto, el método de dilución parece ser el pretratamiento de elección para la determinación de múltiples elementos en fluidos biológicos por ICP-MS, mientras que el método de digestión ácida sólo es adecuado para fluidos con alta concentración de elementos.

En una segunda fase, tras comprobar que el método de preparación de muestras de elección era el de la dilución, los dos materiales de referencia diluidos con agua ultrapura, se analizaron con ICP-OES, Espectrometría óptica de emisión con plasma de acoplamiento inductivo, con el fin de comparar las dos técnicas de análisis elemental que actualmente más se aplican en el análisis elemental y comprobar si son adecuadas para el análisis de fluidos biológicos. Los resultados mostraron una buena concordancia con los valores certificados para los elementos con concentraciones del orden de mg/L y no concordancia para los elementos de concentraciones del orden de µg/L. Actualmente, las dos técnicas son aplicables al análisis de

matrices clínicas por su rápida capacidad multielemental, amplia cobertura elemental y rango dinámico, idoneidad para pequeños volúmenes de muestras y facilidad de uso. En la técnica ICP-MS, la celda de colisión/reacción permite eliminar o reducir significativamente los efectos de las interferencias poliatómicas en matrices complejas, y en la técnica ICP-OES el uso de espectrómetros de alta resolución y avanzadas técnicas de corrección de fondo que junto con la flexibilidad para elegir entre muchas posibles líneas de emisión, permite análisis sin interferencias de la mayoría de las muestras. Además, las dos técnicas son aplicables a la determinación de un gran número de elementos, más de 70 elementos pueden ser determinados por ICP-OES e ICP-MS. La espectrometría de masas por plasma de acoplamiento inductivo tiene la ventaja de conseguir unos límites de detección muy bajos, por lo que es la técnica de elección para el análisis elemental de trazas, de la misma manera, si la aplicación requiere el análisis de muchos elementos en muestras con una matriz complicada y con una sensibilidad moderada, entonces ICP-OES podría ser la mejor opción. Por lo que podemos decir, que, aunque las dos técnicas, ICP-MS e ICP-OES, son adecuadas para el análisis multielemental de matrices biológicas, ICP-MS es la técnica de elección para el análisis de trazas.

En una tercera fase, realizamos una comparación entre las dos técnicas analíticas con muestras humanas de humor vítreo. El análisis de muestras de humor vítreo por ICP-MS mostró concentraciones muy bajas para casi todos los elementos analizados, solo K, Ca y Mg mostraron mayor concentración y fueron detectados por ICP-OES. Esto es debido, por un lado, a la moderada sensibilidad de la técnica y por otro, a la consistencia y viscosidad del humor vítreo que hacen necesaria la dilución de las muestras para poder ser analizadas en los equipos de plasma. Los análisis de regresión lineal mostraron una buena correlación entre las dos técnicas de análisis estudiadas en la determinación de Mg, K y Ca en muestras de humor vítreo.

Por todo lo expuesto, podemos decir que el análisis de múltiples elementos en humor vítreo es complicado. Por un lado, la alta viscosidad de este fluido clínico requiere un pretratamiento de las muestras, y nuestros estudios han demostrado que el método de dilución requiere un pequeño volumen de muestra, es más rápido y presenta una mejor reproducibilidad que el método de digestión. Por otra parte, casi todos los elementos químicos analizados en muestras de humor vítreo mostraron concentraciones muy bajas, por lo que para su detección

y cuantificación se requiere una técnica que permita la medición de elementos traza y ultra-traza en matrices biológicas, con alta sensibilidad y bajos límites de detección. Y hoy en día esa técnica es ICP-MS.

Antes de hacer una valoración de cada uno de los elementos analizados, es necesario destacar que en la serie que hemos evaluado y en el intervalo postmortem de los casos (IPM medio: 26,7 horas), no hallamos correlaciones estadísticamente significativas entre el intervalo postmortem y las concentraciones de los biomarcadores en sangre de las tres localizaciones ni con los niveles en humor vítreo.

Una de las dificultades para comparar nuestros resultados es que los elementos analizados por nosotros no se han utilizado anteriormente como posibles marcadores para el diagnóstico de sumersión.

Con la técnica ICP-MS determinamos las concentraciones de 19 elementos químicos en muestras de sangre periférica, sangre del ventrículo derecho, sangre del ventrículo izquierdo y humor vítreo de cadáveres por diferentes causas, y muestras de agua del medio de sumersión donde se encontraron los cadáveres. Entre los elementos estudiados está el **Litio** del que no hemos encontrado trabajos donde haya sido estudiado como un marcador potencial para el diagnóstico de sumersión. Para Azparren et al. (2000) la relación agua de mar/sangre de este elemento es 37 (la concentración de Li en el agua de mar es aproximadamente de 185  $\mu\text{g/L}$  y en sangre es 5  $\mu\text{g/L}$ ) mayor que la relación de otros elementos: Na, Cl, Mg, Ca, K, Si y F, aunque las concentraciones de Li son muy bajas tanto en sangre como en agua de mar. En nuestro estudio, la concentración de Li en agua salada fue significativamente más alta que en agua dulce (153  $\mu\text{g/L}$  en AS y 13  $\mu\text{g/L}$  en AD). Los niveles de Li en sangre fueron significativamente más altos en sangre de las tres localizaciones de los casos de sumersión en agua de mar seguidos por los casos de no sumersión, y por los casos de sumersión en agua dulce. Observamos correlaciones estadísticamente significativas entre las concentraciones obtenidas en el medio de sumersión y las concentraciones de Li en SP, VD y VI. Estos hallazgos sugieren que los niveles de Li en SP, VI y VD pueden ser especialmente útiles para diagnosticar casos de SAS. Con el Análisis de Componentes Principales se observó que las mayores concentraciones de litio se encontraban ligadas a las muestras de sangre en los casos

de sumersión en agua salada y las concentraciones más bajas a las muestras de sangre de los casos de sumersión en agua dulce.

La detección de litio en muestras de humor vítreo es difícil debido a su baja concentración, a pesar de ello y como la concentración de Li en agua salada es más alta que en agua dulce, observamos que los niveles de Li en HV son más altos en casos de SAS en comparación con casos de SAD y NS. Se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los casos de SAS y los otros dos grupos diagnósticos. Los análisis de litio mostraron altos valores de las ratios de las concentraciones en el agua de sumersión y los fluidos biológicos AS/HV y AS/Sangre (SP, SVI y SVD), lo que sugiere que los niveles de Li en HV pueden ser útiles para diagnosticar casos de SAS. Los resultados obtenidos para las muestras de humor vítreo son coincidentes con los resultados obtenidos para muestras de sangre, por lo tanto, el litio puede ser un marcador útil en casos de sumersión, pero se debe usar junto a otros marcadores debido a su baja concentración.

No hemos encontrado estudios de boro como marcador químico para las muertes por sumersión. Para Azparren et al. (2000) la relación entre la concentración de **Boro** en agua de mar y en sangre es 114 (4,45 mg/L en agua salada y 0,039 mg/L en sangre), por lo que puede ser un marcador útil para el diagnóstico de SAS. En nuestros análisis hemos obtenido niveles altos de boro en sangre en los casos de SAS y en el agua de mar, diferencias estadísticamente significativas en casos de SAS en las tres localizaciones sanguíneas y correlaciones estadísticamente significativas entre el medio de sumersión y las concentraciones de B en sangre. Con el Análisis de Componentes Principales se observó que las mayores concentraciones de boro se encontraban ligadas a las muestras de sangre de VI en los casos de sumersión en agua salada y a su vez, todas las muestras de sangre de este grupo diagnóstico presentaban niveles de boro mayores que los otros grupos. Todo esto demuestra la utilidad del análisis de B en SP, VI y VD para el diagnóstico de SAS.

Los análisis de humor vítreo mostraron altos niveles de B en los casos de sumersión en agua de mar, diferencias estadísticamente significativas en los casos de SAS en comparación con SAD y NS. Los altos valores de las ratios AS/HV (79) y AS/Sangre ( $\approx 30$ ) y altos niveles de B en muestras de humor vítreo en casos de SAS en comparación con casos de NS y SAD,

demuestran que B podría ser un buen marcador para el diagnóstico de sumersión en agua de mar.

**Magnesio y Calcio** son elementos esenciales en los sistemas biológicos y están presentes en las células de todos los organismos. Se encuentran en concentraciones abundantes en agua marina y en sangre humana, por lo que se han estudiado como posibles marcadores para el diagnóstico de la muerte por sumersión. En este sentido, Zhu et al. (2003b, 2005) y Pérez Carceles et al. (2011) afirmaron que las concentraciones de Mg y Ca eran significativamente más altas en sangre de ambos ventrículos y sangre periférica de sujetos ahogados en agua de mar en comparación con sujetos fallecidos por otras causas de muerte. Además, en casos de ahogamiento en agua de mar, encontraron mayores niveles de Mg y Ca en sangre del VI, sin embargo, en la sumersión en agua dulce se obtuvieron mayores concentraciones de Ca en sangre periférica que en la sangre de ambos ventrículos y mayor concentración de Mg en sangre del VD que del VI. Estos hallazgos se explicaban porque existe una relación de aproximadamente 100:2 entre la concentración de magnesio en agua salada y agua dulce, pudiendo producir una transferencia de este elemento desde el agua de mar al VI. Sin embargo, en la sumersión en agua dulce ocurre que la sangre del VI está más diluida que la sangre del VD, demostrando hemodilución. Por lo tanto, estos resultados les permitieron señalar que, la diferencia en las concentraciones de magnesio entre la sangre de los dos ventrículos podía proporcionar información útil para el diagnóstico de la muerte por sumersión en agua dulce. En nuestro estudio, obtuvimos resultados similares para Ca y Mg en SAS y Mg en SAD.

Por otro lado, para Azparren et al. el Mg puede ser también útil para diagnosticar SAS, ya que la relación agua de mar/sangre es moderadamente alta: 29,3 (concentración de Mg en agua de mar es 1290 mg/L y concentración de Mg en suero de 18,5-25,8 mg/L), aunque menor que la del boro, lo que puede presentar una menor sensibilidad en la detección de aspiraciones de agua salada. Para el Ca la relación agua de mar/suero es baja y por lo tanto su utilización como marcador para diagnosticar casos de SAS debe realizarse con más precaución. En nuestro estudio los niveles de Mg y Ca en agua salada son mucho más altos que en agua dulce y son similares a los de Azparren. Observamos diferencias estadísticamente significativas en los casos de SAS en todas las localizaciones sanguíneas en comparación con los valores observados tras las muertes por SAD y NS. Hallamos correlaciones estadísticamente

significativas entre las concentraciones de Mg y Ca en el medio de sumersión y sus niveles en sangre de las tres localizaciones en los sujetos fallecidos por sumersión. Con el Análisis de Componentes Principales se observó que, al igual que con el boro, las mayores concentraciones de Ca y Mg se encontraban ligadas a las muestras de sangre de los casos de sumersión en agua salada y a su vez, todas las muestras de sangre de este grupo diagnóstico presentaban niveles de Ca y Mg mayores que en los otros grupos. Estos hallazgos demuestran la utilidad del análisis de Mg y Ca en sangre para el diagnóstico de SAS. El análisis de la diferencia de concentración de Mg en la sangre de los dos ventrículos ha sido realizado por algunos investigadores y se ha utilizado como marcador para el diagnóstico de la muerte por sumersión.

El análisis de Mg en muestras de humor vítreo mostró en los casos de SAS una concentración mayor que en los casos de SAD y NS y diferencias estadísticamente significativas entre los tres grupos diagnósticos (SAS-SAD-NS) y entre SAS y NS cuando se compararon dos grupos. Las altas concentraciones de Mg en agua de mar en comparación con agua dulce, así como la comprobación de las ratios AS/HV con valor de 50,5 y AS/sangre (SP, VI, VD) con valor en torno a 20, sugieren que los niveles de Mg en HV, al igual que en sangre, pueden ser especialmente útiles para el diagnóstico de la muerte por SAS. Por el contrario, el análisis de Ca en muestras de humor vítreo no mostró mayores concentraciones en muestras de SAS frente a los otros grupos diagnósticos y solo se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los casos de SAD y NS. Además, las ratios entre las concentraciones de Ca en agua de mar y en las muestras analizadas, tanto humor vítreo como sangre, mostraron valores bajos. Por lo tanto, podríamos decir que el análisis de Ca en humor vítreo no debería usarse como prueba complementaria para el diagnóstico de la muerte por sumersión en agua de mar.

Para Takahashi et al. (2010) el **Bromo** en sangre podría ser un potencial marcador de la muerte por sumersión en agua de mar, ya que los niveles de bromo en agua de mar son muy superiores a los de agua de río, agua de la red o a los valores normales en sangre de individuos sanos. Además, estos autores encontraron mayores concentraciones de bromo en sangre ventricular de individuos ahogados en agua de mar en comparación con las concentraciones de Br en sangre de individuos fallecidos por muerte natural y ahogados en agua dulce. Para Azparren et al. (2000), el Br puede ser útil para el diagnóstico de SAS, ya que la relación agua

de mar/suero es moderadamente alta: 17,2, aunque inferior a la de Sr, B, Mg y Li. En nuestro estudio encontramos niveles de Br similares en la sangre en todas las causas de muerte, entre 10 y 22 mg/L, pero mayores concentraciones en sangre VI en los casos de SAS. Se observaron diferencias estadísticamente significativas en los casos de SAS en sangre VI en comparación con los valores observados tras las muertes por SAD y por NS. Con el Análisis de Componentes Principales observamos que, al igual que ocurre con el B, Ca y Mg, las mayores concentraciones de Br se encuentran ligadas a las muestras de sangre de VI en los casos de sumersión en agua salada. Por lo tanto, los niveles de Br en sangre podrían ser especialmente útiles para diagnosticar SAS.

Las concentraciones de Br en humor vítreo fueron más bajas que en sangre y los mayores niveles de Br los presentaron las muestras del grupo de SAS, encontrando diferencias significativas entre los tres grupos diagnósticos. Observamos diferencias estadísticamente significativas en el humor vítreo de los tres grupos diagnósticos (SAS-SAD-NS) y entre SAS y SAD. Las ratios entre las concentraciones de Br en agua de mar y en las muestras de humor vítreo analizadas, mostraron valores más altos que los obtenidos para las muestras de sangre, aunque inferiores a las ratios obtenidos para Sr, B y Mg entre agua de mar y humor vítreo. Por todo lo expuesto, el análisis de Br en humor vítreo se podría usar como prueba complementaria para el diagnóstico de la muerte por sumersión en agua de mar.

Uno de los parámetros más estudiados ha sido el **Estroncio**, cuya relación agua de mar/sangre (650: 1) lo convierte en un marcador potencial para el diagnóstico de sumersión. Para Pérez-Cárceles et al. (2011) los niveles séricos de Sr fueron confirmados como el mejor parámetro para el diagnóstico de SAS y la determinación conjunta de Sr y otros marcadores bioquímicos, especialmente Fe, podrían aumentar la posibilidad de un diagnóstico correcto en el caso de SAD. El grupo de investigación más activo en este marcador, dirigido por Azparren, estableció un conjunto de valores límite de Sr para el diagnóstico de SAS, niveles de Sr en el ventrículo izquierdo y diferencias entre los niveles en los ventrículos izquierdo y derecho. Pérez Cárceles et al. (2011) obtuvieron valores mucho más altos que los valores de Azparren lo que podría ser debido a las diferentes concentraciones de Sr en aguas de diferentes localizaciones geográficas de España. En nuestro estudio hemos encontrado que los niveles de estroncio en la sangre de los individuos fallecidos por sumersión son mayores en todas las localizaciones sanguíneas estudiadas, que los niveles observados tras la muerte

por otras causas. Además, dado que el agua de mar contiene concentraciones mucho más altas de estroncio que el agua dulce, las concentraciones sanguíneas de Sr resultantes de SAS son significativamente más altas que las de SAD. También encontramos diferencias estadísticamente significativas en los casos de SAS en todas las localizaciones sanguíneas y correlaciones estadísticamente significativas con las concentraciones del medio de sumersión. Con el Análisis de Componentes Principales se observó que, al igual que con B, Ca y Mg las mayores concentraciones de Sr se encontraban ligadas a las muestras de sangre de VI en los casos de sumersión en agua salada y a su vez, todas las muestras de sangre de este grupo diagnóstico presentaban niveles de Sr mayores que los otros grupos. Estos hallazgos confirman que los niveles de Sr en sangre son especialmente útiles para diagnosticar SAS.

En cuanto al análisis del humor vítreo encontramos que los niveles de estroncio tras la muerte por sumersión son mayores que los niveles observados en las muertes por otras causas. Además, dado que el agua de mar contiene concentraciones mucho más altas de estroncio que el agua dulce, las concentraciones de Sr en HV tras SAS son significativamente más altas que las resultantes de SAD. También hallamos diferencias estadísticamente significativas entre los casos de SAS y SAD y entre los casos de SAS y NS y no se encontraron diferencias cuando se comparaban los casos de SAD y NS. La ratio entre las concentraciones de Sr en agua de mar y las muestras de humor vítreo analizadas, es la mayor de todas las ratios calculadas en este estudio (200,4) superior a las ratios calculadas para las muestras de sangre (115-124), debido a la gran diferencia de concentraciones de Sr que existe en el agua de mar y el humor vítreo. Todo ello, hace que el Sr en humor vítreo sea el marcador de elección para el diagnóstico de las muertes por sumersión en agua salada.

El **Hierro** es un elemento esencial, en suero y sangre se ha estudiado como un marcador potencial para el diagnóstico de sumersión. De La Grandmaison et al. (2006) encontraron mayores concentraciones de hierro en el ventrículo derecho en casos de sumersión en agua dulce y para Pérez-Cárceles et al. (2011) la hemodilución es evidente a partir de niveles significativamente más altos de Fe en VD que en VI en casos de SAS. En nuestro estudio, las concentraciones de hierro en el ventrículo derecho en los casos de SAS son claramente mayores que en el ventrículo izquierdo, un hallazgo que coincide con el de Pérez-Cárceles et al. (2011) y demuestra hemodilución por aspiración de agua. Esto no ocurre en los casos de sumersión en agua dulce, donde las concentraciones de Fe que encontramos en agua dulce



fueron superiores a los valores correspondientes en agua salada, lo que pudo hacer que aumentase su concentración en VI. Por otro lado, aunque los niveles de Fe en las aguas fueron inferiores a los encontrados en sangre, se obtuvieron niveles de Fe en la sangre de las tres localizaciones de los casos de SAD más altos que los de SAS. Estos hallazgos sugirieron que los niveles de Fe en sangre periférica, de ventrículo izquierdo y de ventrículo derecho pueden ser especialmente útiles para diagnosticar SAD.

Los análisis realizados en las muestras de humor vítreo, mostraron concentraciones de hierro considerablemente más bajas que las de las muestras de sangre. Las mayores concentraciones de Fe en los humores vítreos se obtuvieron en los casos de SAS, seguidos de SAD y NS. Observamos diferencias estadísticamente significativas entre los tres grupos diagnósticos siendo significativamente superiores en los casos de sumersión frente a otras causas de muerte. Aunque la ratio entre las concentraciones de Fe en agua de mar y en las muestras de humor vítreo analizadas es inferior al de otros elementos, puede ser un marcador para diferenciar entre muertes por sumersión de otras causas.

En los últimos 60 años se han propuesto numerosos métodos químicos para la determinación del intervalo postmortem. Muchos de estos métodos fueron revisados por Coe en 1993 y posteriormente en 2004 por Madea, y de todos ellos, el método más ampliamente estudiado es el aumento postmortem de **potasio** en humor vítreo, descrito por primera vez por Sturner en 1963, que estableció la primera fórmula para determinar el intervalo postmortem en función de la concentración de potasio en humor vítreo. Se sabe que después de la muerte, las membranas celulares se vuelven permeables y el potasio comienza inmediatamente a difundirse desde el interior de las células de la retina hacia el vítreo, dando como resultado niveles de potasio que aumentan con el tiempo. Posteriormente, otros investigadores han propuesto diferentes fórmulas para el cálculo del IPM a partir de la determinación de los niveles de K en HV, como Madea et al. (1989), James et al. (1997) y Muñoz et al. (2001).

El potasio es un elemento esencial en los sistemas biológicos. Los análisis realizados a las muestras de sangre dan unos valores medios que van desde 1267 mg/L a 1748 mg/L, muy superiores a los de las aguas, 398 mg/L en agua salada y 69 mg/L en agua dulce. Estos datos coinciden con los valores de referencia indicados por los profesores Repetto et al. (2007)

(concentración de potasio normal en sangre 1259 a 2103 mg/L) y Azparren et al. (2000) (concentración de potasio en agua de mar 399 mg/L). Los resultados de los análisis realizados, no mostraron diferencias considerables en los niveles de K de los tres grupos diagnósticos, lo que sí se observan son mayores concentraciones de K en la sangre del ventrículo derecho en cada uno de los tres grupos. No observamos diferencias estadísticamente significativas entre los tres grupos diagnósticos ni correlaciones entre el medio de sumersión y las concentraciones de K en SP, VI y VD en los casos de sumersión. Con el Análisis de Componentes Principales se observó que las mayores concentraciones de K se encontraban ligadas a las muestras de sangre de VD en los casos de sumersión en agua salada. En cuanto a las muestras de humor vítreo, se detectaron menores concentraciones de K que en sangre en cualquiera de los tres grupos diagnósticos, de 401 a 498 mg/L, los mayores niveles en SAS, seguido de SAD y NS. La ratio entre las concentraciones de K en agua de mar y en las muestras de humor vítreo y sangre es muy bajo, prácticamente cero. Por todo ello, y aunque los perfiles elementales nos indiquen que el K es el elemento más abundante en cada una de las muestras analizadas, no se puede considerar un marcador para el diagnóstico de la muerte por sumersión en agua salada.

El **Cinc** está considerado como un elemento esencial y desempeña un amplio papel en el metabolismo de los seres humanos. Los valores habituales en sangre a los que hacen referencia los profesores Reppeto et al. (2007) están entre 4 y 7,6 mg/L, datos que coinciden con los obtenidos en nuestros análisis en sangre periférica y sangre del ventrículo izquierdo para los tres grupos diagnósticos, observándose mayores niveles de Zn en la sangre del ventrículo derecho en los tres grupos diagnósticos, de 8,7 a 12,9 mg/L, correspondiendo las mayores concentraciones a las muestras del grupo de SAS, seguido de SAD y NS. Estos resultados se aprecian claramente en el análisis de Componentes Principales, en los que el Zn se encuentra dentro del grupo de elementos vinculados a las muestras de sangre de VD del grupo SAS seguidos de las muestras de sangre de ventrículo derecho de los otros dos grupos diagnósticos. Diferencias estadísticamente significativas sólo se encontraron en sangre periférica entre SAS-SAD y entre SAD-NS, tampoco se observaron correlaciones entre concentraciones de Zn del medio de sumersión y las muestras de sangre de los individuos ahogados. Los niveles de Zn encontrados en las aguas fueron muy bajos (0,1 mg/L de Zn en agua de mar y 0,07 mg/L en agua dulce), por lo que las ratios AS/Sangre fueron prácticamente cero. En las muestras de humor vítreo, las concentraciones de Zn fueron más

bajas que las de sangre, menores de 1 mg/L (0,73 mg/L en SAS, 0,66 mg/L en SAD y 0,67 mg/L en NS). Todos estos datos nos llevan a sugerir que el Zn no es un buen marcador para el diagnóstico de la muerte por sumersión en agua salada tanto en muestras de sangre como en muestras de humor vítreo, aunque sea el 6° elemento más concentrado, de los 19 elementos estudiados, en las muestras de sangre analizadas y el 5° en las de humor vítreo.

El **Cobre** fue uno de los primeros oligoelementos relacionados con los sistemas biológicos, por su participación en reacciones redox de la cadena respiratoria. Los valores de referencia en sangre, entre 0,8 mg/L y 1,6 mg/L, fueron muy similares a los que nosotros obtuvimos en sangre periférica y sangre del ventrículo izquierdo de los tres grupos diagnósticos, entre 1 y 1,3 mg/L, e inferiores a las concentraciones de Cu en sangre del ventrículo derecho de todos los cadáveres analizados (2-2,2 mg/L), correspondiendo las mayores concentraciones a las muestras del grupo de SAS, seguido de SAD y NS. El análisis de Componentes Principales corrobora estos resultados en los que el Cu se encuentra dentro del grupo de elementos vinculados a las muestras de sangre de VD del grupo SAS seguidos de las muestras SAD-VD y NS-VD. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los tres grupos diagnósticos ni correlaciones entre las concentraciones de Cu en las aguas y en la sangre de los fallecidos por sumersión. Por otro lado, el estudio de las ratios entre agua de mar y sangre no nos aporta ningún dato de interés debido a los bajos niveles de Cu en las aguas, 5,3 µg/L en agua de mar y 31,4 µg/L en agua dulce. Los análisis de las muestras de humor vítreo analizadas, mostraron muy bajas concentraciones de Cu, entre 13 µg/L y 24 µg/L. Por todo ello, podemos afirmar, que el Cu no sería un buen marcador para el diagnóstico de los casos de SAS.

El **Aluminio** es el metal más abundante en la corteza terrestre. Hasta hace poco tiempo se ha encontrado, fundamentalmente, bajo especies químicas no disponibles para el hombre y la mayoría de las especies. Sin embargo, el dramático incremento de su concentración con la lluvia ácida ha supuesto su aparición en la mayoría de los ecosistemas biológicos. No se conoce el papel fisiológico del aluminio. Los valores de referencia que hemos encontrado en sangre son para Panhwar et al. (2015) menores a 198 µg/L y nuestros análisis han mostrado unos valores que van desde 46 µg/L hasta 223 µg/L, este último en la sangre del ventrículo derecho de los fallecidos por sumersión en agua salada. Las concentraciones más altas de Al las muestran este grupo diagnóstico en las tres ubicaciones sanguíneas. El análisis de

Componentes Principales agrupa a Al junto a Sr, B, Br, Mg, Ni y Ba que presentan mayores concentraciones en el grupo de SAS. Las aguas de sumersión analizadas muestran casi idénticas concentraciones de Al y más bajas que en sangre (36 µg/L). El análisis estadístico sí muestra diferencias significativas en la sangre de las tres localizaciones cuando se comparan los tres grupos diagnósticos y no existen correlaciones entre las concentraciones de Al en el medio de sumersión y en la sangre de los individuos ahogados. En las muestras de humor vítreo las concentraciones de Al obtenidas fueron más bajas que en sangre, entre 20 µg/L y 40 µg/L. Todos los análisis realizados muestran que el Al en sangre se podría utilizar como marcador de la muerte por sumersión en agua salada si las concentraciones fuesen más altas, no siendo así para humor vítreo por las bajísimas concentraciones de Al que presenta.

El **Selenio** es un oligoelemento esencial en el hombre. Los niveles de referencia en suero entre 76 µg/L y 140 µg/L (Repetto) y nuestros análisis han mostrado unos valores que van desde 129 µg/L hasta 201 µg/L, este último en la sangre del ventrículo derecho de los fallecidos por sumersión en agua salada, no observando grandes diferencias en las concentraciones de Se en sangre de los tres grupos. Lo que sí se destaca es la mayor concentración de Se en la sangre del ventrículo derecho de cada uno de los grupos diagnósticos. Las aguas de sumersión analizadas prácticamente no contienen selenio, al igual que las muestras de humor vítreo con valores de Se inferiores a 14 µg/L. Por todo ello, el selenio en nuestra serie no aporta información importante para el diagnóstico de sumersión.

Los valores de **Manganeso** obtenidos en los análisis realizados están entre 13 µg/L y 52 µg/L en las muestras de sangre periférica y sangre del ventrículo izquierdo, mientras que los niveles de Mn en la sangre del ventrículo derecho son superiores en los tres grupos, 183 µg/L en SAS-VD, 176 µg/L en SAD-VD y 102 µg/L en NS-VD. Entre 1 µg/L y 8 µg/L de Mn se obtuvieron en los análisis de Mn en las muestras de humor vítreo y las concentraciones de Mn en agua de mar y en agua dulce fueron respectivamente 26 y 178 µg/L. No hallamos diferencias estadísticamente significativas entre las concentraciones de Mn en sumersión y otras causas de muerte, ni correlación significativa entre las concentraciones de Mn en agua y las que detectamos en sangre y humor vítreo. Además, encontramos bajas concentraciones de Mn en humor vítreo, la ratio entre los niveles en agua de mar y estas muestras es de 18, pero este valor no es significativo y el Mn no se puede considerar un marcador para el diagnóstico de sumersión.

Aunque los resultados de los análisis mostraron una mayor concentración de **Bario** en agua dulce, 294 µg/L, que, en agua salada, 25 µg/L, los niveles de Ba en la sangre de los cadáveres del grupo de SAS fueron superiores a los de los otros grupos, destacando las concentraciones de Ba en la sangre del ventrículo derecho que son significativamente superiores en los casos de sumersión frente a otras causas de muerte. No hallamos correlaciones estadísticamente significativas entre las concentraciones en el medio de sumersión y la sangre. En humor vítreo de los tres grupos diagnósticos, las concentraciones de Ba obtenidas fueron prácticamente iguales e inferiores a las de sangre. Estos datos nos hacen comprobar que el Ba no podría ser considerado un elemento complementario para diagnosticar la sumersión.

El **Cadmio** se ha convertido en uno de los metales con mayor capacidad tóxica, debido a su gran utilización en la industria. A pesar de su potencial toxicidad, no puede ser excluida la posibilidad de su esencialidad (Smith, 1984). Los niveles de cadmio obtenidos en nuestros análisis son prácticamente indetectables en las muestras de humor vítreo y en las aguas de sumersión, mientras que en las muestras de sangre las concentraciones de Cd fueron mayores, destacando los niveles de sangre de ventrículo derecho. No existen diferencias estadísticamente significativas entre los niveles en sangre entre los casos de sumersión y otras causas de muerte y tampoco correlaciones significativas entre los niveles en el agua de sumersión y sus niveles en sangre y humor vítreo. Estos datos nos hacen comprobar que la determinación de Cd no podría ser considerada una técnica complementaria adecuada para identificar la muerte por sumersión.

En cuanto al resto de elementos estudiados, conocemos que el **Molibdeno** es un componente esencial de varias enzimas de animales, plantas y bacterias, pero su esencialidad ha sido difícil de reconocer en la salud humana (Anke et al, 1985); el **Plomo** es el metal tóxico más ampliamente distribuido en el medioambiente y en prácticamente todos los sistemas biológicos y su esencialidad ha sido investigada por varios autores, sin embargo, tiene mayor importancia su aspecto tóxico ya que la dosis necesaria para alcanzar el nivel esencial es muy pequeña (EPA, 1986, 1989; Landrigan, 1989; OMS, 1977); el **Níquel** es un mineral requerido por el organismo en cantidades ínfimas y tiene la condición de esencial, y del **Arsénico** se conoce que es extremadamente tóxico y su esencialidad es discutida. No se han encontrado trabajos en los que se hayan estudiado estos elementos como potenciales marcadores para el diagnóstico de sumersión. Nuestros análisis han demostrado muy bajos niveles en sangre y

humor vítreo en todas las causas de muerte y muy bajas concentraciones en el medio de sumersión, por lo que podemos decir que en nuestra serie Mo, As, Pb y Ni no tienen interés como marcadores para identificar la muerte por sumersión.

Los resultados del análisis de componentes principales que realizamos a las muestras de sangre revelaron diferentes patrones de concentraciones en la sangre de las tres localizaciones de los elementos químicos en sumersión en agua salada que difieren con los niveles y marcadores en sumersión en agua dulce y otras causas de muerte. El análisis de componentes principales resulta muy clarificador y simplemente la observación visual evidencia la existencia de un grupo de muestras formado por la sangre de las tres localizaciones de los casos de sumersión en agua salada que se localizan en la misma zona separadas de otro grupo formado por las muestras de sangre de ventrículo derecho de los otros dos grupos diagnósticos y de un tercer grupo formado por las muestras de sangre restante. En cuanto a los elementos químicos, Li, Ca, B, Br, Sr, Mg, Ba, Al y Ni se agrupan en la misma zona que las muestras de sangre de sumersión en agua salada y separados del resto de elementos que se agrupan en la zona donde se encuentran las muestras de sangre de ventrículo derecho.

En el análisis de las curvas ROC, la mayor capacidad para discriminar entre un caso de una muerte por sumersión frente a una muerte por otra causa se encuentra en las concentraciones de litio, estroncio y magnesio en sangre de las tres localizaciones, en las concentraciones de bario y calcio en la sangre de ambos ventrículos y en las concentraciones de boro y bromo en la sangre del ventrículo izquierdo, todos con áreas bajo la curva mayores de 0,70. Cuando estas variables se utilizaron en el análisis discriminante, la determinación conjunta de todos estos elementos permitió una identificación correcta del 74% de los casos de sumersión y del 76,1% del total de los casos, no mejorando significativamente la correcta clasificación de los casos al eliminar alguno de los parámetros. De forma individual, los porcentajes de clasificación correcta fueron más bajos, así las determinaciones de Li, Sr, Mg y Ca en las tres localizaciones sanguíneas permitieron la clasificación correcta de entre el 56% y el 87% (determinación de litio en las tres localizaciones sanguíneas) de los casos de sumersión y entre el 63% y el 73% del total de los casos.

Si analizamos los casos de sumersión en agua salada de manera independiente, obtenemos que en el análisis de las curvas ROC los parámetros con mayor capacidad para discriminar entre la muerte por sumersión en agua salada frente a otras causas de muerte coinciden con los obtenidos para los casos de sumersión y además se añaden la determinación de boro en ventrículo derecho y la de calcio en sangre periférica, todos con áreas bajo la curva mayores de 0,70.

Al utilizar estas variables en el análisis discriminante obtenemos que la determinación conjunta de litio, estroncio, magnesio y calcio en las tres localizaciones sanguíneas y la determinación de boro en la sangre de los dos ventrículos, permitió una correcta identificación en el 83% de los casos de sumersión en agua salada y en el 87% del total de los casos. Estos porcentajes empeoraban al añadir la determinación de bromo en la sangre de ventrículo izquierdo. De forma individual, las determinaciones de estroncio en la sangre de las tres localizaciones fueron los parámetros que mejor clasificaron los casos de sumersión en agua salada, un 71%. Estos hallazgos junto con los resultados obtenidos en las demás pruebas realizadas, sugieren que las determinaciones de Li, B, Sr, Mg y Ca pueden ser especialmente útiles para el diagnóstico de las muertes por sumersión en agua de mar.

En el análisis de las curvas ROC de los casos de sumersión en agua dulce, aparecen las concentraciones de Fe y de Zn con capacidad discriminante, que no la mostraban en los casos de sumersión en agua salada, además de otros marcadores como Sr, Ba y Mg que también tienen capacidad discriminante en los casos de sumersión en agua salada.

En el análisis de las curvas ROC en humor vítreo observamos que la mayor capacidad para discriminar entre un caso de una muerte por sumersión frente a una muerte por otra causa se encuentra en las concentraciones de estroncio, selenio y hierro, con áreas bajo la curva mayores de 0,70. Al analizar solamente los casos de sumersión en agua salada, también el litio presentaba un área bajo la curva mayor de 0,7. El análisis de las curvas ROC en humor vítreo no mostró capacidad discriminante para algunos elementos que aparecen como potenciales marcadores de sumersión en otros análisis estadísticos. En el análisis discriminante, la mayor capacidad discriminante se obtuvo con la determinación conjunta de Li, B, Se, Sr, Ca y Br en humor vítreo, que permitió una identificación correcta del 89,5% de los casos de sumersión en agua salada y del 84,2% del total de los casos, no mejorando significativamente la correcta

clasificación de los casos al añadir la determinación de hierro. Resultados similares se obtuvieron en el análisis discriminante realizado tomando todos los casos de sumersión permitiendo una clasificación correcta del 85% de los casos de sumersión con la determinación conjunta de Li, B, Se, Sr y Ca en humor vítreo. De forma individual, la determinación de selenio en humor vítreo fue el parámetro que mejor clasificó los casos de sumersión en agua salada (58%) y el total de los casos de sumersión (61%). El análisis discriminante de humor vítreo sí es clarificador y sugieren que los niveles de Li, B, Sr, Ca y Br en humor vítreo pueden ser especialmente útiles para el diagnóstico de las muertes por sumersión. En este análisis estadístico también se identifica el selenio como posible marcador de sumersión, aunque en otras pruebas realizadas se ha comprobado que el selenio en nuestra serie no aporta información importante para el diagnóstico de sumersión.

En un intento de ordenar y estructurar todos los datos obtenidos en los análisis realizados a las muestras de sangre y de humor vítreo de los cadáveres seleccionados, hemos elaborado una clasificación de los elementos analizados, en base a la valoración que asignamos a distintos parámetros que evaluamos en nuestro estudio, y que consideramos fundamentales para el diagnóstico de muerte por sumersión en agua salada. En sangre los parámetros que se han valorado han sido (**Tablas 47 y 48**):

1. Concentración del elemento analizado, es decir, orden de magnitud. Si la concentración del analito es alta, los resultados de los análisis serán más exactos y fiables, con menores desviaciones y mayores posibilidades de ser un buen marcador para el diagnóstico de SAS. En este sentido, el criterio adoptado ha sido, asignar valor 1 a las concentraciones de nivel  $\mu\text{g/L}$ , es decir, inferiores a 1  $\text{mg/L}$ ; asignar valor 3 a las concentraciones de nivel  $\text{mg/L}$ , es decir iguales o superiores a 1  $\text{mg/L}$ ; y un valor intermedio de 2 cuando las concentraciones de las tres localizaciones sanguíneas unas están en el orden de ppb y otras en ppm.
2. Concentraciones mayores del analito en las muestras de sangre de los casos de SAS, comparadas con los otros dos grupos diagnósticos. Se le asigna valor 3 cuando tanto la sangre periférica, como la ventricular tienen concentraciones más altas que el resto de muestras de sangre de los otros dos grupos. Se le asigna el valor de 2, cuando sólo la sangre de dos localizaciones del grupo SAS tiene mayores concentraciones que el resto, y el valor 1 cuando la sangre de una sola localización es más elevada.



3. Concentraciones del elemento en agua de mar: En este caso, es importante que exista una alta concentración en el medio de sumersión para así penetrar en la circulación sanguínea incrementando los niveles del analito en sangre y diferenciándose así de los individuos fallecidos por otras causas distintas a la sumersión. El criterio asignado, ha sido igual que para las concentraciones de los marcadores en sangre, *1* para concentraciones del orden de ppb, es decir, por debajo de 1 ppm, y *3* para los elementos que presentan concentraciones iguales o superiores a 1 ppm.
  
4. Ratio entre la concentración del elemento en agua de mar y la concentración en sangre (media de las ratios de la sangre de las tres localizaciones). Los valores más altos se han asignado a las mayores ratios:
  - Ratio menor que 1: valor asignado *0*
  - Ratio entre 1 y 5: valor asignado *1*
  - Ratio entre 6 y 20: valor asignado *2*
  - Ratio entre 21 y 50: valor asignado *3*
  - Ratio entre 51 y 100: valor asignado *4*
  - Ratio mayor que 100: valor asignado *5*
  
5. La existencia de diferencias estadísticamente significativas entre los tres grupos diagnósticos también se ha valorado asignando el valor de *3* para aquellos elementos en los que la sangre de las tres localizaciones muestra diferencias estadísticamente significativas entre los tres grupos diagnósticos, valor *2* cuando sólo hay diferencias en la sangre de dos localizaciones y valor *1* solo diferencias en la sangre de una localización.

En las **Tablas 47 y 48** mostramos los parámetros evaluados y las puntuaciones asignadas.

Parámetros	Valor máximo	Valor intermedio	Valor mínimo
Concentración sangre	3	2	1
Mayor concentración en SAS	3	2	1
Concentración agua de mar	3		1
Diferencias estadísticamente significativas	3	2	1
Ratio AS/sangre	5 (R>100)	1 (R entre 1 y 5)	0 (R<1)
		2 (R entre 6 y 20)	
		3 (R entre 21 y 50)	
		4 (R entre 51 y 100)	

**Tabla 47.** Valor asignado a los parámetros analizados en muestras de sangre

Elemento	Concentrac. Sangre	Mayor concentrac. sangre SAS	Concentrac. agua mar	Ratio agua mar/sangre	Diferencias estadístic. significativas	Total
Sr	2	3	3	5	3	16
Mg	3	3	3	3	3	15
B	1	3	3	3	3	13
Ca	3	3	3	1	3	13
Br	3	1	3	2	1	10
Li	1	3	1	2	3	10
Al	1	3	1	0	3	8
Ba	1	3	1	1	1	7
K	3	1	3	0	0	7
Zn	3	1	1	0	1	6
Cu	3	1	1	0	0	5
Fe	3	0	1	0	1	5
Se	1	1	1	0	0	3
Mn	1	1	1	1	0	3
Cd	1	0	0	0	0	1

**Tabla 48.** Valoración final de los elementos analizados en las muestras de sangre.

En Humor Vítreo los parámetros que hemos valorado han sido (**Tablas 49 y 50**):

1. Concentración del elemento analizado, asignándole los mismos valores que para las muestras de sangre
2. Concentraciones mayores del analito en las muestras de humor vítreo de los casos de SAS, comparadas con los otros dos grupos diagnósticos. Se le asigna valor 3 cuando las muestras de HV del grupo SAS tienen las concentraciones más altas que las muestras de los otros dos grupos, y el valor de 0 cuando son menores.

3. Concentraciones del elemento en agua de mar, asignándole los mismos valores que para las muestras de sangre.
4. Ratio entre la concentración del elemento en agua de mar y la concentración en humor vítreo, asignándole los mismos valores que para las muestras de sangre.
5. La existencia de diferencias estadísticamente significativas entre los tres grupos diagnósticos se valora asignando el valor de 3 para aquellos elementos en los que las muestras de humor vítreo analizadas muestran diferencias estadísticamente significativas entre los tres grupos diagnósticos, valor 0 cuando no hay diferencias.

Parámetros	Valor máximo	Valor intermedio	Valor mínimo
Concentración humor vítreo	3	2	1
Mayor concentración en SAS	3		0
Concentración agua de mar	3	2	1
Diferencias estadísticamente significativas	3		0
Ratio AS/humor vítreo	5 (R>100)	1 (R entre 1 y 5) 2 (R entre 6 y 20) 3 (R entre 21 y 50) 4 (R entre 51 y 100)	0 (R<1)

**Tabla 49.** Valor asignado a los parámetros analizados en muestras de humor vítreo.

Elemento	Concentrac. Humor vítreo	Mayor concentrac. HV SAS	Concentrac. agua mar	Ratio agua mar/HV	Diferencias estadístic. significativas	Total
Mg	3	3	3	4	3	16
Sr	1	3	3	5	3	15
Br	3	3	3	2	3	14
B	1	3	3	4	3	14
K	3	3	3	0	0	9
Fe	1	3	1	1	3	9
Ca	3	0	3	2	0	8
Li	1	0	1	2	3	7
Se	1	0	1	1	3	6
Ba	1	3	1	1	0	6
Zn	1	3	1	0	0	5
Cu	1	3	1	0	0	5
Mn	1	0	1	2	0	4
Al	1	0	1	0	0	2
Cd	0	0	0	0	0	0

**Tabla 50.** Valoración final de los elementos analizados en las muestras de humor vítreo.

Como se observa en la **Tabla 48**, el mejor marcador de la muerte por sumersión en agua salada para las muestras de sangre es el estroncio, seguido del magnesio y en tercer lugar el calcio y el boro. Bromo y litio figuran en cuarto lugar. El litio, aunque presenta todas las características para ser un buen marcador de SAS, su baja concentración dificulta su posible utilidad. La **Tabla 50** muestra como mejor marcador en las muestras de humor vítreo al magnesio, seguido de estroncio y en tercer lugar el bromo y el boro. En quinto lugar, figura el potasio y el hierro, elementos que no aparecían en los primeros lugares en la tabla de valores de sangre, y, por el contrario, litio y calcio tienen una inferior calificación en las muestras de humor vítreo.

Atendiendo a una posible clasificación general tendríamos en primer lugar el Sr en sangre y el Mg en humor vítreo con la misma valoración. En segundo lugar, el Mg en sangre y el Sr en HV. En tercer lugar, el Br y el B en humor vítreo. En cuarto puesto están boro y calcio en sangre, en quinto Br y Li en sangre y en sexto K y Fe en humor vítreo.

Evidentemente, los parámetros bioquímicos son una buena herramienta complementaria a la realización de la autopsia, que puede ayudar en el diagnóstico de la causa de muerte por sumersión.

## **6. CONCLUSIONES**





1.- Los análisis para la identificación y cuantificación post-mortem de los 19 elementos determinados en sangre y humor vítreo son laboriosos debido a la complejidad de los fluidos biológicos estudiados, por lo que es necesario realizar un pretratamiento de las muestras, siendo el método de elección la dilución frente a la digestión ácida.

2.- Las técnicas ICP-MS (Plasma de acoplamiento inductivo con espectrometría de masas) e ICP-OES (Plasma de acoplamiento inductivo con espectrometría óptica) son aplicables al análisis multielemental de matrices clínicas, siendo ICP-MS la técnica de elección para el análisis de trazas y ultratrazas.

3.- Las concentraciones de estroncio, magnesio, boro y calcio en sangre presentan concentraciones significativamente superiores en las tres localizaciones sanguíneas en caso de sumersión frente a otras causas de muerte y permiten diferenciar entre sumersión en agua salada y agua dulce, por lo que son marcadores útiles en el diagnóstico de la muerte por sumersión en agua salada. La utilidad de las concentraciones de litio para el diagnóstico de muerte por sumersión en agua salada debe realizarse con precaución debido a sus bajas concentraciones en este medio. La determinación conjunta de estroncio, magnesio, calcio, boro y litio permiten clasificar al 83% de los casos de sumersión en agua salada.

4.- El bromo se perfila como un nuevo elemento con alta capacidad discriminatoria para la identificación de la sumersión en agua salada. Mostró concentraciones en la sangre de ventrículo izquierdo estadísticamente superiores en los casos de sumersión en agua de mar frente a los casos de agua dulce y otras causas de muerte. Sus concentraciones en agua salada fueron significativamente superiores a sus niveles en agua dulce.

5.- El análisis de hierro en sangre puede ser útil para el diagnóstico de la muerte por sumersión en agua dulce, siendo sus concentraciones estadísticamente superiores a los casos de sumersión en agua salada y a otras causas de muerte. La determinación conjunta de cinc, bario, estroncio y magnesio permite mejorar la capacidad de discriminación para identificar los casos de sumersión en agua dulce, aunque el diagnóstico en estos casos debe realizarse con más precauciones.

6.- El análisis de componentes principales ha revelado diferentes patrones de concentraciones en la sangre de las tres localizaciones de los elementos traza en sumersión en agua salada que difiere con los niveles y marcadores en sumersión en agua dulce y otras causas de muerte. Así, se pone de manifiesto la vinculación de mayores niveles de estroncio, magnesio, bromo, boro y calcio en la sangre del ventrículo izquierdo del grupo de sumersión en agua salada, lo que se explica por la aspiración de agua hipertónica con altas concentraciones de estos elementos, y por otro lado, la vinculación de bario, aluminio, níquel, arsénico, selenio, potasio, zinc, manganeso, plomo y cobre con concentraciones más elevadas en la sangre del ventrículo derecho, lo que evidencia la hemodilución. Dentro de este grupo se observa que los elementos potasio, cinc, manganeso y plomo presentan similares concentraciones en la sangre del ventrículo derecho en los casos de sumersión en agua salada y en agua dulce, y el cobre niveles similares en sangre del ventrículo derecho de los tres grupos diagnósticos.

7.- Los análisis realizados a las aguas de sumersión muestran altas concentraciones de estroncio, boro, magnesio, bromo y calcio en agua salada con respecto a agua dulce, lo cual se corresponde con los resultados obtenidos en los análisis de sangre de sumersión en agua salada y con las ratios calculadas Agua salada/Sangre. Además, la no existencia de correlaciones estadísticamente significativas entre las concentraciones de los elementos y el intervalo postmortem de nuestro estudio sugieren su aspiración vital.

8.- Los análisis realizados en humor vítreo para la determinación de marcadores químicos muestran por primera vez la utilidad de este fluido biológico para el diagnóstico de sumersión, existiendo correlaciones significativas entre las concentraciones de los elementos en sangre y humor vítreo. Este fluido se perfila como una matriz adecuada especialmente en situaciones de autólisis y putrefacción. Las concentraciones de estroncio se confirman como un buen marcador en humor vítreo, al igual que en sangre, para el diagnóstico de muerte por sumersión, especialmente en los casos de agua salada. Según los criterios asignados por nosotros los mejores marcadores para el diagnóstico de la muerte por sumersión en agua salada en humor vítreo son, además del estroncio, magnesio, bromo y boro.

9.- La determinación de elementos traza en sangre y en humor vítreo es una buena herramienta complementaria para el diagnóstico de sumersión, aunque nunca puede sustituir a la información obtenida de hallazgos morfológicos (macroscópicos e histológicos) y circunstancias de la muerte que se requieren para establecer la causa del fallecimiento.



## **7. BIBLIOGRAFÍA**



1. Abdallah AM, Hassan SA, Kabil MA, Ghanim AEE. Serum strontium estimation as a diagnostic criterion of the type of drowning water. *Forensic Sci. Int.* 1985; 28: 47-52.
2. Abe S, Suto M, Nakamura H, Gunji H, Hiraiwa K, Suzuki T, Itoh T, Kochi H, Hoshiai GI. A novel PCR method for identifying plankton in cases of death by drowning. *Med. Sci. Law* 2003; 43: 23-30.
3. Adelson L, Sunshine I, Rushforth N.B, Mankoff M. Vitreous potassium concentration as an indicator of the post-mortem interval, *J. Forensic Sci.* 1963; 8: 503-514.
4. Agazzi A, Pirola C. Fundamentals methods and future trends of environmental microwave sample preparation. *Microchem. J.* 2000; 67: 337-346.
5. Alarcón Flores, Luis Alfredo.  
<http://www.monografias.com/trabajos34/asfixias/asfixias.shtml> . 16/8/2006
6. An JL, Ishida Y, Kimura A. Forensic application of intrarenal aquaporin-2 expression for differential diagnosis between fresh- water and saltwater drowning. *Int. J. Leg. Med.* 2010; 124: 99-104.
7. Anderson JV, Millar ND, O'Hare JP. Atrial natriuretic peptide: Physiological release associated with natriuresis during water immersion in man. *Clin. Sci.* 1986; 73: 319-322.
8. Anke M, Groppel B, Grun M. Essentiality, toxicity, requirement and supply of molybdenum in humans and animals. En: Mills CF, Bremner I, Chesters JK (eds). *Trace elements in man and animals.* Slough: United Kingdom Commonwealth Agricultural Bureaux; 1985. p. 154-7.

9. Anne S, Tse R, Oldmeadow C, Attia JR, Cala AD. Immersion of Bovine Eyeballs After 1 Hour in Seawater Does Not Result in Elevation of Postmortem Vitreous Humor Sodium and Chloride Levels. *Am. J. Forensic Med. Pathol.* 2016; 37(2): 108-111.
10. Anónimo: Instrucción sobre el modo y medios de socorrer a los que se ahogaren, o naciesen aparentemente muertos: escrita de orden de la Real Sitiada para los Practicantes de Medicina y Cirugía del Hospital Real General y Militar de Nuestra Señora de Gracia de la ciudad de Zaragoza. Edit en Zaragoza en la Imprenta de Francisco Moreno, 1775.
11. 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.
12. Auer A, Möttönen M. Diatoms and drowning. *Z Rechtsmed* 1988; 101: 87-98.
13. Auer A. Qualitative diatom analysis as a tool to diagnose drowning. *Am. J. Forensic Med. Pathol.* 1991; 12: 213-218.
14. Avis SP. Suicidal drowning. *J. Forensic Sci.* 1993; 38: 1422-1426.
15. 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.
16. Azparren Lucas, José Eugenio. Investigación de niveles de estroncio en muertes por sumersión. Tesis doctoral. 1998.
17. 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.



18. 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.
19. Azparren JE, Cubero C, Perucha E, Martínez P, Vallejo G. Comparison between lung weight and blood strontium in bodies found in seawater. *Forensic Sci. Int.* 2007a; 168: 128-132.
20. Azparren JE, Perucha E, Martínez P, Muñoz R, Vallejo G. Factors affecting the strontium absorption in drownings. *Forensic Sci. Int.* 2007b; 168: 138-142.
21. Bajanowski T, Brinkmann B, Stefanec AM, Barckhaus RH, Fechner G. Detection and analysis of tracers in experimental drowning. *Int. J. Legal Med.* 1998; 111: 57-61.
22. Balasooriya BA, St Hill CA, Williams AR, The biochemistry of vitreous humor. A comparative study of the potassium, sodium and urate concentrations in the eyes at identical time intervals after death. *Forensic Sci. Int.* 1984; 26: 85-91.
23. Balthazard V. *Manual de Medicina Legal*. 6ª Edición. Barcelona. Salvat Editores, 1933.
24. Barregard L, Svalander C, Schütz A. Cadmium, mercury, and lead in kidney cortex of the general swedish population: a study of biopsies from living kidney donors. *Environ Health Perspect.* 1999; 197: 867-871.
25. Beeck EF, Branche CM, Szpilman D, Modell JH, Bierens JJ. A new definition of drowning: Towards documentation and prevention of a global public health problem. *Bulletin WHO* 2005; 83: 853-856.
26. Behne D, Hammel C, Pfeifer H. Speciation of selenium in the mammalian organism. *Analys.* 1998; 123: 871-873.

27. Belsey SL, Flanagan RJ. Postmortem biochemistry: Current applications. *J. Forensic Leg. Med.* 2016; 41: 49-57.
28. Bhardwaj PK, Mohan M, Rai UC. Electrocardiographic changes in experimental drowning. *Indian J. Physiol Pharmacol.* 1982; 26: 85-90.
29. Bierens JJ, Knape JT, Gelissen HP. Drowning. *Curr. Opin. Crit. Care.* 2002; 8: 578-586.
30. Bito LZ. Intraocular fluid dynamics. I. Steady-state concentration gradients of magnesium, potassium and calcium in relation to the sites and mechanisms of ocular cation transport processes. *Exp. Eye Res.* 1970; 10: 102-116.
31. Blana SA, Mußhoff F, Hoeller T, Fimmers R, Madea B. Variations in vitreous humor chemical values as a result of pre-analytical treatment. *Forensic Sci. Int.* 2011; 210(1-3): 263-270.
32. Blanco Pampín J, De la Calle Blanco C. Evolución postmortem de los parámetros bioquímicos sanguíneos. Su interés en el diagnóstico diferencial en los casos de muerte súbita. *Boletín Galego de Medicina Legal de Medicina Legal e Forense* nº 15. Agosto 2007.
33. Blanco Pampín J, García Rivero SA, Tamayo NM, Hinojal Fonseca R. Gastric mucosa lesions in drowning: its usefulness in forensic pathology. *Leg. Med. (Tokyo).* 2005; 7: 89-95.
34. Blum C, Shield J. Toddler drowning in domestic swimming pools. *Inj. Prev.* 2000; 6: 288-290.
35. Blumenfeld TA, Catherman RL. Post-mortem vitreous concentration of Na, K, Cl, Ca, Mg in sudden infant death syndrome (SIDS). *Pediatr. Res.* 1974; 9: 347.

- 
36. Bolte RG, Black PG, Bowers RS. The use of extracorporeal rewarming in a child submerged for 66 minutes. *JAM*. 1988; 260: 377-379.
  37. Bray M. Chemical estimation of fresh water immersion intervals. *Am. J. Forensic Med. Pathol.* 1985; 6: 133-139.
  38. Broekaert JAC. Inductively Coupled Plasma Spectrometry, in *Handbook of Spectroscopy: Second, Enlarged Edition* (eds G. Gauglitz and D. S. Moore), Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany. 2014  
doi: 10.1002/9783527654703.ch16.
  39. Brouardel P, Vibert CH. Etude sur la submersion. *Annales d'Hygiène. Médecine Légale* 1880; 3-4: 452-470.
  40. Brouardel P, Loye P. *Recherches expérimentales sur la mort par submersion brusque*. Masson Edit. Paris. 1889.
  41. Brouardel P. *La Pendaision, La Strongulation, La Suffocation, La Submersion*. J.-B. Balliere et Fils, Paris, 20. 1897.
  42. Browne MI, Lewis EL, Stark AD. Unintentional drowning among New York State residents 1988-1994. *Public Health Rep.* 2003; 118: 448-458.
  43. Büttner, Heinz: *Herztod im Bade oder Tod durch Ertrinken: Inaudural - Dissertation*. Universität Berlin. Fakultät der Friedrich-Wilhelms. Edit Charlottenburg: Richard Hoffmann, 1941.
  44. Byard RW, Houldsworth G, James RA, Gilbert JD. Characteristic features of suicidal drownings. A 20 yearsstudy. *Am. J. Forensic Med. Pathol.* 2001; 22: 134-138.

45. Cala AD, Vilain R, Tse R. Elevated postmortem vitreous sodium and chloride levels distinguish saltwater drowning (SWD) deaths from immersion deaths not related to drowning but recovered from saltwater (DNRD). *Am. J. Forensic Med. Pathol.* 2013; 34(2): 133-138.
46. Carithers T, Higgibotham JC. Drownings in Mississippi 1992-1997: frecuencies and distribution. *J. Miss. State Med. Assoc.* 1997; 38: 83-87.
47. Carrara M. Untersuchungen über den osmotischen druck und die spezifische elektrisches leitfähigkeit des blutes bei der fäulnis. *Vierteljahrsschr Gerichtl Med.* 1902; 24: 236.
48. Casamatta DA, Verb RG. Algal colonization of submerged carcasses in a Mid-Order Woodland Stream. *J. Forensic Sci.* 2000; 45: 1280-1285.
49. Centers for Disease Control and Prevention, National Center for Injury Prevention and Control. Web-based Injury Statistics Query and Reporting System (WISQARS). Available from: URL: <http://www.cdc.gov/injury/wisqars>.
50. Centers for Disease Control and Prevention. National Center for Injury Prevention and Control. Wisqars Details of Leading Causes of Death. National Center for Health Statistics (NCHS), National Vital Statistics System. Accessed June 2009. <http://webappa.cdc.gov/sasweb/ncipc/leadcaus10.html>
51. Centers for Disease Control and Prevention. Unintentional Drowning: Fact Sheet. Accessed August 4, 2011.
52. <http://www.cdc.gov/HomeandRecreationalSafety/Water-Safety/waterinjuries-factsheet.html>.
53. Chardez D, Lambert J. Protozoaires ciliés et Thanatologie. *Forensic Sci. Int.* 1985; 28: 83-101.

54. Chen JH, Michiue T, Ishikawa T, Maeda H. Difference in molecular pathology of natriuretic peptides in the myocardium between acute asphyxial and cardiac deaths. *Leg. Med. (Tokyo)*. 2012; 14: 177-182.
55. Coe JI. Use of chemical determinations on vitreous humor in forensic pathology. *J. Forensic Sci.* 1972; 17(4): 541-546.
56. Coe JI. Postmortem chemistry of blood, cerebrospinal fluid, and vitreous humor. *Leg. Med. Annu.* 1977; 1976: 55-92.
57. Coe JI. Postmortem chemistry update emphasis on forensic applications. *Am. J. Forensic Med. Pathol.* 1993; 14(2): 91-117.
58. Concheiro Carro L, Suárez Peñaranda C. Asfixias Mecánicas. En Gisbert Calabuig JA, *Medicina Legal y Toxicología*. 5ª Ed. Salvat, Barcelona. 1998.
59. Concheiro Carro L, Suárez Peñaranda JM. Asfixias mecánicas en *Medicina Legal y Toxicología*. Gisbert Calabuig. E. Villanueva Cañadas. 6ª edición. Masson. 2004. Cap. 35.
60. Corin G, Stockis E. Le diagnostic médico-légale de l'asphyxie par submersion. *Ann. Soc. Méd. Légale Belg.* 1909; 20: 14-23.
61. Corin G. A propos du diagnostic de la mort par submersion. *Ann. Soc. Méd. Légale Belg.* 1909; 20: 375-377.
62. Cornelis R, Borguet F, De Kimpe J. Trace elements in medicine. *Anal. Chim. Acta.* 1993; 283: 183-189.
63. De La Grandmaison GL, Leterreux M, Lasseguette 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.

64. De Nicola LK, Falk JL, Swanson ME, Gayle MO, Kissoon N. Submersion injuries in children and adults. *Crit. Care Clin.* 1997; 13: 477-502.
65. Del Pozo Luengo, M<sup>a</sup> Soledad: Marcadores bioquímicos séricos en la muerte por sumersión: Eficacia diagnóstica del Estroncio y otros elementos traza. Tesis doctoral 2013.
66. Di Maio DJ, Di Maio VJ. *Forensic Pathology*. New York: Elsevier, 1989.
67. Di Maio VJ, Dana SE. *Manual de Patología Forense*. Ediciones Díaz de Santos. 2003. Págs. 195-199.
68. Díaz Palma PA, Alucema A, Hayashida G, Maidana NI. Development and standardization of a microalgae test for determining deaths by drowning. *Forensic Sci Int.* 2009; 184: 37-41.
69. Driscoll TR, Harrison JA, Steenkamp M. Alcohol and drowning in Australia. *Inj Control Saf Promot.* 2004; 11: 175-181.
70. Dufour DR. Lack of correlation of postmortem vitreous humor calcium concentration with antemortem serum calcium concentration. *J. Forensic Sci.* 1982; 27(4): 889-893.
71. Durigon M. *Pathologie médico-légale*. Masson Edit. Paris. 1988.
72. Durlacher S, Freimuth HC, Swann HE. Blood changes in man following death due to drowning, with comments on test for drowning. *Arch. Pathol.* 1953; 56: 454-461.
73. Eichelbauer, Philipp. *Zur Diagnose des Ertrinkungstodes durch den Nachweis von Plankton-organismen in den Lungen Ertrunkener mit besonderer Berücksichtigung des Maignbietes: Inaugural-Dissertation*. Edit. Würzburg: C.J. Becker, 1938.

74. EPA. U.S. Environmental Protection Agency. Air quality criterio for lead, vols. I-IV. EPA-600/8-83/020F. U.S. Environmental Protection Agency, Washington DC; 1986.
75. EPA. U.S. Environmental Protection Agency. Evaluation of the Potential Carcinogenicity of Lead and Lead Compounds. EPA-600/8-89/045A. U.S. Environmental Protection Agency, Washington DC; 1989.
76. Espinosa Muñoz, Rafael. Nuevo procedimiento para el diagnóstico de la sumersión vital. Barcelona: Universidad, Secretaria de Publicaciones, D.L.1964.
77. Fabregat Cristóbal. Discurso médico-practico sobre el modo de socorrer y revocar á sus sentidos los ahogados, ahorcados, elados, y sufocados por el tufo del carbón, de la cal, de las velas de sebo, y de otras exalaciones perniciosas ilustrado con historias verdaderas de autores gravísimos. Valencia: Imp. por Francisco Burguete, 1775. Segunda Edición en 1776.
78. Fornes P, Druilhe L, Lecomte D. Childhood homicide in París 1990-1993: a report of 81 cases. J. Forensic Sci. 1995; 40: 201-204.
79. Fornes P, Pepin G, Heudes D, Lecomte D. Diagnosis of drowning by combined computer-assisted histomorphometry of lungs with blood strontium determination. J. Forensic Sci. 1998; 43: 772-776.
80. Freimuth HC, Swann HE. Plasma specific gravity changes in sudden deaths. Arch. Pathol. 1955; 59: 214-218.
81. Froes RES, Borges W, Nascentes CC, Silva JBB. Multivariate optimization and exploratory analysis applied to the internal standardization of complex matrices by Inductively coupled plasma optical emission spectrometry. Atomic Spectrometry. Vol. 36 (1), Jan./Feb. 2015.
82. Fuller RH. The clinical pathology of human near-drowning. Proc. R. Soc. Med. 1963; 56: 33-38.

83. Funayama M, Mimasaka S, Nata M, Hashiyada M, Yajima Y. Diatom numbers around the continental shelf break. *Am. J. Forensic Med. Pathol.* 2001; 22: 236-238.
84. Gabbe BJ, Finch CF, Cameron PA, Williamson OD. Incidence of serious injury and death during sport and recreation activities in Victoria, Australia. *Br. J. Sports Med.* 2005, 39: 573-577.
85. 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. *J Forensic Sci.* 2004; 49:371e4.
86. Gamero JJ, Romero JL, Arufe MI, Vizcaya MA, Balanza E. A study among the population of Sevilla of death due to submersion. *Am. J. Forensic Med. Pathol.* 1997; 18: 70-74.
87. Gettler AO. A method for the determination of death by drowning. *JAMA* 1921; 77: 1650-1652.
88. Giersten JC. Drowning while under the influence of alcohol. *Nord. Med.* 1970; 83: 523-527.
89. Gisbert Calabuig JA. *Medicina Legal y Toxicología*. Fundación García Muñoz. Valencia, 1983.
90. Gisbert Calabuig JA, Villanueva E. Procesos destructores del cadáver. En: Gisbert Calabuig JA. *Medicina Legal y Toxicología*. Masson: Barcelona, 2004.
91. Golden FC, Tipton MJ, Scott RC. Immersion, near-drowning and drowning. *Brit. J. Anesth.* 1997; 79: 214-225.



92. Gordon I, Shapiro HA, Berson SD. Rapids death from interference with oxygenation of the tissues. En: Forensic Medicine. A guide to principles. New York: Churchill Livingstone 1988: 81-125.
93. Griest KJ, Zumwalt RE. Child abuse by drowning. *Pediatrics*. 1989; 83: 41-46.
94. Gulliver P, Begg D. Usual water-related behaviour and 'near-drowning' incidents in young adults. *Aust. N. Z. J. Public Health*. 2005; 29: 238-243.
95. Gunzelmann, Ernstgünther. Über Todesfälle beim Baden mit besonderer Berücksichtigung plötzlicher Todesfälle im geschlossenen Baderaum: Inaugural-Dissertation. Edit. München: Dr. C. Wolf & Sohn, 1941
96. Haefner JN, Wallace JR, Merritt RW. Pig decomposition in lotic aquatic systems: The potential use of algal growth in establishing a postmortem submersion interval (PMSI). *J. Forensic Sci*. 2004; 49: 330-336.
97. Haskell NH, Meshaffrey DG, Hawley DA, Williams RE, Pless JE. Use of aquatic insects in determining submersion interval. *J. Forensic Sci*. 1989; 34: 622-632.
98. Hayashi T, Ishida Y, Mizunuma S, Kimura A, Kondo T. Differential diagnosis between freshwater drowning and saltwater drowning based on intrapulmonary aquaporin-5 expression. *Int. J. Legal Med*. 2009; 123: 7-13.
99. He F, Huang D, Liu L, Shu X, Yin H, Li X. A novel PCR-DGGE-based method for identifying plankton 16S rDNA for the diagnosis of drowning. *Forensic Sci. Int*. 2008; 176: 152-156.
100. Heitland P, Köster HD, Biomonitoring of 37 trace elements in blood samples from inhabitants of northern Germany by ICP-MS. *J. Trace Elem. Med Biol*. 2006; 20: 253-262.

101. Hinojal R, Martínez JJ. La sumersión: estudio doctrinal. *Rev. Esp. Med. Leg.* 1986; 48-49:72-86.
102. Hobischak NR, Anderson GS. Time of submergence using aquatic invertebrate succession and decompositional changes. *J. Forensic Sci.* 2002; 47: 142-151.
103. Hodgkinson A, Hambleton J. Elevation of serum calcium concentration and changes in other blood parameters after death. *J. Surg. Res.* 1969; 9: 567-574.
104. Hürlimann J, Feer P, Elber F, Niederberger K, Dirnhofer R, Wyler D. Diatom detection in the diagnosis of death by drowning. *Int. J. Legal Med.* 2000; 114: 6-14.
105. Ibáñez N, Montoro R. 1996. Trace element food toxicology: an old and evergrowing discipline. *Critical reviews in Food Science and Nutrition.* 1996; 36: 299-320.
106. 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.
107. Idris AH, Berg RA, Bierens J. Recommended guidelines for uniform reporting of data from drowning: The Utstein style. *Resuscitation* 2003; 59: 45-57.
108. Ingham A, Byard R. The potential significance of elevated vitreous sodium levels at autopsy. *J. Forensic Leg. Med.* 2009; 16: 437-440.
109. James RA, Hoadley PA, Sampson BG. Determination of postmortem interval by sampling vitreous humor, *Am. J. Forensic Med. Pathol.* 1997; 18(2): 158-162.
110. Jeanmonod R, Staub CH, Mermillod B. The reliability of cardiac haemodilution as a diagnostic test of drowning. *Forensic Sci. Int.* 1992; 52: 171-180.
111. Jetter WW. Postmortem biochemical changes. *J. Forensic Sci.* 1959; 4: 330-341.

112. 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: 149-155.
113. Kakizaki E, Takahama K, Seo Y, Kozawa S, Sakai M, Yukawa N. Marine bacteria comprise a possible indicator of drowning in seawater. *Forensic Sci. Int.* 2008; 176: 236-247.
114. Kakizaki E, Kozawa S, Sakai M, Yukawa N. Bioluminescent bacteria have potential as a marker of drowning in seawater: two immersed cadavers retrieved near estuaries. *Leg. Med. (Tokyo)*. 2009a; 11: 91-96.
115. Kakizaki E, Kozawa S, Tashiro N, Sakai M, Yukawa N. Detection of bacterioplankton in immersed cadavers using selective agar plates. *Leg. Med. (Tokyo)*. 2009b; 11: 350-353.
116. Kakizaki E, Kozawa S, Sakai M, Yukawa N. Numbers, Sizes, and Types of Diatoms Around Estuaries for a Diatom Test. *Am. J. Forensic Med. Pathol.* 2011; 32: 269-274.
117. Kamada S, Seo Y, Takahama K. A sandwich enzyme immunoassay for pulmonary surfactant protein D and measurement of its blood levels in drowning victims. *Forensic Sci. Int.* 2000; 109: 51-63.
118. Kane M, Fukunaga T, Maeda H, Nishi K. The detection of picoplankton 16S rDNA in cases of drowning. *Int. J. Legal Med.* 1996; 108: 323-326.
119. Keiper JB, Chapman EG, Foote BA. Midge larvae (Diptera: Chironomidae) as indicators of postmortem submersion interval of carcasses in a Wooland Strem: A preliminary report. *J. Forensic Sci.* 1997; 42: 1074-1079.
120. Kemp AM, Mott AM, Sibert JR. Accidents and child abuse in banthub submersions. *Arch. Dis. Child.* 1994; 10: 435-438.

121. Kido M, Hitosugi M, Yokoyama T, Tokudome S. Sudden death while bathing. Department of Legal Medicine, Dokkyo University School of Medicine. Nippon Rinsho. 2005; 63: 1239-1242.
122. Knight B. Drowning. En: Legal aspects of medical practice. Edinburgh, Churchill Livingstone, 1976: 156-159.
123. Knight B. Immersion deaths. En: Forensic Pathology (2<sup>a</sup> ed.). Arnold: Londres, 1996.
124. Kobayashi M, Yamada Y, Zhang WD, Itakura Y, Nagao M, Takatori T. Novel detection of plankton from lung tissue by enzymatic digestion method. Forensic Sci. Int. 1993; 60: 81-90.
125. Kristin Ahlm, Britt-Inger Saveman, Ulf Björnstig. Drowning deaths with emphasis on the presence of alcohol and drugs a retrospective study, 1992-2009. BMC Public Health. 2013; 13: 216.
126. Landrigan PJ. Toxicity of lead at low dose. Br. J. Ind. Med. 1989; 46: 593-596.
127. Laursen LH, Hansen HL, Jensen OC. Fatal occupational accidents in Danish fishing vessels 1989-2005. Int. J. Inj. Contr. Saf. Promot. 2008; 15(2):109-117.
128. Layon AJ, Modell JH. Drowning and near-drowning. En: Tinker J, Zapol WM. Care of the Critically Ill Patient. Springer-Verlag: London, 1992.
129. Layon AJ, Modell JH. Drowning. Anesthesiology. 2009; 110: 1390-1401.
130. Lehmann K, Beuthin A. Der Nachweis von Calciumlignosulfonat im Blut und in den Organprebsäften ertränkter Ratten als Zeichen vitalen Ertrinkens. Z Rechtsmed 1971; 68: 11-16.

131. Lorente Acosta, José Antonio. Estudio crítico del diagnóstico bioquímico de la sumersión. A propósito de dos nuevos marcadores: el péptido natriurético auricular y ciertos fosfolípidos el surfactante pulmonar. Tesis doctoral 1988.
132. Lorente JA, Hernández-Cueto C, Villanueva E. Postmortem stability of the rat atrial natriuretic peptide in blood and atrial tissue. *Rev. Esp. Fisiol.* 1989; 45: 127-130.
133. Lorente JA, Hernández-Cueto C, Villanueva E. Utilidad de los parámetros hematológicos métrico-ponderales e iónicos en el diagnóstico de la sumersión vital. *Riv. Ital. Med. Legale.* 1990a; 12: 803-811.
134. Lorente JA, Hernández-Cueto C, Villanueva E, Luna JD. The usefulness of lung surfactant phospholipids (LSPs) in the diagnosis of drowning. *J. Forensic Sci.* 1990b; 35: 1367-1372.
135. Lorente JA, Lorente M, Villanueva E. Post mortem stability of lung surfactant phospholipids. *J. Forensic Sci.* 1992; 3: 1341-1345.
136. Lu Y, Kippler M, Harari F, Grandér M, Palm B, Nordqvist H, Vahter M. Alkali dilution of blood samples for high throughput ICP-MS analysis comparison with acid digestion. *Clin. Biochem.* 2015; 48(3): 140-147.
137. Lucas J, Goldfeder LB, Gill JR. Bodies found in the waterways of New York City. *J. Forensic Sci.* 2002; 47: 137-141.
138. Lucci A, Cirnelli A. A microbiological test for the diagnosis of death by drowning. *Forensic Sci. Int.* 2007; 168: 34-36.
139. Ludes B, Coste M. Diatomées et Médecine Légale. En: *Applications de la recherche des Diatomées au diagnostic de la submersion vitale. Médicales Internationales*: Paris, 1996.

140. Luna A. Is postmortem biochemistry really useful? Why is it not widely used in forensic pathology?. *Leg. Med. (Tokyo)*. 2009; 11: 27-30.
141. Lunetta P, Penttila A, Hallfors G. Scanning and transmission electron microscopical evidence of the capacity of diatoms to penetrate the alveolo- capillary barrier in drowning. *Int. J. Legal Med.* 1998; 111: 229-237.
142. Lunetta P, Smith GS, Penttila A, Sajantila A. Unintentional drowning in Finland 1970-2000: a population-based study. *Int. J. Epidemiol.* 2004; 33: 1063-1064.
143. Lunetta P, Modell JP. Macroscopical, microscopical and laboratory findings in drowning victims. En: Tsokos M. *Forensic Pathology Reviews*. Human Press: Totowa, 2005.
144. Madea B, Henssge C, Hönig W, Gerbracht A. References for determining the time of death by potassium in vitreous humor, *Forensic Sci. Int.* 1989; 40: 231-243.
145. Madea B, N. Hermann, C. Henssge, Precision of estimating the time since death by vitreous potassium-comparison of two different equations. *Forensic Sci. Int.* 1990; 46: 277-284.
146. Madea B, Henssge C. Eye changes after death. Henssge C, Knight B, Krompecher T, Madea B, Nokes L. (Eds.), *The Estimation of the Time Since Death in the Early Postmortem Period* (2nd ed.), Edward Arnold, London (2002), pp. 103-133.
147. Madea B. Is there recent progress in the estimation of the postmortem interval by means of thanatochemistry?. *Forensic Sci. Int.* 2005; 151: 139-149.
148. Madea B, Musshoff F. Postmortem biochemistry. *Forensic Sci. Int.* 2007; 165: 165-171.

- 
149. Maeda H, Zhu BL, Ishikawa T, Quan L, Michiue T, Bessho Y, Okazaki S, Kamikodai Y, Tsuda K, Komatsu A, Azuma Y. Analysis of postmortem biochemical findings with regard to the lung weight in drowning. *Leg. Med. (Tokyo)*. 2009; 11: 269-272.
  150. Maeda H, Zhu BL, Ishikawa T, Quan L, Michiue T. Significance of postmortem biochemistry in determining the cause of death. *Leg. Med. (Tokyo)*. 2009a; 11: 46-49.
  151. Maeda H, Michiue T, Zhu BL, Ishikawa T, Quan L. Analysis of cardiac troponins and creatine kinase MB in cerebrospinal fluid in medicolegal autopsy cases. *Leg. Med. (Tokyo)*. 2009b; 11: 266-268.
  152. Maeda H, Zhu BL, Ishikawa T, Michiue T. Forensic molecular pathology of violent deaths. *Forensic Sci. Int.* 2010; 203: 83-92.
  153. Maeda H, Ishikawa T, Michiue T. Forensic biochemistry for functional investigation of death: Concept and practical application. *Leg. Med. (Tokyo)*. 2011; 13: 55-67.
  154. 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.
  155. Mason JK, Purdue BN. *The Pathology of Trauma*. Arnold, London. 30 ed. 2000.
  156. 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.

157. McCurdy E, Woods G. The application of collision/reaction cell inductively coupled plasma mass spectrometry to multi-element analysis in variable sample matrices, using He as a non-reactive cell gas. *J. Anal. At. Spectrom.* 2004; 19: 607-615.
158. Meinck F, Stooff H, Kohlschütter H. *Les Eaux Residuaires Industrielles*. Ed. Masson. Paris, New York, Barcelone, Milan. 1977.
159. Millour S, Noël L, Kadar A, Chekri R, Vastel C, Guérin T. Simultaneous analysis of 21 elements in foodstuffs by ICP-MS after closed-vessel microwave digestion: Method validation. *J. Food Comp. Anal.* 2011; 24: 111-120
160. Mishul'skii AM. The use of bacteriological analysis of the blood in the diagnosis of death by drowning (Russ). *Sud Med Ekspert* 1990; 33: 26-28.
161. Mitchell R, Charlwood C, Thomas SD, Bellis M, Langlois NE. An audit of the contribution to post-mortem examination diagnosis of individual analyte results obtained from biochemical analysis of the vitreous. *Forensic Sci. Med. Pathol.* 2013; 9(4): 515-520.
162. Modell JH, Moya F. Effects of volume of aspirated fluid during chlorinated freshwater drowning. *Anesthesiology.* 1966b; 27: 662-672.
163. Modell JH, Moya F, Newby EJ, Ruiz BC, Showers AV. The effects of fluid volume in seawater drowning. *Ann. Intern. Med.* 1967; 67: 68-80.
164. Modell JH, Davis JH. Electrolyte changes in human drowning victims. *Anesthesiology.* 1969; 30: 414-420.
165. Modell JH. *The pathophysiology and treatment of drowning and near-drowning*. Ed. Springer. Springfield. 1971.



166. Moritz AR. Chemical methods for the determination of death by drowning. *Physiol. Rev.* 1944; 24: 70-88.
167. Mukaisa M, Kimura H, Takada Y. Detection of bathsalts in the lung of a baby drowned in a bathtub: A case report. *Forensic Sci. Int.* 1998; 93: 5-11.
168. Mulligan-Smith D, Pepe PE, Branche CM. A seven-year statewide study of the epidemiology of pediatric drowning deaths. *Acad. Emerg. Med.* 2002; 9: 488-489.
169. Muñoz Tuero, Luís María. Aportación a las falsas muertes por sumersión /Muñoz Tuero y Villalaín Blanco. Madrid: Oteo, 1971.
170. Muñoz JI, Suárez-Peñaranda JM, Otero XL, Rodríguez-Calvo MS, Costas E, Migueñs X, Concheiro L. A new perspective in the estimation of postmortem interval (PMI) based on vitreous [K<sup>+</sup>]. *J. Forensic Sci.* 2001; 46(2): 209-214.
171. NIOSH [1993]. Fatal injuries to workers in the United States, 1980-1989: a decade of surveillance; national profile. Cincinnati, OH: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Centers of Disease Control and Prevention, National Institute for Occupational Safety and Health, DHHS (NIOSH) Publication N°. 93-108.
172. Prevención de ahogamientos de pescadores comerciales. NIOSH [1994] Publicación N° 94-107 de DHHS (NIOSH). Abril 1994.
173. Oehmichen M, Hennig R, Meissner C. Near-drowning and clinical laboratory changes. *Leg. Med. (Tokyo).* 2008; 10: 1-5.
174. OMS. Organización Mundial de la Salud. Environmental health criterio 3. Lead. Geneva: World Health Organization; 1977.

175. 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. BOE 19/05/2010.
176. Orfila, Mateo José Buenaventura. Secours a donner aux personnes empoisonnées et asphyxiées. Bruxelles : Librairie Médicale et Scientifique, 1830. 5ème éd. / publiée par C.-J.-B. Comet.
177. 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: 1044-9.
178. 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.
179. Padmasubashini V, Chakrapani G. Chemical characterization of coal fly ash samples by ICP-AES and ICP-MS with focus on trace level toxic elements. *At. Spectrosc.* Vol. 37(6), Nov./Dec. 2016
180. Palacios Aguilar, J. “Estudio sobre los ahogamientos y otros eventos de riesgo vital en el entorno acuático marino”. Fundación Mapfre y equipo multidisciplinar de profesores e investigadores de Universidad de A Coruña, Universidad de Santiago de Compostela, Universidad de Vigo y Asociación Española de Técnicos en Salvamento Acuático y Socorrismo, junio 2015.
181. Panhwar AH, Kazi TG, Afridi HI. Correlation of cadmium and aluminium in blood samples of kidney disorder patients with drinking water and tobacco smoking: related health risk. *Environ Geochem Health.* 2016; 38(1): 265-264.
182. Papa L, Hoelle R, Idris A. Systematic review of definitions for drowning incidents. *Resuscitation.* 2005; 65: 255-264. 163: 1-9.

183. Papadodima SA, Athanaselis SA, Skliros E, Spiliopoulou CA. Forensic investigation of submersion deaths. *J. Clin. Pract.* January 2010, 64, 1, 75-83.
184. Peabody AJ, Burgess RM. Diatoms and Drowning. III. Diatoms in the organs of drowned subjects. CRE Report. Central Research Establishment, Home Office Forensic Science Service. Aldennaston. 1985.
185. Pérez Pujol, Emilio. Hallazgos histopatológicos en dos modelos de asfixias violentas. La serotonina como indicador inespecífico de sufrimiento agónico. Tesis doctoral. 1997.
186. Pérez-Cárceles MD, Noguera J, Jiménez JL, Martínez P, Luna A, Osuna E. Diagnostic efficacy of biochemical markers in diagnosis post-mortem of ischaemic heart disease. *Forensic Sci. Int.* 2004; 28: 1-7.
187. Pérez-Cárceles MD, Sibón A, Gil Del Castillo ML, Vizcaya MA, Osuna E, Falcón M, Romero JL, Luna A. Blood strontium levels in different causes of death. Comunicación presentada al XXth Congress of International Academy of Legal Medicine. Budapest (Hungria). 2006.
188. Pérez-Cárceles MD, Sibón A, Vizcaya MA, Osuna E, Gómez-Zapata M, Luna A, Martínez-Díaz F. Histological findings and immunohistochemical surfactant protein A (SP-A) expression in asphyxia: Its application in the diagnosis of drowning. *Histol. Histopathol.* 2008a; 23: 1061-1068.
189. Pérez-Cárceles MD, Sibón A, Gil Del Castillo ML, Vizcaya MA, Osuna E, Casas T, Romero JL, Luna A. Strontium levels in different causes of death: diagnostic efficacy in drowning. *Biol. Trace Elem. Res.* 2008b; 126: 27-37.
190. Pérez-Carceles MD, Del Pozo S, Sibon A, Noguera JA, Osuna E, Vizcaya MA, Luna A. Serum biochemical markers in drowning: Diagnostic efficacy of Strontium and other trace elements. *Forensic Sci. Int.* 2011; 214: 159-166.

191. Piette M, Timperman J, Parisis N. Serum strontium estimation as a medico-legal diagnostic indicator of drowning. *Med. Sci. Law.* 1989; 29: 162-171.
192. Piette M, Desmet B, Dams R. Determination of strontium in human whole blood by ICP-AES. *Sci. Total Environ.* 1994; 141: 269-273.
193. Piette M. La noyade: Recherches actuelles. *J. Méd. Lég. Droit. Méd.* 1996; 39: 417-420.
194. Piette MHA, De Letter EA. Drowning: still a difficult autopsy diagnosis. *Forensic Sci. Int.* 2006; 163: 1-9.
195. Placzek M. Die Blutdichte als Zeichen des Ertrinkungsvorganges. *Vierteljahrsschr Gerichtl Med* 1903; 25: 3.
196. Pollanen MS, Cheung C, Chiasson DA. The diagnostic value of the diatom test for drowning. I. Utility: A retrospective analysis of 771 cases of drowning in Ontario, Can. *J. Forensic Sci.* 1997; 42: 281-285.
197. Pollanen MS. The diagnostic value of the diatom test for drowning. II. Validity: Analysis of diatoms in bone marrow and drowning medium. *J. Forensic Sci.* 1997; 42: 286-290.
198. Pollanen MS. Diatoms and homicide. *Forensic Sci. Int.* 1998; 91: 29-34.
199. Pounder DJ, Carson DO, Johnston K, Orihara Y. Electrolyte concentration differences between left and right vitreous humor samples. *J. Forensic Sci.* 1998; 43: 604e7.
200. Quan L, Zhu BL, Ishida K, Oritani S, Taniguchi M, Fujita MQ, Maeda H. Intranuclear ubiquitin immunoreactivity of the pigmented neurons of the substantia nigra in fatal acute mechanical asphyxiation and drowning. *Int. J. Legal Med.* 2001; 115: 6-11.

201. Reh H. Diagnostik des Ertrinkungstodes und Bestimmung der Wasserzeit. M Tritsch Verlag: Düsseldorf, 1970.
202. Reh H. In: B Müller (ed), Gerichtliche Medizin. Springer, Berlin. 1975.
203. Reiter C. Zum Nachweis des Ertrinkungstodes mittels ins Herzblut eingeschwemmter Raucherzellen. Z Rechtsmed 1984; 93: 79-88.
204. Repetto M, Camean A, y López M. Toxicología avanzada. Ed. Díaz de Santos. 1995
205. Revenstorf V. Der Nachweis der aspirierten Ertränkungsflüssigkeit als Kriterium des Todes durch Ertrinken. Vjschr Gerichtl Med. 1904; 27: 274-299.
206. Reverte JM. Eutanasia. En: las fronteras de la medicina. Límites éticos, científicos y jurídicos. Madrid. Díaz de Santos. 1983: 101-122.
207. Rivers J, Orr G, Lee H. Electrolytes in near-drowning. Br. Med. J. 1970; 157- 160.
208. Roll HF. Leerboek der Gerechtelijke Geneeskunde voor de scholen tot opleiding van Ind artsen. Martinus Nijhoff. 's-Gravenhage. 1918.
209. Romero Palanco JL. Muertes por sumersión: Revisión y actualización de un tema clásico de la medicina forense. Cuad. Med. Forense. 2007; 48-49: 99-130.
210. Rose KL, Collins KA. Vitreous postmortem chemical analysis. NewsPath. College of American Pathologists; 2015.
211. June.[http://www.cap.org/apps/docs/newspath/0812/vitreous\\_postmortem\\_chemical\\_analysis.pdf](http://www.cap.org/apps/docs/newspath/0812/vitreous_postmortem_chemical_analysis.pdf) [accessed 22.01.16].
212. Runyan CW, Casteel C, Perkis D, Black C, Marshall SW, Johnson RM, Coyne-Beasley T, Waller AE, Viswanathan S. Unintentional injuries in the home in the United States Part I: mortality. Am. J. Prev. Med. 2005; 28: 73-79.

213. Salomez F, Vincente JL. Drowning: a review of epidemiology, pathophysiology, treatment and prevention. *Resuscitation*. 2004; 63: 261-268.
214. Sánchez de León MS, Vallejo G, Azparren JE. Muerte por sumersión. En: Delgado S, editor. *Tratado de medicina legal y ciencias forenses*. Barcelona: Editorial Bosch, S. A; 2011; 803-817.
215. Saukko P, Knight B. Suffocation and “asphyxia”. En: Ueberberg A. *Knight’s forensic pathology* (3ªed.). Arnold: London, 2004.
216. Sauvageau A, Boghossian E. Classification of asphyxia: the need for standardization. *J. Forensic Sci.* 2010; 55: 1259-1267.
217. Schmidt P, Madea B. Death in the bath involving children. *Forensic Sci. Int.* 1995; 72:147-155.
218. Siber JR, Lyons RA, Smith BA et al. Preventing deaths by drowning in children in the United Kingdom: have we made progress in 10 years? Population based incidence study. *Brit. Med. J.* 2002; 324: 1070-1071.
219. Sibón Olano, A. 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. Tesis doctoral 2009.
220. Sidari L, Di Nunno N, Costantinides F, Melato M. Diatom test with Soluene-350 to diagnose drowning in sea water. *Forensic Sci. Int.* 1999; 103: 61-65.
221. Simonin C. Sumersión. En *Medicina Legal Judicial*. JIMS. Barcelona. 1962; 225-243.
222. Smith HA. *Biochemistry of the essential ultratrace elements. Cadmium*. Plenum Press, Nueva York. 1984; 341-366.

223. Sparks DL, Oeltgen PR, Kryscio RJ, Hunsaker JC. 3rd, Comparison of chemical methods for determining postmortem interval. *J. Forensic Sci.* 1989; 34: 197-206.
224. Spitz WU. Asphyxia. En: Spitz WU, Spitz DJ. Spitz and Fisher's medicolegal investigation of death: Guidelines for the application of pathology to crime investigation (4<sup>a</sup>ed.). Charles C. Thomas: Springfield, 2006.
225. Stemberga V, Stifter S, Cuculić D, Coklo M, Bosnar A. Immunohistochemical surfactant protein-A expression: fatal drowning vs. postmortem immersion. *Med. Hypotheses.* 2009; 72: 413-415.
226. Stockis E. Recherches sur le diagnostic médico-légal de la mort par submersion. *Ann. Soc. Med. Légale de Belgique.* 1909; 20: 71-220.
227. Stockis E. Le diagnostic de la mort par submersion par la méthode du plancton cristallin. *Ann. Méd. Légale Crim. Polic. Sci.* 1921; 1: 43-48.
228. Sturner WQ. The vitreous humor: postmortem potassium changes. *Lancet.* 1963; 1: 807-808.
229. Sturner WQ. Magnesium deprivation and sudden unexpected infant and death. *Lancet.* 1972; 300: 1150-1151.
230. 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.
231. Suto M, Abe S, Nakamura H, Suzuki T, Itoh T, Kochi H, Hoshiai GI, Hiraiwa K. Phytoplankton gene detection in drowned rabbits. *Leg. Med.* 2003; 5: S142-S144.
232. Suto M, Kato N, ABE S, Nakamura M, Tsuchiya R, Hiraiwa K. PCR detection of bacterial genes provides evidence of death by drowning. *Leg. Med. (Tokyo).* 2009; 11: 354-356.

- 
233. Swann HG, Brucer M, Moore C, Vezien BL. Fresh water and sea water drowning; a study of terminal cardiac and biochemical events. *Tex. Rep. Biol. Med.* 1947; 5: 423-437.
234. Swann HG, Brucer M. The cardiorespiratory and biochemical events during rapid anoxic death; fresh water and sea water drowning. *Tex. Rep. Biol. Med.* 1949; 7: 604-618.
235. Swann HG, Spafford NR. Body salt and water changes during fresh and sea water drowning. *Tex. Rep. Biol. Med.* 1951; 9: 356-362.
236. Swann HG. Mechanism of circulatory failure in fresh and sea water drowning. *Circ. Res.* 1956; 4: 241-244.
237. Swick D. Submersion injuries in children. *Int. J. Trauma Nurs.* 1997; 3: 59-64.
238. Tabelaing BB, Modell JH. Fluid administration increases oxygen delivery during continuous positive pressure ventilation after freshwater near-drowning. *Crit. Care Med.* 1983; 11: 693-696.
239. Takahashi M, Kinoshita H, Nishiguchi M, Nishio H. Bromide detection in blood using energy dispersive X-ray fluorescence; a chemical marker supportive of drowning in seawater. *Leg. Med.* 2010; 12: 132-136.
240. Taylor AS. *Traité de Médecine Légale*. Paris: Ed. Gezmer Bailliére. 1881.
241. Taylor JJ. Diatoms and drowning. A cautionary case note. *Med Sci Law* 1994; 34: 78-79.
242. Thierauf, Annette, Musshoff Frank, Madea, Burkhard. Post-mortem biochemical investigations of vitreous humor. *Forensic Sci. Int.* 2009; 192: 78-82.
243. Thoinot L. *Tratado de Medicina Legal*. 2ª ed. Barcelona: Salvat Editores. 1927.



244. Tie J, Uchigasaki S, Haseba T, Ohno Y, Isahai I, Oshida S. Direct and rapid PCR amplification using digested tissues for the diagnosis of drowning. *Electrophoresis*. 2010; 31: 2411-2415.
245. Timperman J. The diagnosis of drowning. A review. *Forensic Sci*. 1972; 1: 397- 409.
246. Tournis S, Economopoulos D, Lyritis GP. Strontium ranelate: a novel treatment in postmenopausal osteoporosis. *Ann. N. Y. Acad. Sci*. 2006; 1092: 403-407.
247. Uchiyama T, Kakizaki E, Kozawa S, Nishida S, Imamura N, Yukawa N. A new molecular approach to help conclude drowning as a cause of death: simultaneous detection of eight bacterioplankton species using real-time PCR assays with TaqMan probes. *Forensic Sci. Int*. 2012; 222: 11-26.
248. Usumoto Y, Sameshima N, Hikiji W, Tsuji A, Kudo K, Inoue H, Ikeda N. Electrolyte analysis of pleural effusion as an indicator of drowning in seawater and freshwater. *J. Forensic Leg. Med*. 2009; 16: 321-324.
249. Vallejo Gloria, Azparren José Eugenio, Sánchez de León M. Soledad, Contardi Lorena y Valverde Juan Luis. Pruebas biológicas complementarias en las muertes por sumersión. *Rev. Esp. Med. Legal*. 2012; 38(1): 17-27
250. Verdú Pascual. Tipología y distribución de la muerte violenta en el Partido Judicial de Valencia en un período de 27 años y una muestra de 14.324 autopsias judiciales. Tesis doctoral 1987.
251. Vibert CH. Tratado de Medicina Legal y Toxicología. Tomo I. Barcelona. José Espasa Editor. 1911
252. Villalain Blanco, José Delfín. Estudio fisiopatológico y experimental del seston en las muertes por sumersión. Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Medicina. Departamento de Medicina Legal. Colección Tesis Doctorales, volumen 1, 1979.

- 
253. Wang CS, Chou P. An análisis of unnatural deaths between 1990 and 1994 in ALein, Taiwan. *Injury*, 1997; 28: 203-208.
254. Wheeler MS, Butts JD, Hudson P. Vitreous humor magnesium in alcoholics. *Am. J. Forensic Med. Pathol.* 1983; 4(2): 105-110.
255. Wirthwein DP, Barnard JJ, Prahlow JA. Suicide by drowning. A 20 years review. *J. Forensic Sci.* 2002; 47: 131-136
256. World Health Organization. Fact sheet on drowning. (On line: [www.who.int/violence\\_prev](http://www.who.int/violence_prev).)
257. Wu AHB. *Tietz Clinical Guide to Laboratory Tests* (4<sup>a</sup> ed.) Saunders Elsevier: St. Louis, 2006.
258. 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.
259. Zangani P, Palmieri VM, Sciaudone. *Manuale di Medicina Legale e delle Assicurazioni*. Morano Editore. Napoli. 30 ed. 1985.
260. Zhao J, Liu C, Hu S, He S, Lu S. Microwave Digestion-Vacuum Filtration-Automated Scanning Electron Microscopy as a sensitive method for forensic diatom test. *Int. J. Legal Med.* 2013; 127: 459-463.
261. Zhu BL, Ishida K, Quan L, Fujita MQ, Maeda H. Immunohistochemistry of pulmonary surfactant apoprotein A in forensic autopsy: reassessment in relation to the causes of death. *Foresic Sci. Int.* 2000; 113: 193-197.
262. Zhu BL, Ishida K, Quan L, Li DR, Taniguchi M, Fujita MQ, Maeda H, Tsuji T. Pulmonary immunohistochemistry and serum levels of a surfactant-associated protein A in fatal drowning. *Leg. Med. (Tokyo)*. 2002b; 4: 1-6.

263. Zhu BL, Ishida K, Taniguchi M, Quan L, Oritani S, Tsuda K, Kamikodai Y, Fujita MQ, Maeda H. Possible postmortem serum markers for differentiation between fresh, saltwater drowning and acute cardiac death: A preliminary investigation. *Leg. Med. (Tokyo)*. 2003b; 5: 298-301.
264. Zhu BL, Ishikawa T, Quan L, Li DR, Zhao D, Michiue T, Maeda H. Evaluation of postmortem serum calcium and magnesium levels in relation to the causes of death in forensic autopsy. *Forensic Sci. Int.* 2005; 155: 18-23.
265. Zhu BL, Ishikawa T, Michiue T, Tanaka S, Zhao D, Li DR, Quan L, Oritani S, Maeda H. Differences in postmortem urea nitrogen, creatinine and uric acid levels between blood and pericardial fluid in acute death. *Leg. Med. (Tokyo)*. 2007a; 9: 115-122.
266. Zhu BL, Ishikawa T, Michiue T, Li DR, Zhao D, Tanaka S, Kamikodai Y, Tsuda K, Okazaki S, Maeda H. Postmortem pericardial natriuretic peptides as markers of cardiac function in medico-legal autopsies. *Int. J. Legal Med.* 2007c; 121: 28-35.