- Buffer para Radioinmunoanálisis-ANP, pH: 7.4
  *Fosfato Monosódico, Merck.....2.76 gr
  *Cloruro Sódico, Merck.....8.70 gr
  *Albúmina, Sigma.....0.10 gr
  *Gelatina, BDH.....1.00 gr
  *Tritón X-100, Merck.....1.00 ml
  *Agua Destilada, c.s.p.....1.000 ml
  *Ajustar pH: 7.4 con Hidróxido Sódico 3 M

4.12.2.2. OBTENCION DE MUESTRAS PLASMATICAS Y AURICULARES

- Jeringa plástico 10 ml, Luer
- Agujas de 0.8 x 40 mm, Luer
- Tubos con Heparina Sódica
- Inhibidor de Tripsina de Soja, Sigma
- Aprotinina, Sigma
- Agitador circular, Selecta
- Centrífuga Beckman mod. J2-21, con rotor Beckman, mod. JA-20.1, 115.0
- Microbalanza electrónica Mettler AE163
- Potter de vidrio de 20 ml, Afora
- Baño termostatizado Paratherm-I, Sulab
- Tubos de ensayo de plástico de 10 ml

- Pipetas de vidrio de 5 ml, Afora

4.12.2.3. EXTRACCION DEL ANP PLASMATICO

- Cartuchos Sep-Pack C_{18}, Millipore
- Jeringas de plástico de 20 ml, Luer
- Tubos de ensayo de plástico de 5 ml
- Tubos de ensayo de plástico de 10 ml
- Micropipetas de 50, 100, 250 y 1000 µl Transferpette, Brand
- Bomba de vacío mod. 6022050, Millipore
- ^{125}I-ANP, 500 c.p.m.
- Agua destilada
- Etanol Absoluto, Merck
- Etanol absoluto:Acido Acético 2% (86:14)
  - *Etanol absoluto, Merck.....14 ml
  - *Acido Acético 2%
    - Acido Acético glacial, Merck.....2 ml
    - Agua Destilada.....98 ml
- Nitrógeno -gas-, Oxhídrica Malagueña
- Aparato de 50 salidas para gas N^2
- Baño termostatizado Paratherm-I, Selecta

- Aparato medidor de pH, Micro pH 2000, Crison
- Patrones para pH, 4.0 y 7.1, Crison
- Contador LKB 1622 Multilab
- Ordenador LKB 1822

4.12.2.4. RADIOINMUNOANALISIS

- Buffer RIA-ANP pH: 7.4
- ANP standard (Peninsula Labs., California)
- ^{125}I-ANP, 3.000 c.p.m.
- Micropipetas de 250 y 1000 µl, Transfertt, Brand
- Tubos de ensayo de plástico de 5 ml
- Tubos de ensayo de plástico de 3 ml

4.12.3. METODO

4.12.3.1. PREPARACION DEL ANP, ^{125}I-ANP Y AcANP

ANP standard:

La preparación siguió exactamente la pauta marcada

por el fabricante, Laboratorios Península, California, Estados Unidos. El producto que nosotros hemos utilizado es el denominado por el fabricante Atrial Peptide (rat, 28 aa), con código 9103 y perteneciente al lote 011025.

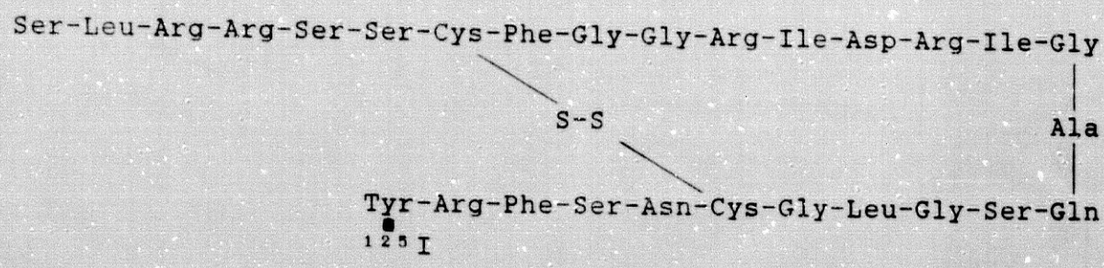
El vial liofilizado suministrado contiene 0.2 mg del mencionado producto, el cual se disuelve en 4 ml de solución RIA-ANP. De esta solución se toman con una micropipeta de punta recambiable alícuotas de 100 µl, que contienen cada una 5 ug del polipeptido, depositándose en tubos Eppendorf de plástico de 1 ml. Estas alícuotas se congelan como ***solución madre*** a -30° C.

La gran concentración existente en la solución madre la hace inoperante, por lo que se hace necesario emplear una solución más diluida, que denominaremos ***solución standard***. Para prepararla se toma una alícuota de solución madre (antes de congelarla o una vez descongelada a temperatura ambiente) que contiene 5 µg en 100 µl. A esta se le añaden 100 ml buffer RIA-ANP, obteniendo una solución de 5 µg en 100.000 µl. De esta se toman alícuotas de 100 µl, con lo que tendremos soluciones standard de 5 ng/100 µl, que introducidas en tubos Eppendorf de 1 ml se congelan a -30°C hasta el momento de su empleo.

^{125}I-ANP:

Este producto nos fue suministrado por Amersham International, Buckinghamshire, Inglaterra. El vial contiene [3-(125^{125}I)iodotyrosyl 28] rat ANP, correspondiente al código IM.1861; nosotros hemos empleado series de los lotes 45, 50 y 54.

El vial contiene producto radioactivo que rinden 74 kBq (2 uCi) de media.



Tal y como muestra el esquema superior, la molécula radioactiva se unió al ANP por el método de la cloramina T a nivel del último aminoácido de la cadena (tirosina), siendo purificado posteriormente por cromatografía líquida de alta resolución. La pureza radioquímica es mayor del 90 %, con menos del 3 % de ^{125}I en estado libre. Toda esta información ha sido suministrada por el fabricante (hoja informativa 11680 de Lab. Amersham), siendo extremos estos que no han podido ser confirmados por nosotros.

De acuerdo con las instrucciones del fabricante, el vial liofilizado con el producto mencionado se reconstruye con 1 ml de buffer RIA-ANP, obteniéndose a partir de esta solución dos tipos diferentes de alícuotas:

^{125}I-ANP para RIA: denominamos así a las alícuotas que -tras hacer los cálculos procedentes- arrojan aproximadamente 400.000 c.p.m., y que van a ser utilizadas para realizar el radioinmunoanálisis. Para conseguirlas se toman con una micropipeta de punta recambiable 100 µl de la solución inicial que se depositan en tubos de plástico Eppendorf de 1 ml, congelándose a -30°C hasta su uso.

^{125}I-ANP para Recuperación: estas alícuotas rinden 40.000 c.p.m. y serán utilizadas para determinar la proporción de ANP recuperado en el proceso de extracción. Se

obtienen tomando con una micropipeta de punta recambiable 10 µl de la solución inicial que se depositan en tubos Eppendorf de plástico y se congelan a -30°C hasta el momento de su uso.

La aplicación de ambas alícuotas queda expresado en páginas venideras, donde se explican detenidamente los procesos donde son empleadas.

AcANP:

Suministrado por Amersham International, Buckinghamshire, Inglaterra, en un kit conjunto con el ANP radioactivo, respondiendo ambos al ya mencionado código Amersham IM.1861, y perteneciendo al lote 3 todos ellos.

Según las especificaciones del fabricante, este anticuerpo obtenido en conejo tiene la siguiente especificidad:

Rat ANP (1-28)	100 %
Rat atriopeptin III (5-28)	60 %
Rat atriopeptin II (5-27)	61 %
Rat atriopeptin I (5-25)	31 %
Human ANP (1-28)	5.5 %
Human ANP (7-28)	0 %
ANP (18-28)	0 %

El vial suministrado por el fabricante se diluye en 2 ml de buffer RIA-ANP, agitándose durante un minuto manualmente y vertiéndola a un tubo de plástico de 15 ml. A esta solución se le añaden 12.5 ml del mismo buffer, agitándolo durante 15 min. a 4°C en un agitador circular. La solución así obtenida se guarda a 4°C desde donde se va cogiendo la cantidad necesaria para cada prueba.

4.12.3.2. OBTENCION DE MUESTRAS PLASMATICAS Y AURICULARES

Plasma: dos mililitros de sangre arterial -obtenida como quedó relatado en el apartado correspondiente a la autopsia (4.2.1.)-, se introducen en un tubo de plástico de 5 ml que contenía Heparina (55 UI), Inhibidor de Tripsina de soja (500 UI) y Apoprotinina (500 BAEE). Este tubo se mantenía en agitación contínua durante 3 min. a 4°C, siendo centrifugado inmediatamente a 4500 r.p.m. durante 15 min. y a la misma temperatura. El plasma sobrenadante se recoge con una pipeta Pasteur y se traspasa a un tubo de 3 ml que se congelaba a -30°C hasta el momento de su uso.

Aurículas: obtenidas como quedó expresado (4.2.1), se introdujeron en un potter de vidrio donde eran homogeneizadas manualmente mediante 20 golpes en una solución que contenía 2 ml de ac. acético 2%, Inhibidor de Tripsina de Soja (500 UI) y Apoprotinina (5000 BAE), proceso que se realizaba íntegramente a 4°C. La solución así obtenida se depositaba en un tubo de plástico de 5 ml y se llevaba a un baño con agua a 80°C donde se le mantenía por espacio de 5 minutos. Inmediatamente después, se centrifugaba a 4500 r.p.m. durante 5 min. a 4°C, dividiendo el sobrenadante en alícuotas de 300 µl que se congelaban a -30°C hasta su uso.

4.12.3.3.EXTRACCION DEL ANP PLASMATICO

Dicho proceso se llevaba a cabo filtrando el plasma a través de cartuchos Sep-Pack C_{18} que previamente debían de someterse a un proceso llamado de ***activación***. Dicho proceso pretende hidratar las sustancias sólidas que hay en el interior que han de actuar como lugares de retención del ANP. Para ello se

coge el cartucho -que tiene dos extremos de plástico cilíndricos- y se conecta uno de ellos (el más largo) a una Jeringa de 20 ml sin émbolo; el otro extremo era conectado a un aparato ideado por nosotros, en forma de "tridente", aunque en este caso con cuatro barras huecas.

A estas barras se le hicieron cada dos centímetros y medio y por una de sus caras, diez agujeros a los que se les conectaron puntas de plástico de un solo uso (mod. 44) de las que se usan en las micropipetas, de tal modo que encajaban perfectamente en el extremo corto del cartucho. El eje principal (equivalente al mango) al que estaban conectados todos los demás ejes se conectaba a una bomba de vacío, por lo que al funcionar este aparato se obtenía un vacío en todos los cartuchos que estaban conectados a este sistema.

Una vez montado todo el sistema, comenzaba el proceso de activación propiamente dicho, para lo cual se añadían 10 ml de Etanol absoluto a la jeringa y se conectaba la bomba de vacío, graduando la presión de aspiración de tal modo que esta se efectuara muy lentamente, *gota a gota*; este eluato se descartaba en su totalidad y se evacuaba por el sistema de vacio hasta un reci- piente preparado al efecto. Posteriormente se añadían 10 ml de Agua destilada, que también se descartaban en su totalidad.

La alícuota de plasma se descongela lentamente introduciéndola en la cámara fría a 4°C hasta que pasaba a estado líquido (aproximadamente 3 horas). En este momento se añaden 6 ml de ac. acético 2% y 50 µl de ^{125}I-ANP ajustado para que arrojara unos 500 c.p.m.

Para ello se cogía una alícuota de ^{125}I-ANP congelada y que sabemos que arrojaba unos 20.000 c.p.m., y se cuantificaba su actividad en el contador de centelleo; una vez conocido este dato con exactitud se diluía dicha alícuota con buffer RIA-ANP de tal modo que aparecieran unos 500 c.p.m. en 50 µl. Esta cantidad de radioactividad conocida nos sirve para

calcular la recuperación, tal como explicaremos posteriormente.

El plasma con el ac. acético 2% (6 ml) y el ANP radioactivo (50 µl) se introducen en la jeringa para ser filtrados por el mismo procedimiento de vacio; el eluato se descarta igualmente. Acto seguido se *lavan* los cartuchos con 5 ml de agua destilada.

Como paso postrero de la extracción se filtra a través de los cartuchos una solución de Etanol absoluto: Ac.Acético (86:14), cuyo eluato debe ser recogido, pues en él se encontraba el ANP. Es pues necesario desconectar las jeringas del sistema de vacío común que mezcla y desprecia los eluatos. De este modo, el cartucho unido a la jeringa se introduce en un tubo de plástico de 10 ml, se le añaden a las jeringas la solución mencionada y se filtraban presionando el émbolo.

El eluato así recogido se lleva a un baño mantenido a 37°C y se evapora bajo corriente de nitrógeno muy lentamente, de tal manera que no se formen olas en la superficie. Como normalmente se procesaban aproximadamente 30 tubos, era necesario utilizar un aparato evaporador que tuviera -al menos- treinta salidas. Con este fín se pudo utilizar el mismo aparato utilizado y descrito anteriormente para conectar múltiples cartuchos y hacer el vacío. Si el mango del aparato se conecta a una fuente de nitrógeno (en vez de a la bomba de vacío) y se colocan sus puntas de plástico de salida encima de los tubos, conseguimos un evaporador con las salidas necesarias. La salida de nitrógeno se ajustaba para que la lenta evaporación durase toda la noche.

A la mañana siguiente se llevan los tubos al contador gamma para calcular la recuperación. Este proceso es necesario para poder calcular las cantidades totales de ANP. Está basado en que el hecho de perder cierta cantidad de péptido durante la filtración es inevitable. Para saber cuánto se pierde,

añadimos una cantidad conocida de ANP marcado radioactivamente. Conociendola cantidad de actividad (c.p.m.) que tenían los 50 ul que añadimos el día anterior en el proceso de extracción, si se recuperase el 100%, en los tubos que han sido evaporados debería aparecer la misma radioactividad que tienen una serie de tubos que no han sufrido ningún proceso de extracción; estos tubos son denominados de *referencia* y permanecen al lado de los otros en el baño toda la noche. Si aparece una cantidad menor de radioactividad, será una porción de la referencia, porción que equivale al tanto por ciento de ANP recuperado según la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Recuperación} = \frac{\text{c.p.m. tubo x 100}}{\text{c.p.m. Referencia}}$$

Se supone que la misma cantidad que se recupera -o que se pierde- de ANP radioactivo es la que se pierde o recupera del ANP de la muestra, pues ambos sufren el mismo proceso y el hecho de estar marcado radioactivamente no modifica la cinética de este polipéptido (GUTKOWSKA, 1984). Este dato (% de recuperación) es imprescindible a la hora de hacer los cálculos finales.

4.12.3.4. RADIOINMUNOANALISIS

Preparación del ^{125}I-ANP: se descongela una alícuota de ^{125}I-ANP para RIA de las que congelamos con 400.000 c.p.m. aproximadamente en un tubo Eppendorf. Según la pauta radioinmunoanalítica utilizada, es necesario añadir 50 µl de esta solución que contengan alrededor de 3.000 c.p.m. Para ello diluimos con buffer RIA-ANP la alícuota recién descongelada hasta ajustarla a los requerimientos de la técnica.

Preparación del ANP standard o patrón: una alícuota de solución standard en un tubo Eppendorf se descongela y se le añaden con técnica cuidadosa 1.52 ml de buffer RIA-ANP, con lo que obtenemos una solución 1 µM; esta solución se agita suavemente durante un minuto y se cogen 100 µl a los que se añaden 0.9 ml de buffer RIA-ANP, obteniéndose una solución 0.1 µM; esta solución se agita de igual modo y se recogen 100 µl a los que se añaden 0.9 ml de buffer RIA-ANP, con lo que obtenemos una solución 0.01 µM de ANP.

Preparación del AcANP: en primer lugar se calcula la cantidad que nos hará falta, teniendo en cuenta que cada uno de los tubos va a necesitar 50 µl de Ac. Una vez conocidos los mililitros necesarios, cogemos del anticuerpo mantenido a cuatro grados la mitad de esta cantidad necesaria, diluyendo con una cantidad igual de buffer RIA-ANP (dilución 1:1).

Preparación de las muestras: una vez contada la actividad de los tubos donde se evaporó el eluato tras la filtración -para calcular la recuperación-, redisolvemos los extractos en 200 µl de buffer RIA-ANP.

Preparación de la Curva Patrón y Muestras: se añaden cada uno de los componentes a un tubo de plástico de 5 ml en este orden: buffer RIA-ANP, standard o muestra, Ac-ANP y ^{125}I-ANP.

Las cantidades quedan recogidas en la siguiente tabla, siendo el orden en que se depositaban el siguiente: buffer, AcANP, standard o muestra y ^{125}I-ANP.

CONTENIDO	BUFFER (µl)	STANDARD O MUESTRA (µl)	AcANP (µl)	^{125}I-ANP (µl)
Actividad Total	350	- - -	- -	50
Blanco	300	50	50	- -
Referencia	300	- - -	50	50
0.1 fm/t	290	10 (0.01 µM)	50	50
1 "	290	10 (0.1 µM)	50	50
2 "	280	20 (0.1 µM)	50	50
5 "	250	50 (0.1 µM)	50	50
10 "	200	100 (0.1 µM)	50	50
20 "	280	20 (1 µM)	50	50
50 "	250	50 (1 µM)	50	50
100 "	200	100 (1 µM)	50	50
Problemas	250	50 µl	50	50

Todas la muestras se procesaban por <u>duplicado</u>. Una vez preparados todos los tubos se agitan brevemente en un agitador vibratorio (3-4 seg.) y pasan a incubarse durante 72 horas a 4°C y en oscuridad, que se consegue metiendo las gradillas en una caja de cartón que a su vez se envolvía en papel de aluminio. Durante este tiempo es importante no movilizar en absoluto los tubos.

La última parte del proceso radioinmunoanalítico consiste en precipitar los complejos Ag-Ac formados, realizar el contaje de las radiaciones gamma y hacer los cálculos.

Para ello se pesan 1.6 gr de Norit y 0.16 gr de Dextrano y se disuelven en 50 ml de buffer RIA-ANP por agitación durante 30 min., proceso que ha de llevarse a cabo *por completo* a 4°C, por lo que se realizó en cámara frigorífica. Este producto es el que actúa como *sustancia precipitante*.

Una vez bien disuelto, se van añadiendo 300 µl de esta solución con una micropipeta mientras la solución se mantiene en agitación a 4ºC. Inmediatamente se centrifugan los tubos a 3.500 r.p.m. durante 30 min. a 4ºC.

El eluato se recoge por decantación inclinándo los tubos centrifugados sobre otros de plástico de 3 ml; este sobrenadante contiene al ^{125}I-ANP, en cantidad variable dependiendo de la cantidad de ANP que hubiera en la muestra problema (o en los patrones). La actividad se determina en un contador de radiaciones gamma (Multigamma LKB 1216 Counter conectado a un ordenador de la misma casa comercial (LKB Computer 1218).

Los cálculos de las concentraciones se realizan aplicando la siguiente fórmula:

$$(\text{fmol/tubo}) \times (4) \times (\%\ \text{recuperación}) = \text{fmol extracto}$$

$$\frac{\text{fmol extracto}}{2} = \text{fmol/ml}$$

En la actualidad y desde 1987, hay una tendencia a expresar los datos en pg/ml en sangre y en pm/mg en aurícula, por lo que a los datos obtenidos en fm/ml hay que expresarlos en dichas unidades, lo que se hace según los datos aquí expuestos: 1 pm = 3076.92 pg; 100 fm/ml = 0.1 pm/ml; 100 pm/ml = 307.7 pg/ml

4.13. FOSFOLIPIDOS DEL SURFACTANTE

4.13.1. FUNDAMENTO

El surfactante pulmonar está compuesto principalmente por fosfolípidos, cuya biosíntesis, exacta composición y mecanismos de acción han sido ya expuestos.

Su mecansimo de acción les obliga a permanecer en la parte más externa de la interfase gas-líquido que conforman el aire y la sangre como elementos principales en el proceso respiratorio; es pués el elemento que contacta directamente con el aire y con todas las sustancias que con éste -o en su lugar- puedan penetrar. No es, por lo tanto, descabellada la idea de pensar que la acción del agua puede producir una serie de alteraciones en esta capa que puedan ser, en primer lugar, diferenciadoras de una sumersión vital respecto a una postmortal, y en segundo lugar, diferenciadoras de una sumersión en agua dulce respecto a una en agua salada.

Para su posible aplicación práctica a la Ciencia

MATERIAL Y METODO

Forense partimos de la base de la existencia de diversos fosfolípidos con diferente composición, lo que les hace comportarse de modo distinto en desde la perspectiva biofísica y bioquímica; además, la proporción entre los diversos fosfolípidos que conforman el cien por cien del surfactante pulmonar es constante para cada especie, tanto en el tejido pulmonar como en el lavado endobronquial que pueda realizarse. Es por ello que en una primera aproximación práctica al problema, nos interesa ante todo la relación existente entre los principales fosfolípidos, que es posible cambie ante diferentes circunstancias.

En estos múltiples abajos sobre el tema hay un factor *casi* común a la hora de estudiar la proporción de fosfolípidos del surfactante, y es el método empleado para la extracción, diferenciación y cuantificación de estos elementos; con muy pequeñas modificaciones y adaptaciones de técnica, la mayoría de los autores emplean una extracción en cloroformo:metanol, desarrollo por cromatografía en capa fina y cuantificación del fósforo como medio indirecto de conocer la cantidad de fosfolípido en una muestra.

La **extracción fosfolipídica** se lleva a cabo en una mezcla de metanol:cloroformo. El primero tiene la propiedad de arrastrar consigo a las sustancias hidrosolubles, mientras el cloroformo capta a las sustancias con composición lipídica -como lo son los diversos fosfolípidos-. Durante la extracción, la fase clorofórmica sufre una serie de lavados con agua destilada o soluciones acuosas más o menos saturadas con el objeto de extraer la mayor cantidad de elementos contaminantes. Finalmente se evapora bajo corriente de nitrógeno para evitar oxidaciones que falsearían los resultados, almacenándose en congelador hasta el momento de sus uso.

La **separación cromatográfica en capa fina** ha sido la manera clásica de estudiar los diferentes fosfolípidos por ser un método sencillo, que no necesita aparataje especial y que ofrece una alta fiabilidad. Las placas empleadas han sido las de

alta resolución (High Performance Thin Layer Chromatograpy, HPTLC), aconsejadas por los diferentes autores y empleadas de manera casi exclusiva en los últimos años. Las hemos adquirido directamente de la casa Merck. El desarrollo se lleva a cabo en una atmosfera saturada utilizando para ello solventes orgánicos como fase móvil, siendo la fase sólida carbonato cálcico sin contenido en fósforo.

Finalmente, la cuantificación del fósforo se hizo siguiendo la pauta de Bartlett (1955), una de las más empleadas por su sencillez y fiabilidad.

La técnica empleada finalmente en este trabajo ha sido el fruto de una cuidadosa valoración de las diferentes condiciones a que iba estar sometida nuestra muestra y de lo que pretendíamos encontrar, tal y como quedará detallado en la discusión del método.

El estudio de la composición fosfolipídica del tejido pulmonar y del lavado endobronquial con el fin de poder detectar cambios en las diferentes proporciones de fosfolípidos en las diversas circunstancias experimentales, es el segundo de los parámetros que se estudian en la presente Tesis Doctoral con carácter de novedad absoluta -según las referencias en nuestro poder- en su aplicación al diagnóstico de la sumersión en la ciencia forense.

4.13.2. MATERIAL

4.13.2.1.OBTENCION DE MUESTRAS DE TEJIDO Y LAVADO

- Frascos de plástico estériles de 50 ml,Luer
- Balanza de precisión H10W, Mettler
- Agua dulce (red potable de Granada)
- Agua salada (la misma usada para sumersión)
- Jeringa plástico de 20 ml, Luer
- Recipiente plástico de 20x20x8, Tapper-Wax
- Probeta aforada de 50 ml, Afora
- Tijeras quirúrgicas de hoja de 5 cm.
- Bisturí de hoja recambiable

4.13.2.2. EXTRACCION DE FOSFOLIPIDOS

- Cloroformo, Merck
- Metanol, Merck
- Agua Destilada

- Solución de extracción (Folch, 1955)
  *Cloruro Magnésico.....0.04%
  *Cloruro Sódico.....0.73%
  *Cloruro Potásico.....0.88%

- Embudo de decantación de 50 ml, Afora

- Pipetas de cristal aforadas de 5 y 10 ml, Afora

- Solución Cloroformo:Metanol (2:1)
  *Cloroformo, Merck.....100 ml
  *Metanol, Merck.....50 ml

- Tubos de ensayo de vidrio de 10 ml, Afora

- Nitrógeno gas, Oxhídrica Malagueña

- Evaporador de Nitrógeno de seis salidas Afora

- Vasos de precipitado de 50 ml, Afora

4.13.2.3. SEPARACION CROMATOGRAFICA EN CAPA FINA

- Placas cromatográficas HPTLC F_{256}, Merck

- Microjeringas de 10 µl, Hamilton

- Cuba de cristal para desarrollo de placas cromatográficas de 20x25x10 con tapadera, Desaga, Heidelberg

- Solución de desarrollo:
  *Cloroformo.....40 ml
  *Metanol.....20 ml
  *Eter.....30 ml
  *Acido Acético.....10 ml
  *Acido Bórico.....1.8 gr

- Campana extractora, Vallés

4.13.2.4. IDENTIFICACION Y CUANTIFICACION DEL FOSFORO

- Microespátula

- Papel de aluminio, Reynolds

- Tubos de ensayo de cristal de 10 ml, Afora

- Hornillo eléctrico calefactor, Durcan

- Pinzas quirúrgicas de boca plana

- Acido Perclórico 70%, Carlo Erba

- Molibdato Amónico 5%
  *Molibdato Amónico, Merck.....0.5 gr
  *Agua Destilada, c.s.p.....100 ml

- Solución de Amidol:Bisulfito Sódico
  *Bisulfito Sódico 40%
    Bisulfito Sódico, Merck.....4 gr
    Agua Destilada, c.s.p.....10 ml
  *Solución de Amidol
    Amidol, Merck... .....100 mg
    Agua destilada, c.s.p.....10 ml

- Baño termostatizado Paratherm I, Sulabo

- Recipiente plástico 60x30x15 con agua fría

- Centrífuga Ujis, mod. 03400

- Fósforo: solución madre.
  *Solución madre (1000 µg/ml)
  KH_2PO_4.....1.079 gr
  Agua Destilada.....250 ml

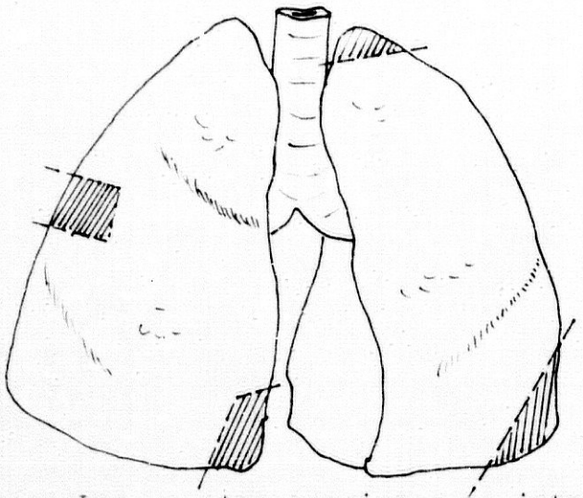
- Espectrofotómetro UV-V, Shimadzu, mod. 160

4.13.3. METODO

OBTENCION DE MUESTRAS DE TEJIDO Y LAVADO

Tejido Pulmonar: las múltiples pruebas realizadas durante la puesta a punto de la técnica nos inclinaron a escoger el método de FOLCH (1953) para realizar dicha extracción.

Para ello se tomaban 2 gr. de tejido pulmonar fresco en los animales control y su equivalente en los ahogados, de cuatro zonas que se consideraron representativas: 0.5 gr del lóbulo superior del pulmón izquierdo, 0.5 gr del inferior y externo del mismo pulmón, 0.5 gr del lóbulo medio del pulmón derecho y 0.5 gr del lóbulo inferior y medial del mismo pulmón, tal y como queda reflejado en el siguiente esquema:



Las cuatro porciones se introducen juntas en un recipiente donde son homogeneizadas a 3.500 r.p.m. durante 1 minuto en una solución compuesta por 20 ml de cloroformo y 10 ml de metanol. La muestra resultante pasa a un embudo de decantación de 50 ml y se agita; tras separarse las fases se recoge la clorofórmica en un vaso de precipitado de 50 ml, volviéndose a introducir en un nuevo embudo donde se le añaden 6 ml de solución de Folch, repitiendo la operación de extracción. Finalmente, la fase clorofórmica resultante se lava con 20 ml de agua destilada, y una vez recogida se evapora a sequedad lentamente en baño termostatizado a 37°C bajo corriente de nitrógeno.

El residuo resultante se redisuelve en 500 µl de cloroformo:metanol (2:1, preparación extemporánea) y se divide en 6 alícuotas de 50 µl, se llevan a sequedad bajo corriente de nitrógeno y, herméticamente cerrados en esta atmósfera nitrogenada, los tubos se congelan a -30°C hasta el momento de su uso.

Lavado endobronquial: el método aquí empleado para la extracción de fosfolípidos es el de BLIGH y DYER (1955), que no es sino una modificación del anterior de Folch. Las pruebas preliminares realizadas en la puesta a punto nos inclinaron a escogerlo para la extracción desde el medio acuoso.

El proceso de lavado: la pieza anatómica que

representan los pulmones, preparada tal y como se indicó en el apartado 4. 1. de este capítulo, se coloca en posición de tal modo que la tráquea quede en posición vertical.

A través de la tráquea se introdujeron 40 ml de una solución de lavado -en dos tandas de 20 ml- por medio de una jeringa de 50 ml. Para ello se introducía el extremo de la jeringa en la tráquea y con los dedos índice y pulgar de la mano izquierda se presionaba esta unión de modo que no pudiera regurgitar líquido; con la mano derecha y muy lentamente, se presionaba el émbolo de la jeringa hasta vaciarla. Una vez vacía, se sacaba la jeringa y se invertía el pulmón, cogiéndolo de los lóbulos inferiores y dejando libre la traquea, de tal manera que pudiera drenar el líquido contenido en un recipiente de plástico preparado al efecto. De este modo se conseguían recuperar entre 33 y 37 de los 40 ml inicialmente introducidos. La cantidad exacta se conocía introduciendo el líquido en un matraz aforado de 50 ml. Posteriormente se enrasaba hasta 40 ml con la misma solución de lavado.

La solución de lavado variaba dependiendo de las series estudiadas. La serie control se lavaba con una solución original de Folch (1955), mientras que las series de sumersión lo hacían con el mismo agua en que se produjo la muerte.

Para realizar la extracción con el ya mencionado método de Bligh y Dyer, se toma una alícuota de 8 ml del lavado endobronquial y se extraen un embudo de decantación de con 10 ml de cloroformo y 20 ml de metanol; se añadían a continuación 10 ml de cloroformo y se repetían las operaciones de agitación y reposo; finalmente se adicionaban 10 ml de agua destilada, se agitaba y, tras reposar, se recogía la fase clorofórmica inferior en un vaso de precipitado de cristal de 50 ml, decantándose inmediatamente a un tubo de ensayo de 10 ml de cristal y con fondo cónico que se introducía en un baño termostatizado a 37°C para ser evaporado bajo corriente de nitrógeno muy lentamente. El residuo seco se redisolvía en 400 µl de cloroformo:metanol (2:1,

preparación extemporánea) de donde se tomaban alícuotas de 50 µl que se introducían en tubos cristal de 10 ml con tapón de rosca para ser evaporados en atmósfera de nitrógeno y congelados hasta su uso.

Todo el proceso de extracción se realizó el mismo día de la muerte de los animales.

SEPARACION CROMATOGRAFICA EN CAPA FINA (HPTLC)

Se tomó una de las alícuotas y se descongelaba a temperatura ambiente durante 30 min., añadiéndole a continuación 40 µl de cloroformo:metanol (2:1, preparación extemporánea) y agitando 20 seg. en agitador eléctrico. Con una microjeringa se toman 10 µl y se depositan en el extremo inferior de la placa (previamente activa por calentamiento a 100ºC durante 1 hora) a 1 cm por encima del borde inferior y dejando un margen lateral. La siembra se hace en depósitos lineales y sucesivos de 1 cm de longitud y dejando entre ellos 1 cm de separación.

Una vez colocadas todas las muestras -que en nuestras condiciones normales eran 8 por placa- se introducían en la cuba de desarrollo, cuya fase móvil estába compuesta por 40 ml de cloroformo, 20 ml de metanol, 30 ml de éter, 10 ml de ácido acético y 1.8 gr de ácido bórico.

El proceso de desarrollo se realizaba a temperatura ambiente y hasta que el frente estaba 1 cm por debajo del borde superior, lo que en nuestras condiciones standard ocurría a las dos o dos horas y nedia.

Una vez alcanzado el desarrollo conveniente, se sacaba la placa y se dejaba secar a temperatura ambiente, acelerando este proceso al poner la placa en una campana extractora en funcionamiento.

IDENTIFICACION Y CUANTIFICACION DEL FOSFORO

La placa, una vez seca, se revelaba por exposición a vapores de iodo. La saturación de vapor de iodo se conseguía colocando 3 gr de iodo en un vasito de porcelana e introduciéndolo dentro de la cuba, de manera tal que se van liberando los vapores poco a poco hasta la saturación. Una vez bien reveladas, rápidamente y antes de que desaparecieran -pues el revelado es efímero- se delimitan, realizando un surco que nordeaba por completo cada una de las manchas a estudiar.

A continuación se raspa el contenido de cada mancha, siendo sumamente cuidadosos en la recuperación, y se vierte el resultante en tubos de ensayo de 10 ml de cristal.

Se procede seguidamente a una digestión en caliente añadiendo a cada tubo 0.4 ml de ácido perclórico 70%; en unos cuatro minutos se produce este hecho, lo que se puede observar por el cambio de color que va virando del amarillo oscuro al blanco casi transparente. Este proceso se lleva a cabo en la cámara extractora para evitar la acción irritante de los gases desprendidos. Una vez terminada la digestión se dejan enfriar a temperatura ambiente.

Una vez fríos, a todos los tubos se les añaden 4.2 ml de agua destilada Se agitan bien en un agitador eléctrico (5 seg) y se les añaden 0.2 ml de solución de molibdato amónico 5%, volviendo a agitar bien; como último paso se añaden otros 0.2 ml de solución de amidol, agitando 10 seg en el aparato electrico. Los tubos se ponían en un baño termostatizado con agua hirviendo (graduar a 100° C) durante 7 min. exactamente. Pasado este período se sacan y se enfrían 4 minutos bajo un chorro de agua. Una vez enfriados, las gradillas se sacaban del recipiente y se dejaban en reposo a temperatura ambiente hasta que se cumplían 15 min. exactos desde el momento en que se sacaron del agua hirviente (22 min. desde que se introdujeron en este).

Tras el reposo se centrifugaban los tubos durante 2 min. a 5.000 r.p.m. en temperatura ambiente.

La *lectura espectrofotométrica* se efectuaba a 830 nm, habiendopreparado previamente una curva patrón de 2, 4 y 8 µg de fósforo contra un blanco. Los cálculos se realizaban a partir de la curva patrón.

4.14. METODO ESTADISTICO

Con objeto de comparar las diferentes variables entre las tres series (Control, Agua Dulce y Agua Salada), se establecieron dos tipos de comparaciones.

Si la variable estaba medida en lugares distintos del mismo animal (sangre arterial y venosa; lavado y tejido pulmonar), se realizó el análisis de un diseño con tres factores:

a) El factor grupo, de efectos fijos, con tres niveles: control, agua dulce y agua salada.

b) El factor lugar, también de efectos fijos y, normalmente con dos niveles (arterial y venoso).

c) El factor conejo, de efectos aleatorios y de quince niveles; tal factor estaba anidado en el factor grupo.

Es decir, se realizó un diseño anidado de tres factores. Como resultados de tal análisis se obtenía si los

factores grupo y lugar ejercían influencia en la variable objeto del estudio. Por último, se obtenía constancia numérica de si existía interacción Grupo-Lugar. Dicha interacción nos diría si las diferencias (posibles) encontradas entre grupos dependían del lugar, o si las diferencias entre lugares dependían de los grupos.

En el caso de que en la tabla del análisis de la varianza fuera significativa la interacción, se pasaba a realizar las comparaciones entre grupos dentro de lugar o entre lugares dentro de grupo. Para ello se empleaba la varianza ponderada debida a conejos y la de la interacción total de conejos-grupos-lugares.

Si la interacción estaba lejos de la significación la comparación estaba automáticamente resuelta. Si el efecto de grupo era significativo, se pasaba a la comparación entre ellos a través de las comparaciones por parejas usando la "t" de Tukey, que es la procedente ante tamaños de muestra iguales.

Cuando la variable estaba medida en un mismo lugar, para comparar los grupos se realizó un análisis de la varianza de una vía, que cuando era significativo, nos llevaba a realizar todas las comparaciones por pareja, usando otra vez la "t" de Tukey por las razones ya expuestas.

Por último, se realizó un estudio de la matriz de correlaciones entre todas las variables (todas contra todas) con objeto de encontrar las posibles relaciones entre ellas.

5. RESULTADOS

Los resultados obtenidos para cada uno de los marcadores quedan expuestos en tres diferentes lugares:

1. Tabla de Resultados, donde se expresan los valores alcanzados en cada uno de los animales.

2. Figura representativa del marcador correspondiente, que expresa el resultado del valor medio.

3. Tabla estadística donde quedan expresadas numéricamente las diferencias significativas ($p<0.05$).

Con objeto de evitar reitaraciones innecesarias en todas y cada una de las tablas, y habiéndose determinado todos los marcadores en los mismos lugares, exponemos a continuación las claves de identificación para todos los casos:

A: sangre o plasma arterial.
V: sangre o plasma venoso.
A.D.: aurícula derecha.
A.I.: aurícula izquierda.

Serie I: Control
Serie II: Agua Dulce
Serie III: Agua Salada
Serie IV: Inmersión

RESULTADOS

PESO ANIMAL
(gramcs)

TABLA: I

SERIE:	CONTROL	A. DULCE	A. SALADA
ANIMAL			
1	1.500	1.600	1.440
2	1.600	1.540	1.400
3	1.565	1.680	1.425
4	1.690	1.750	1.840
5	1.410	1.500	1.550
6	1.520	1.630	1.630
7	1.600	1.750	1.280
8	2.000	1.650	1.450
9	1.620	1.380	1.520
10	1.410	1.520	1.350
11	1.380	1.600	1.570
12	1.410	1.520	1.720
13	1.600	1.200	1.680
14	1.530	1.350	1.550
15	1.280	1.410	1.200
$\bar{x}$	1.541	1.538	1.507
S.D.	0.169	0.154	0.170
C.V.	10.941	10.010	11.280

PESO ANIMAL

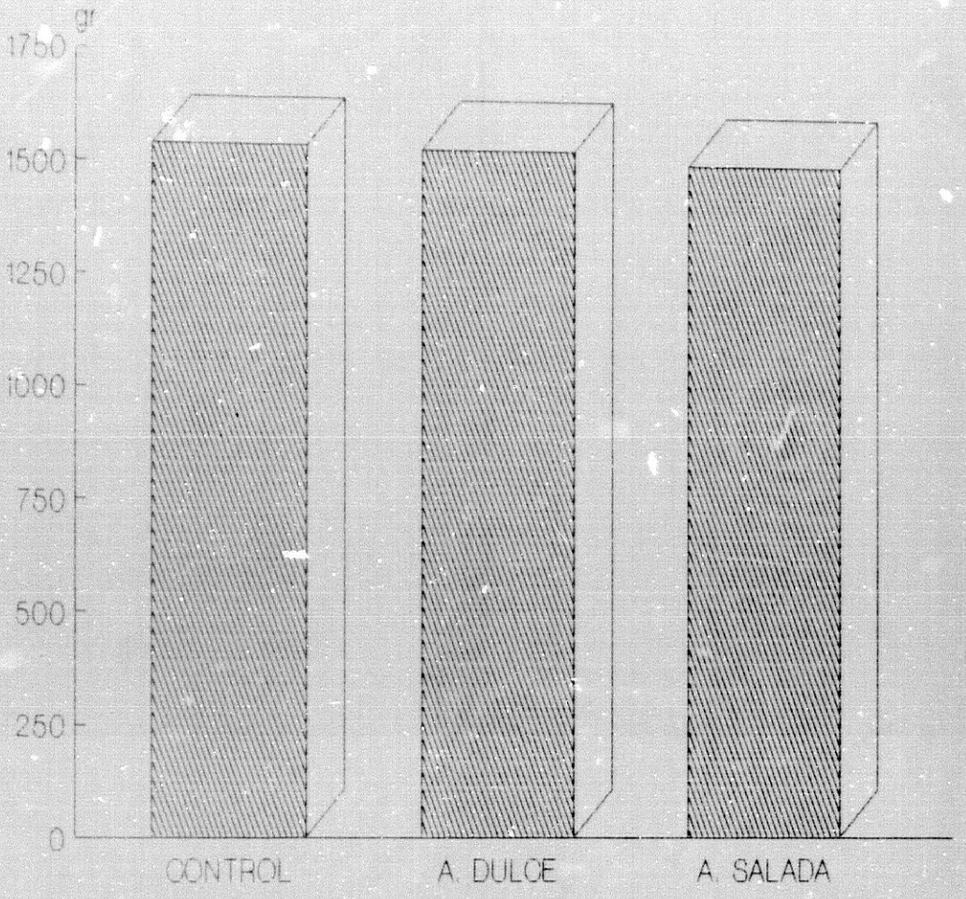


TABLA Ib

DIFERENCIAS ENTRE SERIES

No hay diferencias estadísticamente significativas entre las tres series.

PESO PULMONAR REAL (R) Y ESTIMADO (E)
(gramos)

TABLA: II

SERIE:	CONTROL	A. DULCE		A. SALADA	
PESO:	R	R	E	R	E
ANIMAL					
1	12.22	23.58	11.04	23.75	9.94
2	9.72	20.34	10.63	20.65	9.66
3	13.56	32.10	11.59	22.35	9.83
4	11.93	27.24	12.08	25.12	12.69
5	10.32	22.02	10.35	23.90	10.69
6	11.31	22.94	11.25	20.14	11.25
7	10.81	25.66	12.08	17.30	8.83
8	13.39	27.98	11.39	26.15	10.01
9	10.99	26.46	9.52	20.46	10.48
10	11.33	31.20	10.49	23.18	9.31
11	7.53	35.62	11.04	21.03	10.83
12	9.10	25.04	10.49	36.56	18.87
13	10.41	22.48	8.28	19.47	11.59
14	10.77	33.67	9.32	20.91	10.69
15	9.58	24.74	9.73	20.15	8.28
$\bar{x}$	10.86	26.72	10.62	22.07	10.86
S.D.	1.57	4.57	1.06	2.64	2.47
C.V.	6.93	5.85	10.05	8.36	22.77

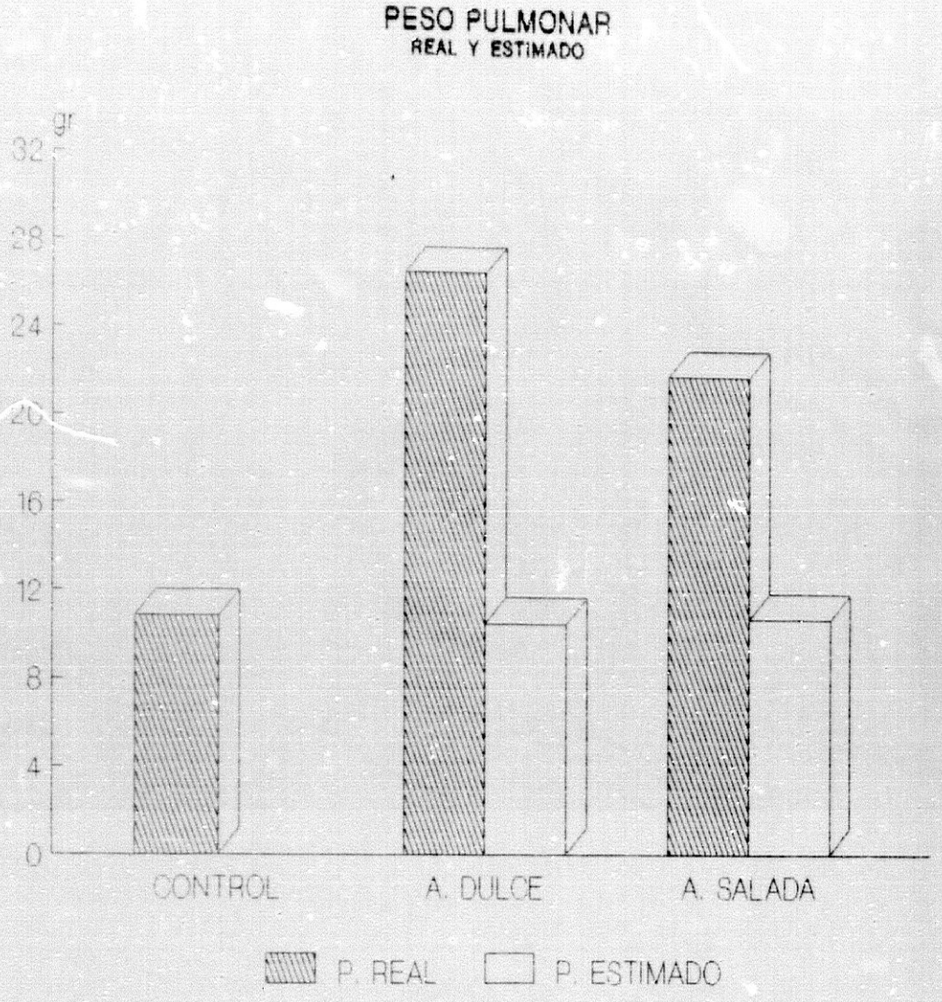


TABLA IIb

DIFERENCIAS ENTRE SERIES

PESO REAL

SERIES	t_{exp}	g.l.	SIGNIF.
I-II	11.42	42	p<0.001
I-III	8.55	42	p<0.001
II-III	2.37	42	p<0.001

PESO ESTIMADO

No hay diferencias estadísticamente significativas entre las tres series.

INCREMENTO DEL PESO PULMONAR
(gramos); (porcentaje)

TABLA: III

SERIE:	AGUA DULCE		AGUA SALADA	
PESO:	gr	%	gr	%
ANIMAL				
1	12.54	113.6	13.82	139.0
2	9.71	91.4	10.99	113.7
3	20.51	176.9	12.52	127.4
4	15.16	125.6	12.43	126.5
5	11.67	112.8	13.21	123.6
6	11.69	103.9	8.89	79.0
7	13.59	112.5	8.46	95.8
8	16.59	145.8	16.14	161.2
9	16.94	177.9	9.98	95.2
10	20.71	197.5	13.87	149.0
11	24.58	222.6	10.20	94.2
12	14.55	138.7	17.69	93.7
13	14.20	171.5	7.88	67.9
14	24.36	261.4	10.22	95.6
15	15.01	154.2	11.86	143.2
$\bar{x}$	16.12	153.8	11.20	113.7
S.D.	4.54	47.9	2.47	27.4
C.V.	28.18	31.2	22.08	24.1

INCREMENTO DEL PESO PULMONAR

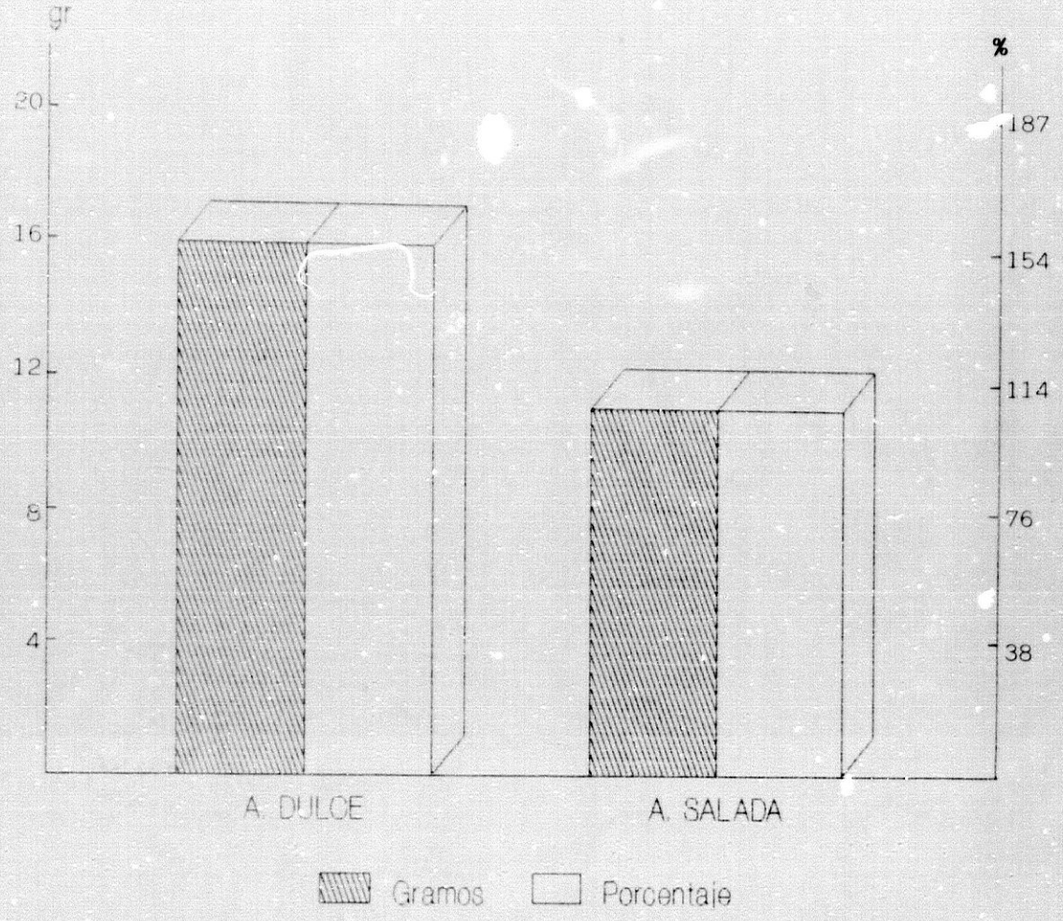


TABLA IIIb

DIFERENCIAS ENTRE SERIES

INCREMENTO PESO (gramos)

SERIES	t_{exp}	g.l.	SIGNIF.
II-III	3.44	42	p<0.001

INCREMENTO PESO (porcentaje)

SERIES	t_{exp}	g.l.	SIGNIF.
II-III	3.78	42	p<0.001

PESO DEL ESTOMAGO
(gramos)

TABLA IV

SERIE:	CONTROL	A. DULCE	A. SALADA
ANIMAL			
1	76.51	78.01	77.02
2	82.15	88.62	57.75
3	80.85	83.56	86.22
4	89.03	82.00	78.89
5	76.49	96.35	79.93
6	83.15	85.93	75.63
7	88.71	86.75	75.57
8	86.02	91.17	86.26
9	79.58	92.31	78.92
10	70.01	90.55	74.29
11	66.27	73.85	80.50
12	72.16	71.02	95.01
13	73.11	65.69	86.30
14	79.48	70.44	88.72
15	63.57	67.23	70.05
$\bar{x}$	81.91	81.55	79.35
S.D.	5.66	9.88	8.84
C.V.	15.72	12.11	11.14

PESO DEL ESTOMAGO

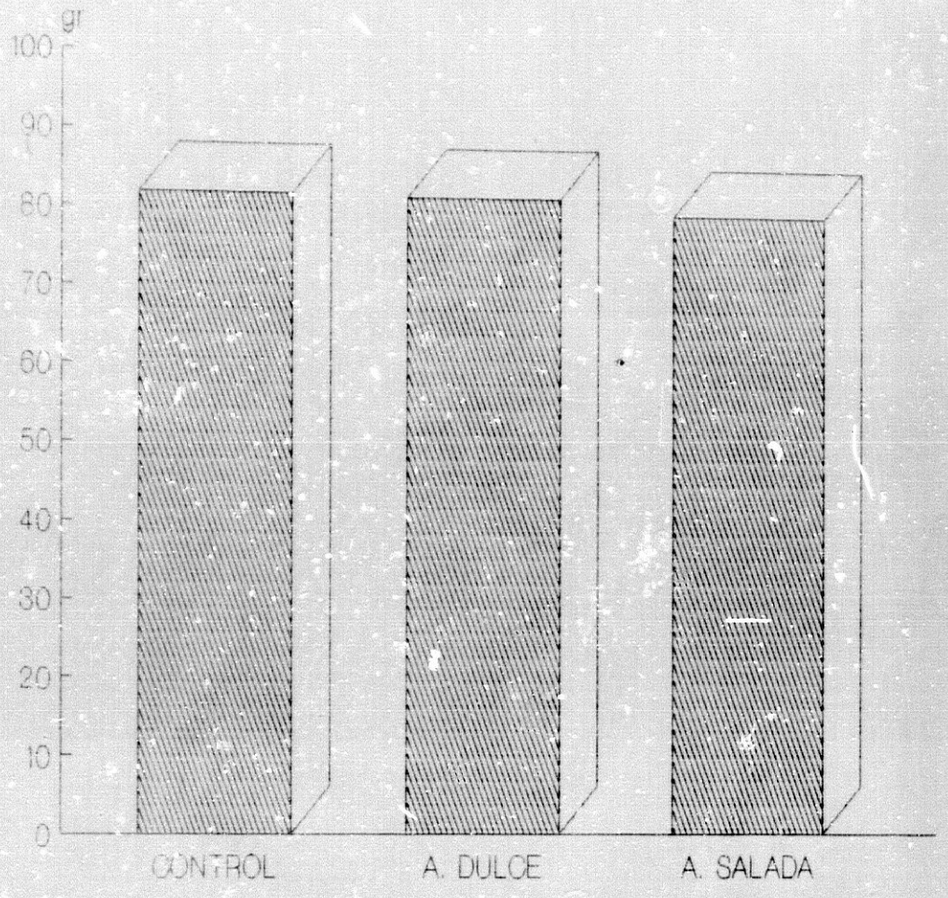


TABLA IVb

DIFERENCIAS ENTRE SERIES

No hay diferencias estadísticamente significativas entre las tres series.

COMPONENTES SOLIDOS Y LIQUIDOS DEL ESTOMAGO
(gramos)

TABLA V

SERIE:	CONTROL		A. DULCE		A. SALADA	
COMPONENTE:	S	L	S	L	S	L
ANIMAL						
1	66.15	3.2	67.32	3.8	66.89	4.2
2	72.61	3.7	74.11	4.1	47.12	3.8
3	69.15	4.5	73.26	4.3	73.11	4.4
4	75.38	2.9	73.67	3.3	67.08	3.7
5	67.41	3.7	87.04	6.0	67.64	3.5
6	73.51	4.8	74.88	4.5	63.11	3.3
7	88.70	5.5	74.91	3.7	64.67	4.7
8	73.25	2.5	80.07	3.7	75.23	5.1
9	68.79	3.3	79.12	4.3	68.00	4.1
10	70.01	3.7	80.00	5.1	63.95	5.2
11	66.27	4.3	64.51	4.8	71.12	4.7
12	72.16	4.8	63.17	4.7	80.78	4.1
13	73.00	3.7	58.55	3.6	74.19	3.9
14	68.40	4.9	62.19	3.2	77.64	4.3
15	63.57	5.0	61.00	4.1	62.99	4.7
$\bar{x}$	71.23	4.0	71.58	4.2	68.25	4.2
S.D.	5.84	0.9	8.40	0.7	8.01	0.6
C.V.	8.19	21.6	11.70	17.6	11.74	13.2

COMPONENTES SOLIDOS Y LIQUIDOS
ESTOMAGO

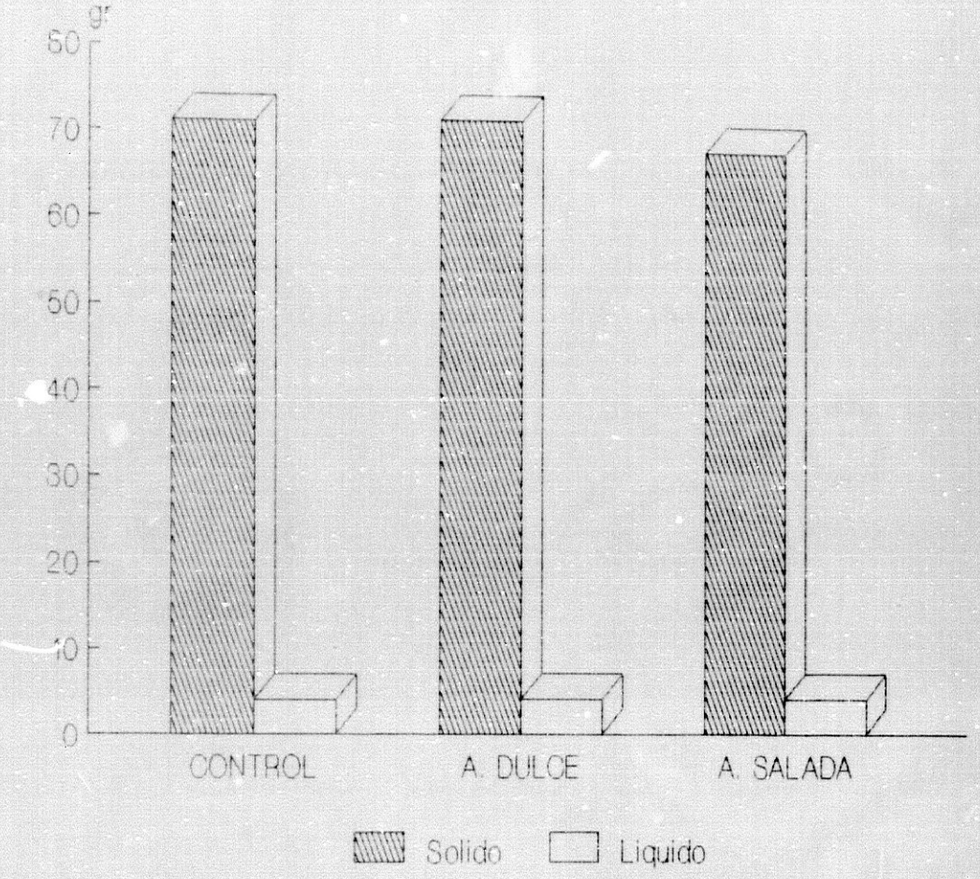


TABLA Vb

DIFERENCIAS ENTRE SERIES

COMPONENTES SOLIDOS

No hay diferencias estadísticamente significativas entre las tres series.

COMPONENTES LIQUIDOS

No hay diferencias estadísticamente significativas entre las tres series.

TIEMPO DE APARICION DEL HONGO DE ESPUMA
TIEMPO EN MORIR
(minutos)

TABLA VI

SERIE:	AGUA DULCE		AGUA SALADA	
TIEMPO:	H	M	H	M
ANIMAL				
1	1.54	3.37	0.47	2.18
2	2.51	4.15	1.03	2.11
3	2.11	2.47	0.51	1.48
4	1.38	2.35	2.11	2.40
5	2.22	4.35	2.15	3.11
6	2.22	3.45	0.45	2.17
7	0.35	3.18	1.40	2.27
8	1.30	2.32	3.08	4.17
9	2.23	3.12	2.12	3.15
10	2.44	3.35	2.40	3.08
11	2.21	4.15	2.00	2.11
12	2.23	3.20	2.12	4.03
13	1.42	2.38	2.40	3.41
14	2.20	4.52	2.25	2.40
15	1.52	3.17	1.03	2.38
$\bar{x}$	2.24	3.30	2.10	3.08
S.D.	0.58	0.73	0.82	0.76
C.V.	31.67	22.19	48.37	27.25

TIEMPO HONGO DE ESPUMA
TIEMPO EN MORIR

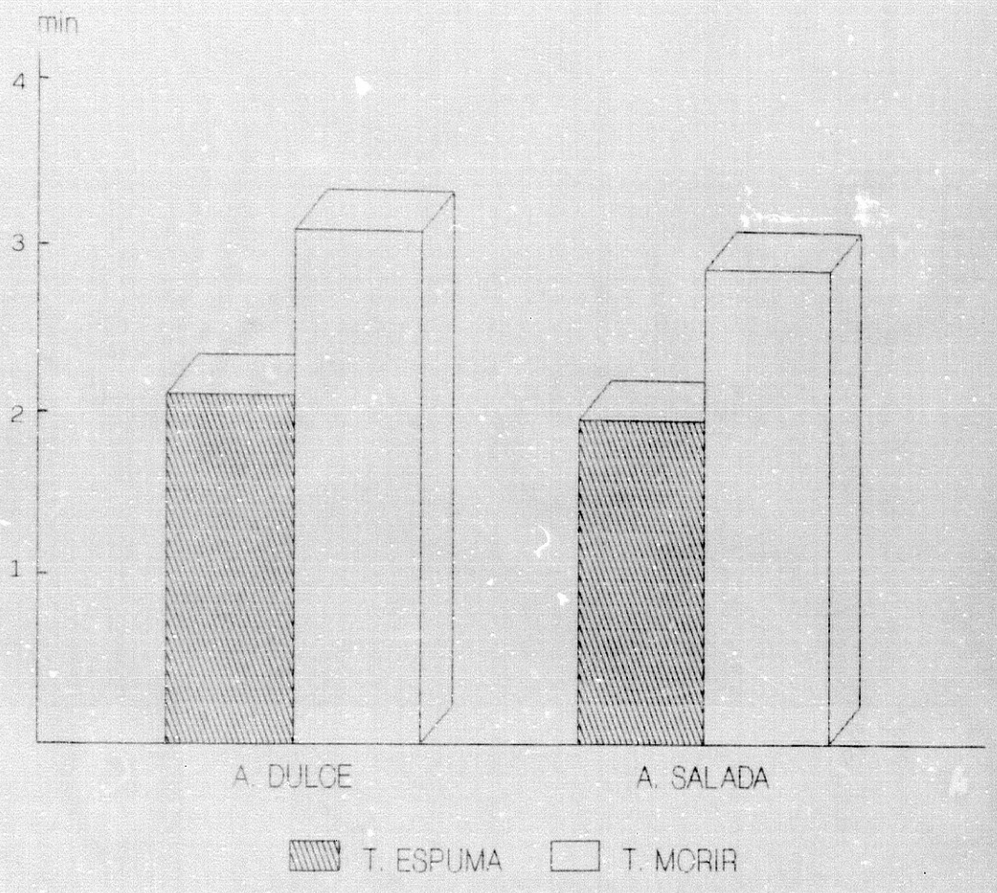


TABLA VIb

DIFERENCIAS ENTRE SERIES

TIEMPO HONGO

No hay diferencias estadísticamente significativas entre las dos series.

TIEMPO AGONIA

SERIES	t_{exp}	g.l.	SIGNIF.
II-III	2.33	42	$p<0.025$

HEMOGLOBINA PLASMATICA
(gr%)

TABLA: VII

SERIE:	CONTROL		A. DULCE		A. SALADA	
ORIGEN:	A	V	A	V	A	V
ANIMAL						
1	0.19	0.19	0.88	0.83	0.12	0.13
2	0.21	0.19	0.75	0.77	0.15	0.14
3	0.21	0.24	0.78	0.80	0.10	0.12
4	0.29	0.27	0.65	0.69	0.14	0.14
5	0.18	0.24	0.68	0.72	0.16	0.15
6	0.17	0.22	0.94	0.89	0.11	0.13
7	0.19	0.27	0.87	0.90	0.11	0.13
8	0.22	0.23	0.91	0.86	0.13	0.16
9	0.27	0.28	0.79	0.79	0.15	0.13
10	0.28	0.25	0.80	0.84	0.10	0.12
11	0.21	0.22	0.71	0.75	0.15	0.14
12	0.17	0.20	0.92	0.87	0.12	0.13
13	0.27	0.29	0.84	0.89	0.14	0.15
14	0.20	0.23	0.79	0.80	0.12	0.10
15	0.24	0.26	0.93	0.89	0.16	0.13
$\bar{x}$	0.22	0.24	0.82	0.83	0.13	0.13
S.D.	0.04	0.03	0.09	0.08	0.02	0.02
C.V.	18.61	12.71	11.34	9.09	15.98	11.32

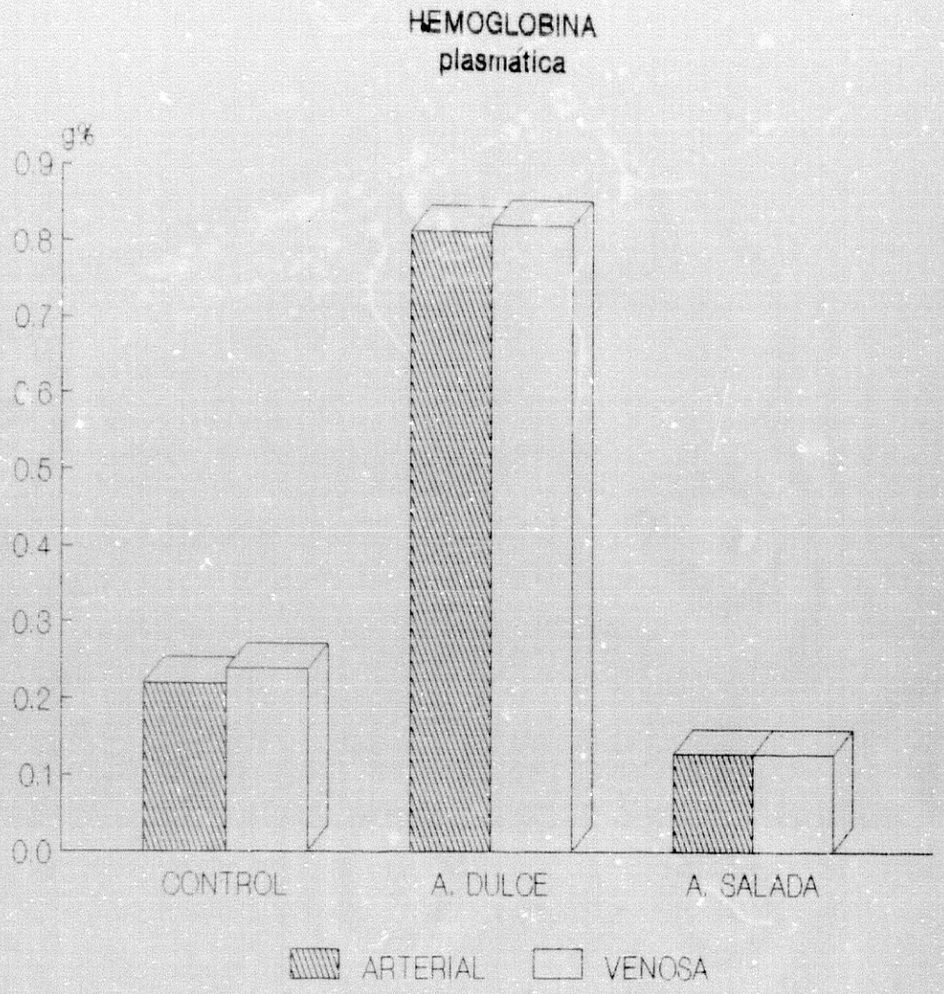


TABLA VIIb

DIFERENCIAS ENTRE SERIES

SERIES	t_{exp}	g.l.	SIGNIF.
I-II	33.03	3;42	p<0.001
I-III	0.17	2;42	N.S.
II-III	32.865	2;42	p<0.001

DIFERENCIAS ARTERIO-VENOSAS

No hay diferencias estadísticamente significativas entre ambos lugares en ninguna de las tres series.

HEMOGLOBINA TOTAL
(gr%)

TABLA: VIII

SERIE:	CONTROL		A. DULCE		A. SALADA	
ORIGEN:	A	V	A	V	A	V
ANIMAL						
1	12.3	13.5	9.2	10.0	16.9	15.4
2	15.3	16.2	10.3	9.5	15.6	16.0
3	16.2	16.1	10.9	9.2	16.3	14.4
4	12.5	13.1	12.1	11.7	14.1	14.2
5	12.1	12.1	9.3	10.1	17.0	15.6
6	14.7	14.6	8.7	10.1	16.9	14.0
7	14.2	14.4	11.5	11.8	15.8	14.3
8	13.1	12.9	9.6	9.0	16.0	15.1
9	12.1	13.3	9.2	9.0	17.9	15.7
10	12.9	13.6	10.3	10.1	15.7	14.5
11	12.7	13.0	8.6	8.6	15.0	15.7
12	13.4	13.7	8.7	8.6	14.0	13.1
13	14.0	13.8	10.8	14.0	12.4	14.2
14	14.0	12.9	8.9	9.3	16.0	16.0
15	13.2	13.3	8.2	7.8	16.5	17.3
$\bar{x}$	13.5	13.8	9.7	9.9	15.7	15.0
S.D.	1.2	1.1	1.2	1.6	1.4	1.1
C.V.	9.0	8.3	12.0	15.7	8.9	7.2

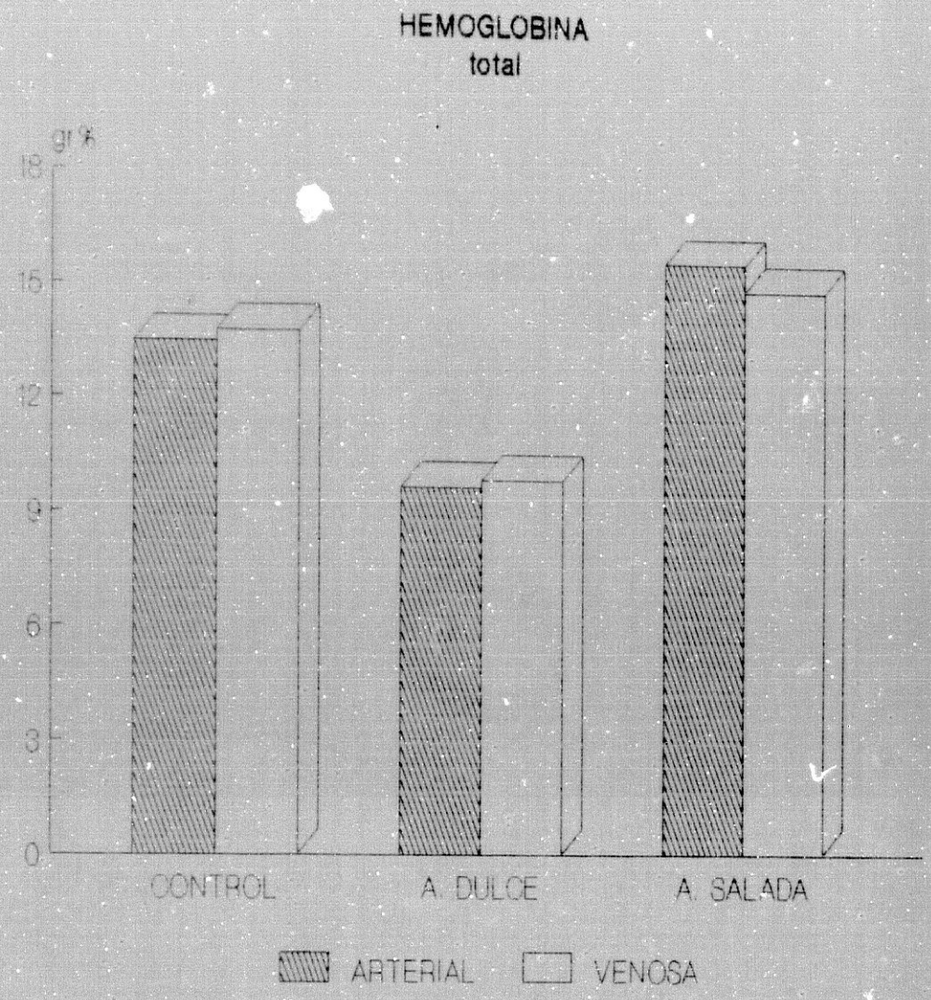


TABLA VIIIb

DIFERENCIAS ENTRE SERIES

SERIES	t_{exp}	g.l.	SIGNIF.
I-II	8.15	2;42	p<0.001
I-III	3.28	2;42	p<0.01
II-III	12.33	3;42	p<0.001

DIFERENCIAS ARTERIO-VENOSAS

No hay diferencias estadísticamente significativas entre ambos lugares en ninguna de las tres series.

VOLUMEN CORPUSCULAR MEDIO
(micras cúbicas)

TABLA: IX

SERIE:	CONTROL		A. DULCE		A. SALADA	
ORIGEN:	A	V	A	V	A	V
ANIMAL						
1	82.1	83.6	137.7	140.5	70.8	74.0
2	79.8	80.0	131.4	134.3	70.9	69.8
3	76.4	77.7	121.7	125.3	73.2	73.4
4	83.5	82.7	131.6	138.1	74.3	70.9
5	84.4	83.0	137.1	130.9	79.1	75.1
6	85.7	83.7	118.2	114.3	72.5	74.2
7	86.3	84.0	123.2	128.9	74.34	73.0
8	78.1	77.4	151.4	143.7	75.1	72.5
9	79.1	81.2	132.5	131.5	72.8	72.1
10	80.8	83.7	133.5	132.3	73.5	69.0
11	78.2	80.2	128.4	117.9	63.4	66.1
12	81.7	81.5	139.7	131.7	72.7	73.1
13	80.6	77.8	134.6	131.2	77.0	75.8
14	75.4	79.3	134.1	129.7	73.5	76.3
15	83.3	82.5	137.8	131.3	77.8	78.6
$\bar{x}$	81.0	81.2	132.9	130.8	73.4	72.9
S.D.	3.3	2.4	8.1	7.6	3.6	3.1
C.V.	4.0	2.9	6.1	5.8	4.9	4.3

VOLUMEN CORPUSCULAR MEDIO

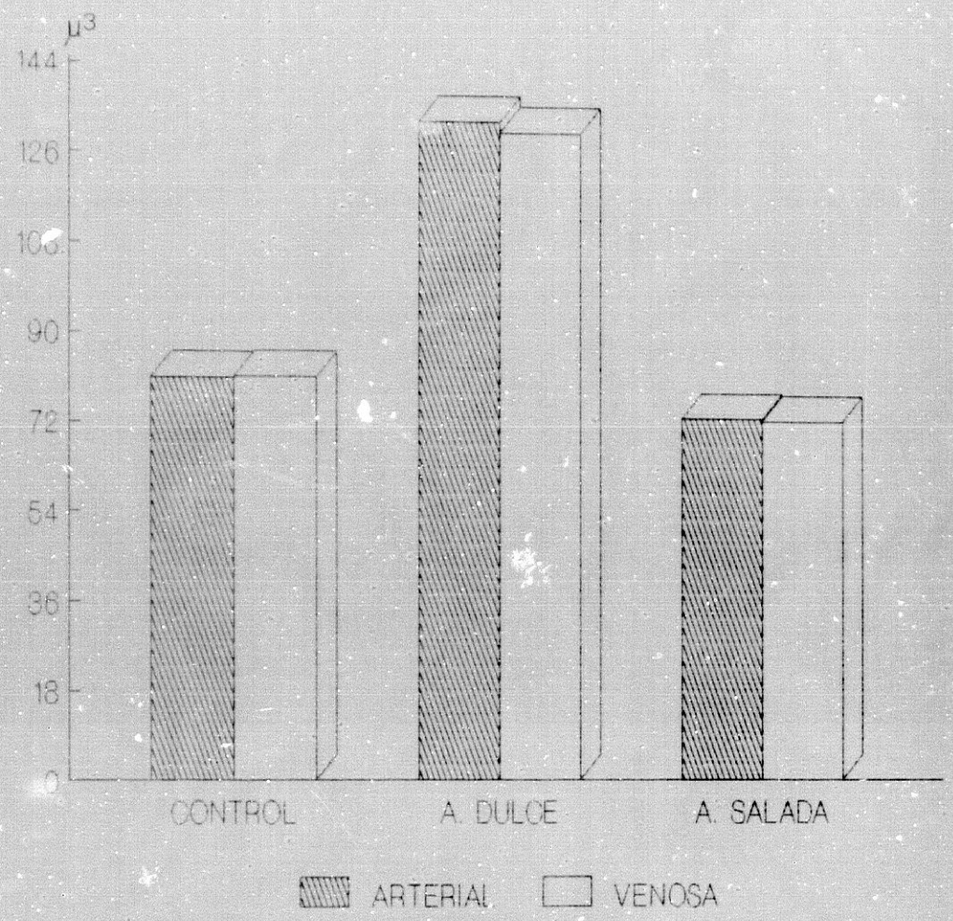


TABLA IXb

DIFERENCIAS ENTRE SERIES

SERIES	t_{exp}	g.l.	SIGNIF.
I-II	28.47	2;42	p<0.0001
I-III	4.47	2;42	p<0.01
II-III	32.94	3;42	p<0.0001

DIFERENCIAS ARTERIO-VENOSAS

No hay diferencias estadísticamente significativas entre ambos lugares en ninguna de las tres series.

NUMERO DE HEMATIES
(millones/ml)

TABLA: X

SERIE:	CONTROL		A. DULCE		A. SALADA	
ORIGEN:	A	V	A	V	A	V
ANIMAL						
1	5.55	5.26	3.85	3.70	7.21	7.03
2	5.88	5.87	4.11	4.17	7.47	7.31
3	5.49	5.40	4.60	4.23	7.38	7.22
4	5.27	5.44	3.80	3.91	7.41	7.33
5	5.33	5.42	3.72	4.20	7.08	7.32
6	5.48	5.85	4.40	4.55	7.72	7.55
7	5.56	5.71	4.20	4.11	6.86	7.12
8	6.01	6.33	3.50	3.87	7.32	7.59
9	6.07	5.91	4.15	4.20	7.27	7.63
10	5.81	5.49	3.97	3.93	7.48	7.25
11	6.14	5.98	4.36	4.41	7.10	7.56
12	5.99	6.26	4.15	4.10	7.73	7.81
13	5.71	5.91	3.64	3.81	7.61	7.65
14	6.23	6.18	3.88	3.93	7.44	7.60
15	5.28	5.45	3.70	3.96	7.27	7.01
$\bar{x}$	5.72	5.76	4.00	4.07	7.36	7.39
S.D.	0.32	0.30	0.31	0.23	0.25	0.25
C.V.	5.65	5.16	7.85	5.63	3.55	3.33

NUMERO DE HEMATIES

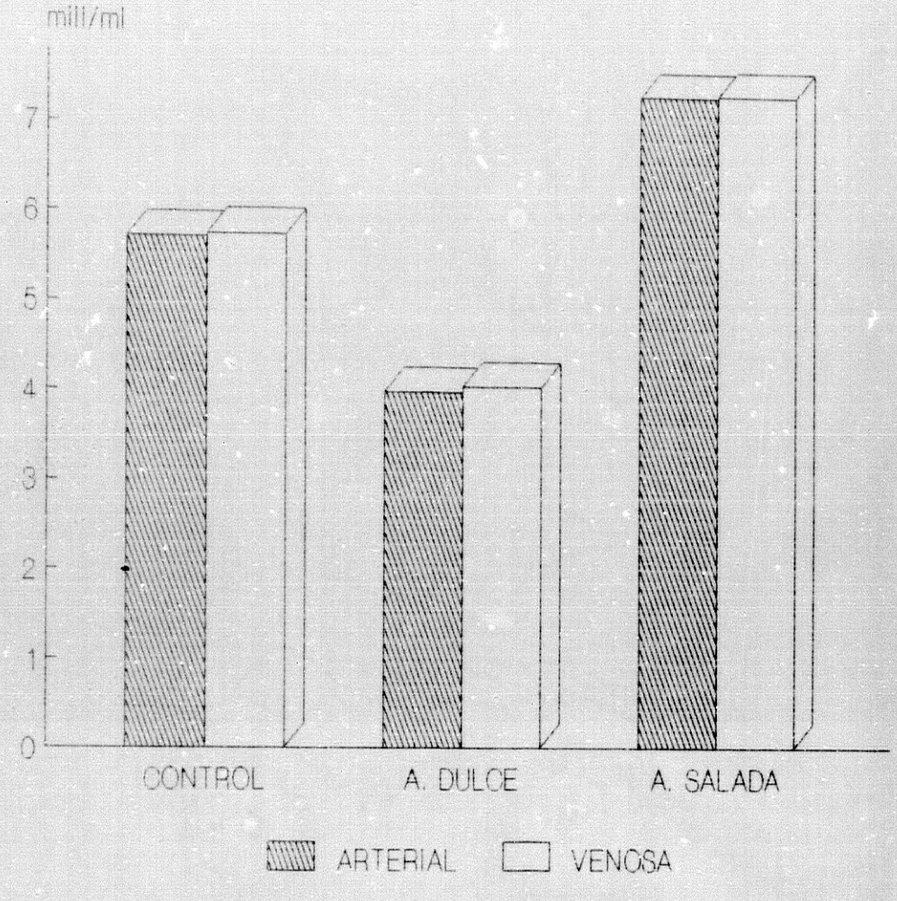


TABLA Xb

DIFERENCIAS ENTRE SERIES

SERIES	t_{exp}	g.l.	SIGNIF.
I-II	17.81	2;42	p<0.001
I-III	17.12	2;42	p<0.001
II-III	34.93	3;42	p<0.0001

DIFERENCIAS ARTERIO-VENOSAS

No hay diferencias estadísticamente significativas entre ambos lugares en ninguna de las tres series.

HEMATOCRITO

TABLA: XI

SERIE:	CONTROL		A. DULCE		A. SALADA	
ORIGEN:	A	V	A	V	A	V
ANIMAL						
1	45	44	53	52	51	52
2	47	47	54	56	53	51
3	42	42	56	53	54	53
4	44	45	50	54	55	52
5	45	45	51	55	56	55
6	47	49	52	52	56	56
7	48	48	52	53	51	52
8	47	49	53	57	55	55
9	48	48	55	55	53	55
10	47	46	53	52	55	50
11	48	48	56	54	45	50
12	49	51	58	57	56	57
13	46	46	49	50	60	58
14	47	49	52	51	55	58
15	44	45	51	52	56	55
$\bar{x}$	46.3	46.8	53.0	53.5	54.1	53.9
S.D.	1.9	2.4	2.4	2.1	3.5	2.7
C.V.	4.1	5.1	4.6	4.0	6.2	5.0

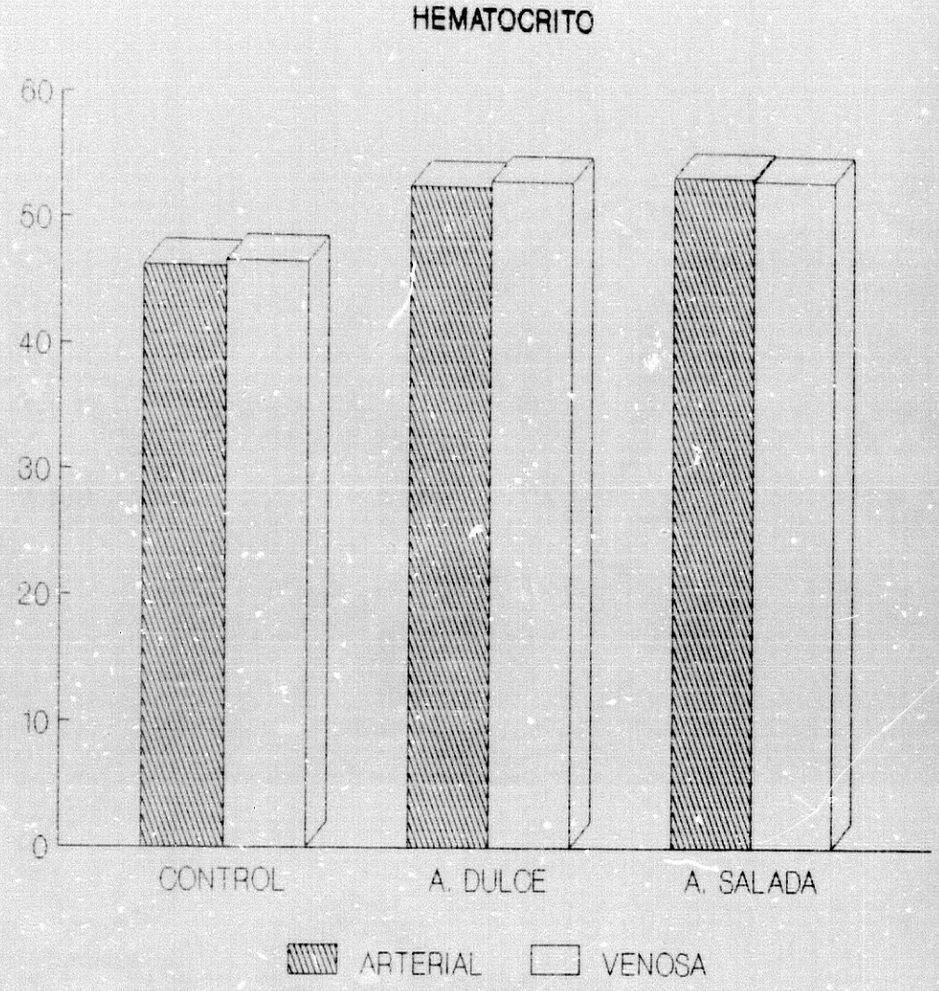


TABLA XIb

DIFERENCIAS ENTRE SERIES

SERIES	t_{exp}	g.l.	SIGNIF.
I-II	7.99	2;42	p<0.001
I-III	8.86	3;42	p<0.001
II-III	0.86	2;42	N.S.

DIFERENCIAS ARTERIO-VENOSAS

No hay diferencias estadísticamente significativas entre los diversos lugares en ninguna de las tres series.

PROTEINAS
plasmáticas
(gr%)

TABLA: XII

SERIE:	CONTROL		A. DULCE		A. SALADA	
ORIGEN:	A	V	A	V	A	V
ANIMAL						
1	9.98	10.48	6.52	6.99	8.40	8.59
2	9.76	10.40	6.37	7.15	8.30	8.88
3	9.50	9.20	7.14	8.01	8.12	8.91
4	9.47	10.00	7.50	7.99	9.02	8.75
5	9.08	9.30	7.87	8.74	8.91	9.00
6	8.65	8.91	5.93	7.11	8.23	7.45
7	8.75	9.32	6.15	7.32	7.30	7.67
8	8.54	10.02	7.32	8.52	7.59	7.66
9	9.03	8.81	6.15	7.62	6.63	7.16
10	8.52	8.30	5.83	5.96	7.61	7.77
11	8.16	8.32	6.48	6.69	7.26	7.37
12	7.58	7.92	5.60	6.89	6.83	6.77
13	7.73	8.27	5.31	5.17	5.67	6.69
14	7.88	7.39	5.98	5.88	6.97	6.84
15	7.65	8.04	4.71	5.90	6.38	6.50
$\bar{x}$	8.69	8.98	6.32	7.07	7.55	7.69
S.D.	0.78	0.95	0.85	1.03	0.96	0.89
C.V.	9.08	10.58	13.52	14.65	12.68	11.65

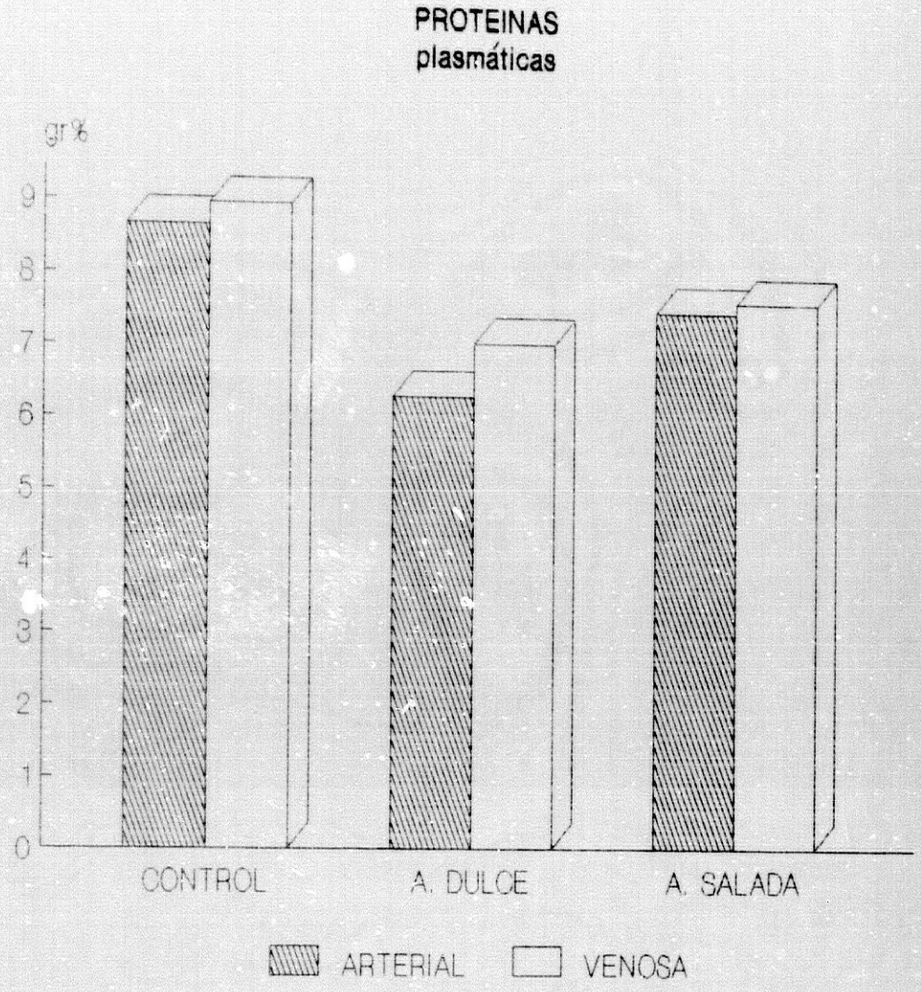


TABLA XIIb

DIFERENCIAS ENTRE SERIES

	ARTERIAL			*VENOSA*		
SERIES	t_{exp}	g.l.	SIGNIF.	t_{exp}	g.l.	SIGNIF.
I-II	9.74	3;42	p<0.01	5.54	3;42	p<0.01
I-III	3.28	2;42	p<0.01	2.90	2;42	p<0.05
II-III	9.47	2;42	p<0.01	3.67	2;42	p<0.01

DIFERENCIAS ARTERIO-VENOSAS

Hay diferencias estadísticamente significativas en la serie de agua dulce (t_{exp}=2.641; g.l.=42; p<0.05).

OSMOLARIDAD
plasmática
(mOsm/l)

TABLA: XIII

SERIE:	CONTROL		A. DULCE		A. SALADA	
ORIGEN:	A	V	A	V	A	V
ANIMAL						
1	329	334	336	349	381	393
2	341	348	336	340	358	345
3	331	333	379	407	393	404
4	345	359	344	409	400	413
5	347	352	357	362	397	375
6	324	332	325	349	385	371
7	350	341	337	346	358	363
8	342	340	344	344	375	358
9	330	333	323	331	373	369
10	342	351	302	333	384	373
11	327	325	311	325	399	381
12	325	342	317	328	402	375
13	359	372	331	345	378	363
14	331	342	309	328	411	402
15	338	349	312	321	375	370
$\bar{x}$	337.4	342.9	329.1	347.8	384.6	377.0
S.D.	10.3	12.0	23.9	26.8	15.7	18.7
C.V.	3.1	3.5	7.3	7.7	4.1	5.0

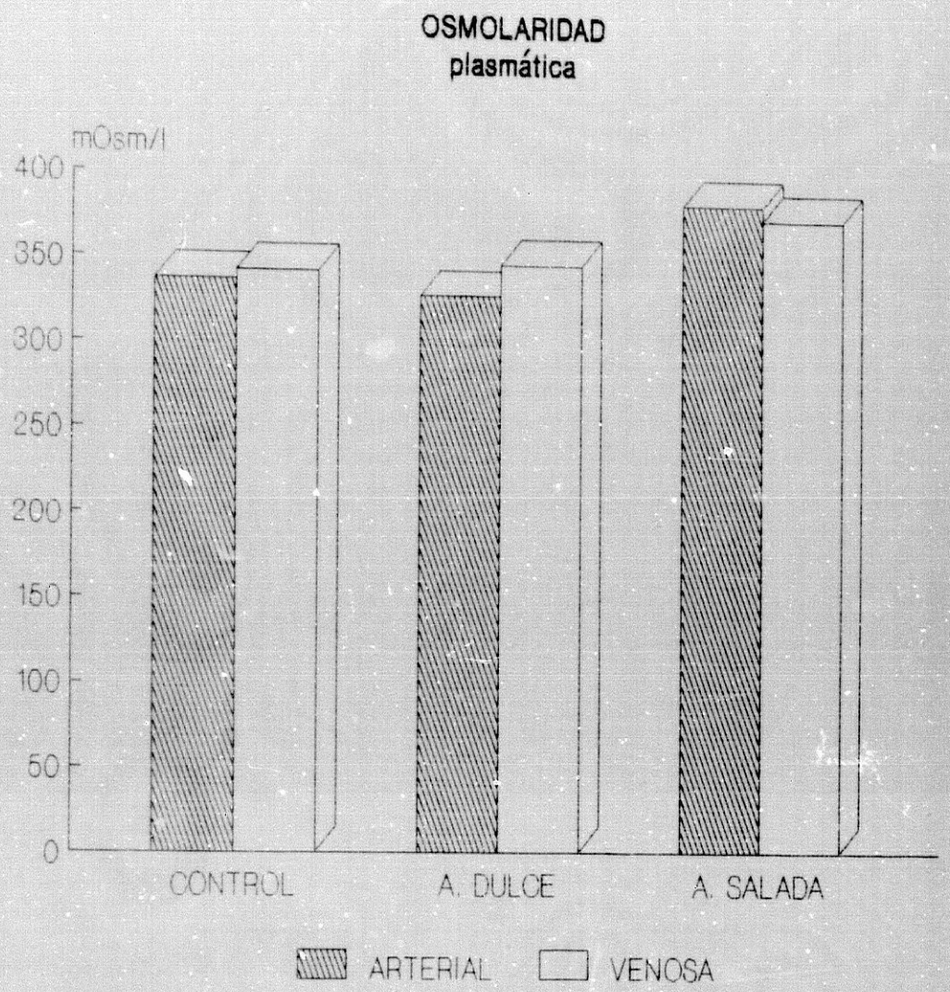


TABLA XIIIb

DIFERENCIAS ENTRE SERIES

	ARTERIAL			*VENOSA*		
SERIES	t_{exp}	g.l.	SIGNIF.	t_{exp}	g.l.	SIGNIF.
I-II	0.72	2;42	N.S.	1.38	2;42	N.S.
I-III	3.71	3;42	p<0.01	2.99	3;42	p<0.05
II-III	2.98	2;42	p<0.05	1.62	2;42	N.S.

DIFERENCIAS ARTERIO-VENOSAS

No hay diferencias en este sentido, pero existe interacción, al no ser las diferencias entre series iguales en todos los lugares (F_{exp}=14.89; g.l.=2; p<0.001).

SODIO
plasmático
(mg%)

TABLA: XIV

SERIE:	CONTROL		A. DULCE		A. SALADA	
ORIGEN:	A	V	A	V	A	V
ANIMAL						
1	300.0	327.5	310.0	325.0	375.0	400.0
2	332.5	307.5	302.5	325.0	395.0	345.0
3	290.0	295.0	300.0	302.5	420.0	375.0
4	317.5	282.5	287.5	262.5	400.0	440.0
5	297.5	282.5	300.0	297.5	360.0	395.0
6	272.5	272.5	322.5	302.5	430.0	395.0
7	280.0	295.0	267.5	292.5	400.0	410.0
8	265.0	260.0	302.5	307.5	405.0	410.0
9	292.5	265.0	317.5	297.5	400.0	405.0
10	307.5	275.0	307.5	322.5	350.0	380.0
11	347.5	302.5	302.5	307.5	430.0	385.0
12	317.5	302.5	327.5	310.0	360.0	355.0
13	317.5	312.5	342.5	320.5	380.0	385.0
14	297.5	312.5	310.0	332.5	360.0	380.0
15	312.5	315.0	330.0	352.5	370.0	410.0
$\bar{x}$	303.2	293.8	308.7	310.7	389.0	391.3
S.D.	22.1	20.1	18.2	20.8	26.3	23.6
C.V.	7.3	6.8	5.9	6.7	6.8	6.0

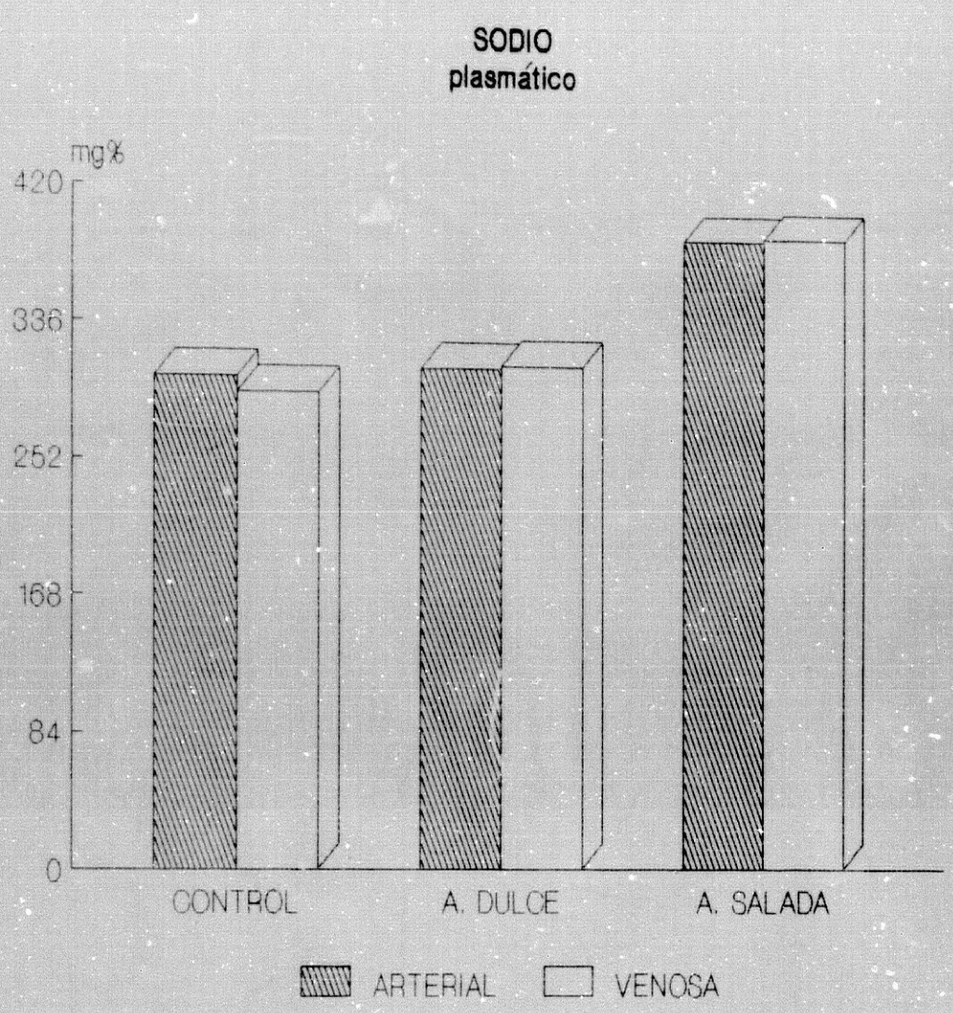


TABLA XIVb

DIFERENCIAS ENTRE SERIES

SERIES	t_{exp}	g.l.	SIGNIF.
I-II	1.13	2;42	N.S.
I-III	13.37	3;42	p<0.001
II-III	12.24	2;42	p<0.001

DIFERENCIAS ARTERIO-VENOSAS

No hay diferencias estadísticamente significativas entre ambos lugares en ninguna de las tres series.

POTASIO
plasmático
(mg%)

TABLA: XV

SERIE:	CONTROL		A. DULCE		A. SALADA	
ORIGEN:	A	V	A	V	A	V
ANIMAL						
1	26.5	21.5	26.0	21.5	27.5	28.5
2	28.0	30.5	22.5	21.0	26.0	27.5
3	28.5	29.0	28.0	32.0	24.5	29.5
4	31.0	24.5	28.5	30.0	24.5	25.0
5	32.5	30.5	22.5	22.5	26.5	25.5
6	27.0	23.5	30.2	22.0	24.0	27.0
7	37.5	30.0	31.0	32.5	30.0	28.5
8	31.0	38.5	27.5	28.0	28.5	31.5
9	32.5	29.5	28.0	27.0	25.0	28.5
10	30.5	34.0	24.0	23.0	27.5	26.0
11	30.0	30.0	27.0	25.0	28.5	27.5
12	23.0	29.5	27.0	24.0	27.5	30.0
13	33.5	35.0	22.0	30.0	30.0	29.5
14	29.5	30.5	22.0	26.0	29.5	31.0
15	32.0	29.5	23.0	27.0	30.0	27.5
$\bar{x}$	30.2	29.7	26.0	25.9	27.5	28.2
S.D.	3.4	4.2	3.1	4.0	2.1	1.9
C.V.	11.3	14.0	11.8	15.3	7.5	6.8

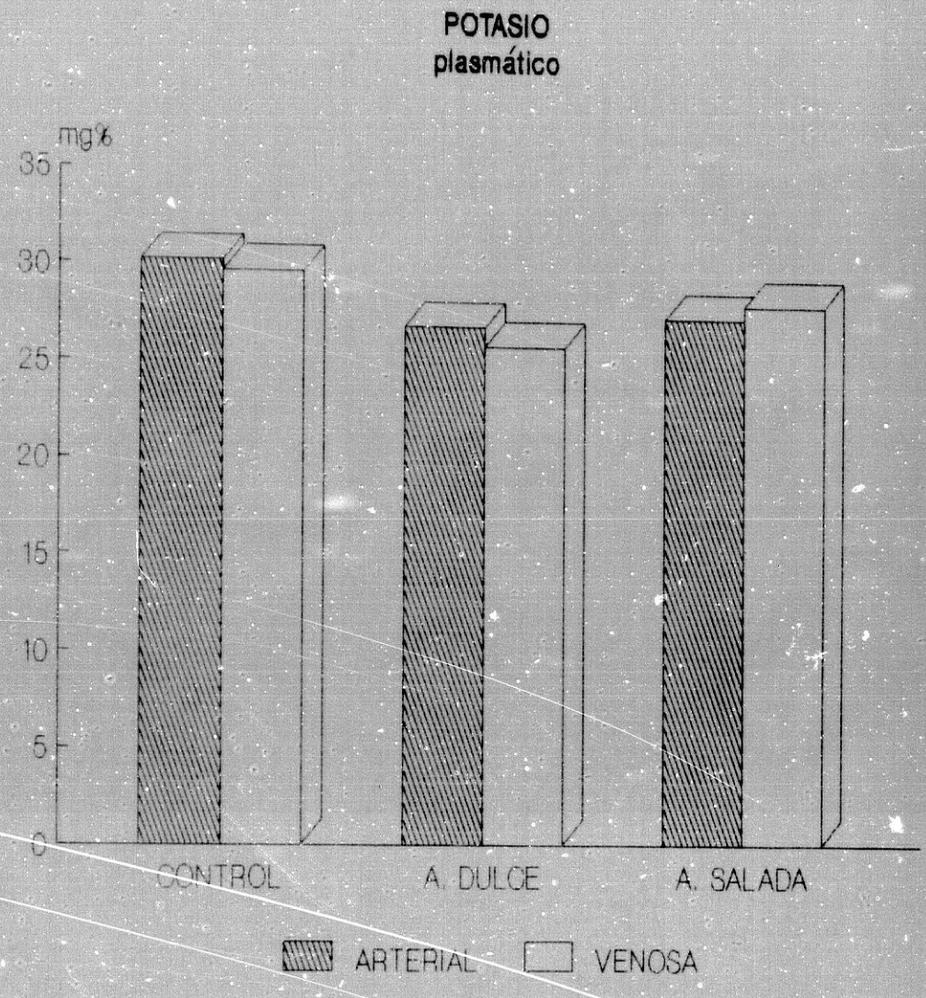


TABLA XVb

DIFERENCIAS ENTRE SERIES

SERIES	t_{exp}	g.l.	SIGNIF.
I-II	4.05	3;42	p<0.01
I-III	2.28	2;42	p<0.05
II-III	1.76	2;42	N.S.

DIFERENCIAS ARTERIO-VENOSAS

No hay diferencias estadísticamente significativas entre ambos lugares en ninguna de las tres series.

CLORO
(mEq/l)

TABLA: XVI

SERIE:	CONTROL		A. DULCE		A. SALADA	
ORIGEN:	A	V	A	V	A	V
ANIMAL						
1	107	102	95	100	123	124
2	105	101	100	103	131	135
3	103	103	105	107	136	131
4	101	104	100	93	147	145
5	96	98	101	104	137	141
6	101	102	98	101	147	150
7	108	103	111	105	137	133
8	109	105	99	102	141	147
9	110	108	103	106	144	147
10	107	104	101	98	127	131
11	102	103	105	111	133	129
12	101	105	107	110	142	138
13	103	105	104	106	139	136
14	102	101	105	101	140	141
15	98	97	99	103	141	140
$\bar{x}$	103.5	102.7	102.2	103.3	137.7	137.9
S.D.	4.1	2.8	4.1	4.6	6.9	7.5
C.V.	3.9	2.7	4.0	4.4	5.0	5.4

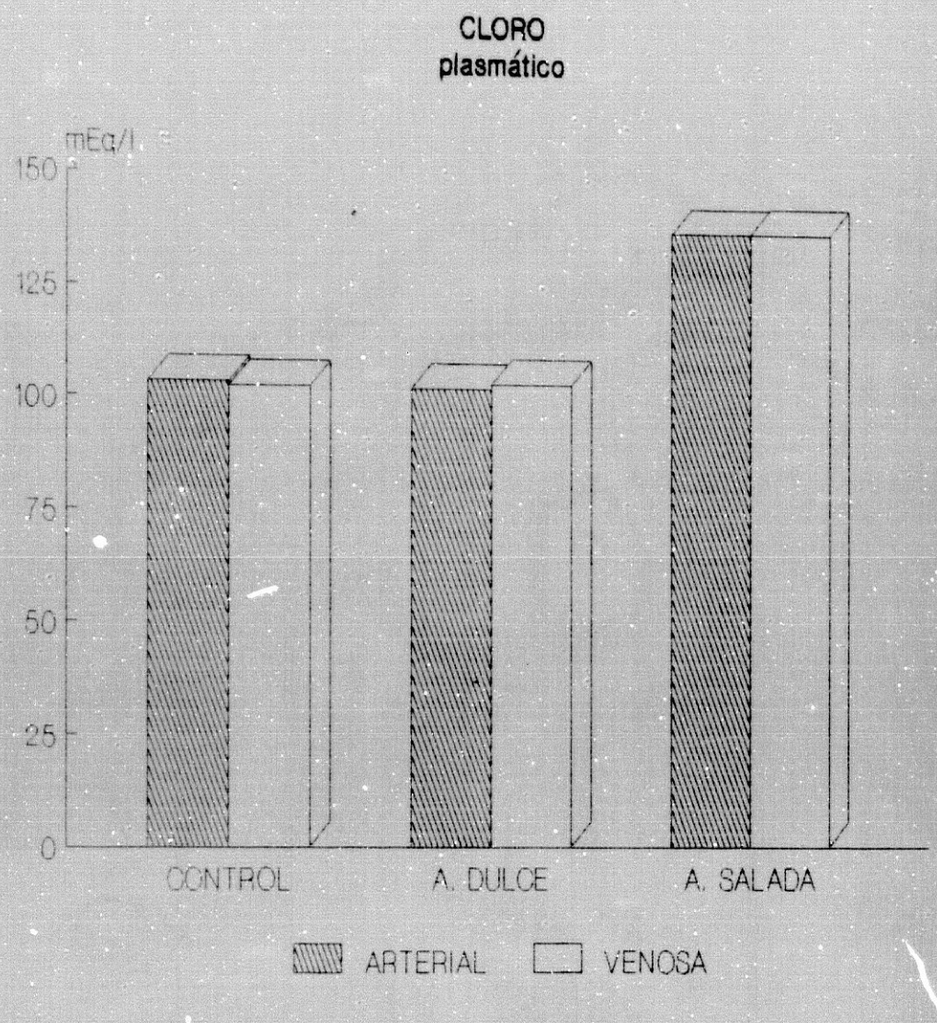


TABLA XVIb

DIFERENCIAS ENTRE SERIES

SERIES	t_{exp}	g.l.	SIGNIF.
I-II	0.20	2;42	N.S.
I-III	19.24	2;42	p<0.001
II-III	19.44	3;42	p<0.001

DIFERENCIAS ARTERIOVENOSAS

No hay diferencias estadísticamente significativas entre ambos lugares en ninguna de las tres series.

MAGNESIO
plasmático
(mg%)

TABLA: XVII

SERIE:	CONTROL		A. DULCE		A. SALADA	
ORIGEN:	A	V	A	V	A	V
ANIMAL						
1	4.5	5.6	4.4	6.2	10.6	11.5
2	4.4	6.5	4.7	6.1	14.7	16.4
3	6.5	6.9	4.3	5.4	12.1	10.9
4	4.3	5.7	4.4	5.4	10.2	9.1
5	4.5	5.7	4.0	5.9	9.2	12.3
6	5.0	3.9	4.4	5.7	11.8	12.6
7	5.2	6.4	4.7	6.7	9.3	10.9
8	5.5	6.4	3.8	4.5	12.8	11.5
9	4.0	4.4	4.3	5.2	12.0	12.2
10	4.4	5.7	3.7	5.2	10.3	11.7
11	3.3	4.4	3.9	5.8	11.8	10.2
12	3.7	5.3	3.2	4.0	12.5	12.6
13	5.5	6.4	2.9	4.5	9.8	9.4
14	5.5	4.1	4.6	6.8	13.6	13.1
15	6.1	6.3	3.5	5.5	12.8	11.4
$\bar{x}$	4.8	5.6	4.1	5.5	11.5	11.7
S.D.	0.9	1.0	0.5	0.8	1.7	1.7
C.V.	18.4	17.3	13.4	14.1	14.5	14.7

MAGNESIO
plasmático

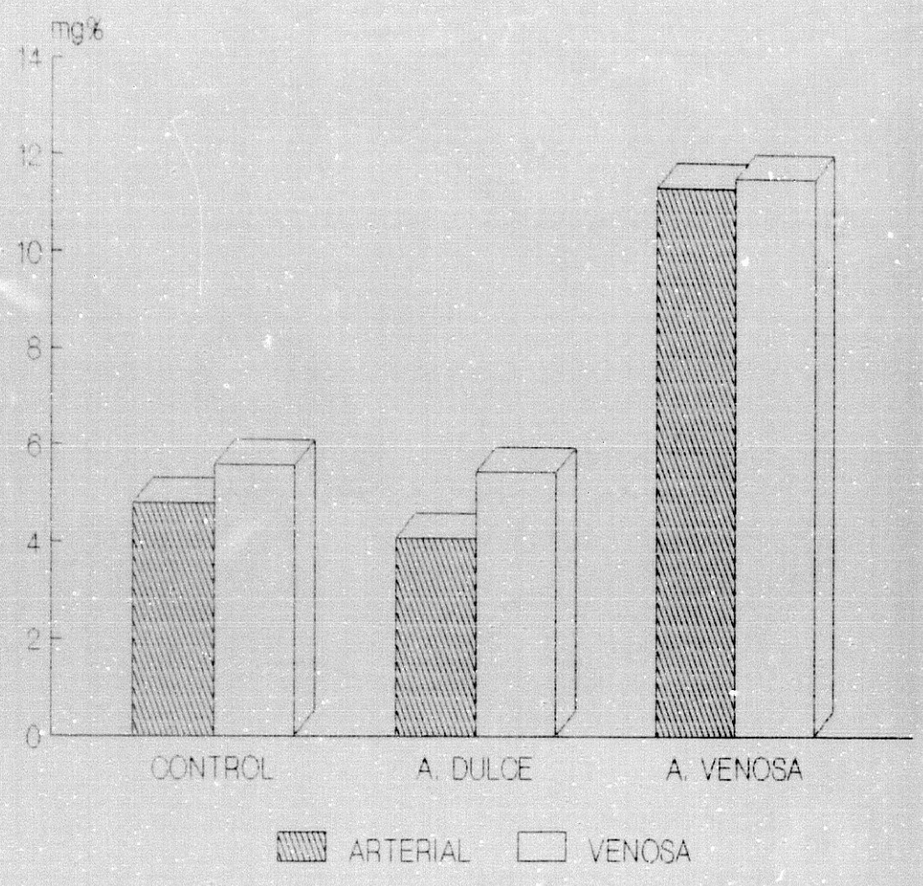


TABLA XVIIb

DIFERENCIAS ENTRE SERIES

	ARTERIAL			*VENOSA*		
SERIES	t_{exp}	**g.l.**	**SIGNIF.**	t_{exp}	**g.l.**	**SIGNIF.**
I-II	1.77	2;42	N.S.	0.08	2;42	N.S.
I-III	15.83	2;42	p<0.001	14.43	2;42	p<0.001
II-III	17.60	2;42	p<0.001	14.51	3;42	p<0.001

DIFERENCIAS ARTERIO-VENOSAS

Hay diferencias estadísticamente significativas en la serie de agua dulce (t_{exp}=2.71; g.l.=42; p<0.01).

CALCIO
plasmático
(mg%)

TABLA: XVIII

SERIE:	CONTROL		A. DULCE		A. SALADA	
ORIGEN:	A	V	A	V	A	V
ANIMAL						
1	13.8	14.0	12.6	14.2	16.9	14.5
2	13.0	15.2	17.3	15.3	18.6	16.4
3	14.2	14.2	16.3	15.3	14.4	15.2
4	12.3	14.1	15.4	15.7	17.7	17.0
5	12.7	10.1	14.3	14.6	15.8	15.3
6	11.5	11.1	15.9	13.7	14.5	17.0
7	13.6	13.5	16.8	16.3	14.9	15.0
8	11.6	12.6	17.2	16.8	16.0	20.1
9	12.4	12.5	15.4	17.8	15.4	16.6
10	12.3	13.5	17.1	16.7	14.6	13.7
11	11.8	11.8	13.7	13.8	14.0	14.2
12	10.1	10.5	14.2	15.5	15.8	15.5
13	13.0	13.5	14.3	12.8	16.3	15.4
14	10.8	11.5	13.0	12.8	16.1	17.7
15	11.5	11.3	14.3	15.1	15.3	16.2
$\bar{x}$	12.3	12.6	15.2	15.1	15.7	15.9
S.D.	1.1	1.2	1.6	1.5	1.3	1.6
C.V.	9.1	12.1	10.2	9.7	8.1	9.9

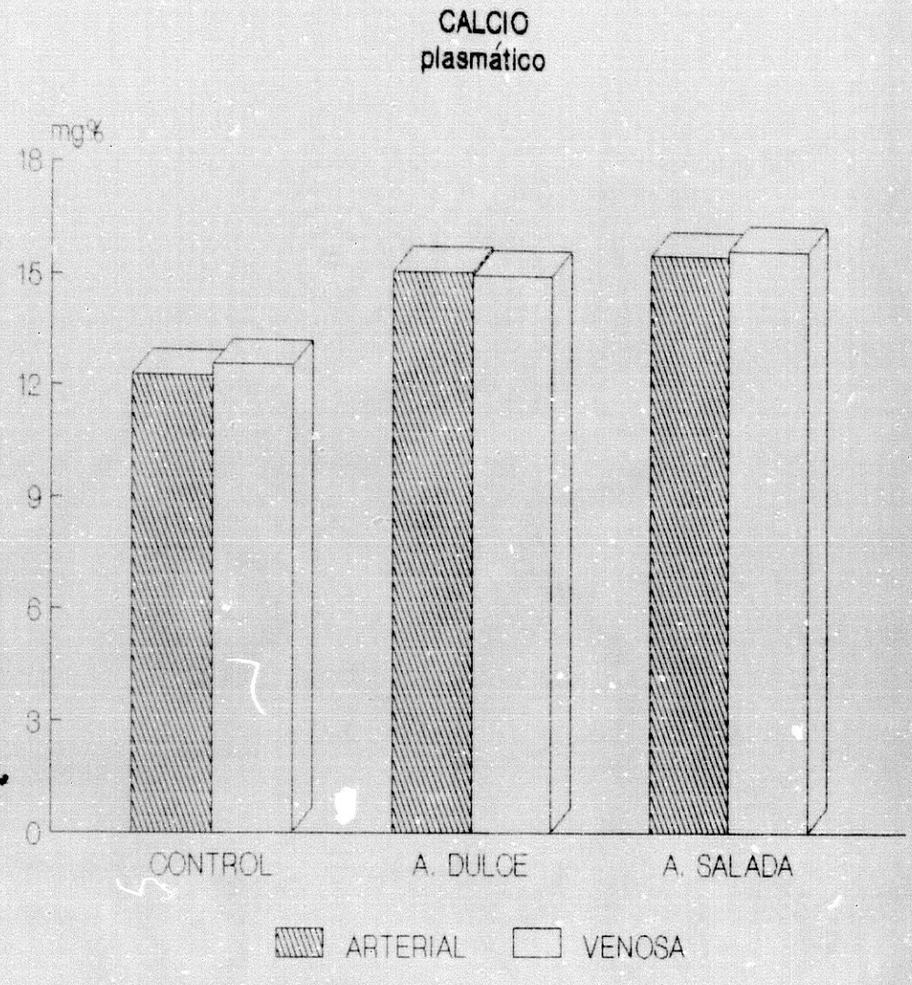


TABLA XVIIIb

DIFERENCIAS ENTRE SERIES

SERIES	t_{exp}	g.l.	SIGNIF.
I-II	5.93	2;42	p<0.001
I-III	7.44	3;42	p<0.001
II-III	1.51	2;42	N.S.

DIFERENCIAS ARTERIO-VENOSAS

No hay diferencias estadísticamente significativas entre ambos lugares en ninguna de las tres series.

SODIO y POTASIO
Humor Vítreo
(mg%)

TABLA: XIX

SERIE:	CONTROL		A. DULCE		A. SALADA	
ION:	Na	K	Na	K	Na	K
ANIMAL						
1	273.1	17.32	292.2	17.15	288.1	19.07
2	291.4	15.08	267.3	18.43	292.7	17.41
3	298.0	20.11	280.0	20.00	300.4	22.05
4	262.8	21.36	264.3	19.17	300.7	16.43
5	301.4	18.15	300.1	22.05	262.8	15.15
6	267.2	15.74	269.4	16.51	273.1	18.78
7	273.9	16.16	277.5	17.34	298.5	19.32
8	312.6	19.81	283.1	17.27	276.5	22.15
9	280.3	20.35	291.2	21.42	249.6	18.79
10	270.7	16.03	254.8	22.05	315.8	23.41
11	300.2	21.15	262.7	18.91	309.4	17.39
12	284.7	20.23	307.4	16.48	290.2	19.06
13	276.7	18.05	289.5	17.66	287.4	23.51
14	264.0	19.64	267.3	22.15	309.3	22.05
15	301.8	17.33	277.0	18.47	301.1	19.70
$\bar{x}$	283.9	18.43	278.6	19.00	290.4	19.62
S.D.	15.9	2.09	15.1	2.06	18.3	2.53
C.V.	5.6	11.34	5.4	10.85	6.3	12.92

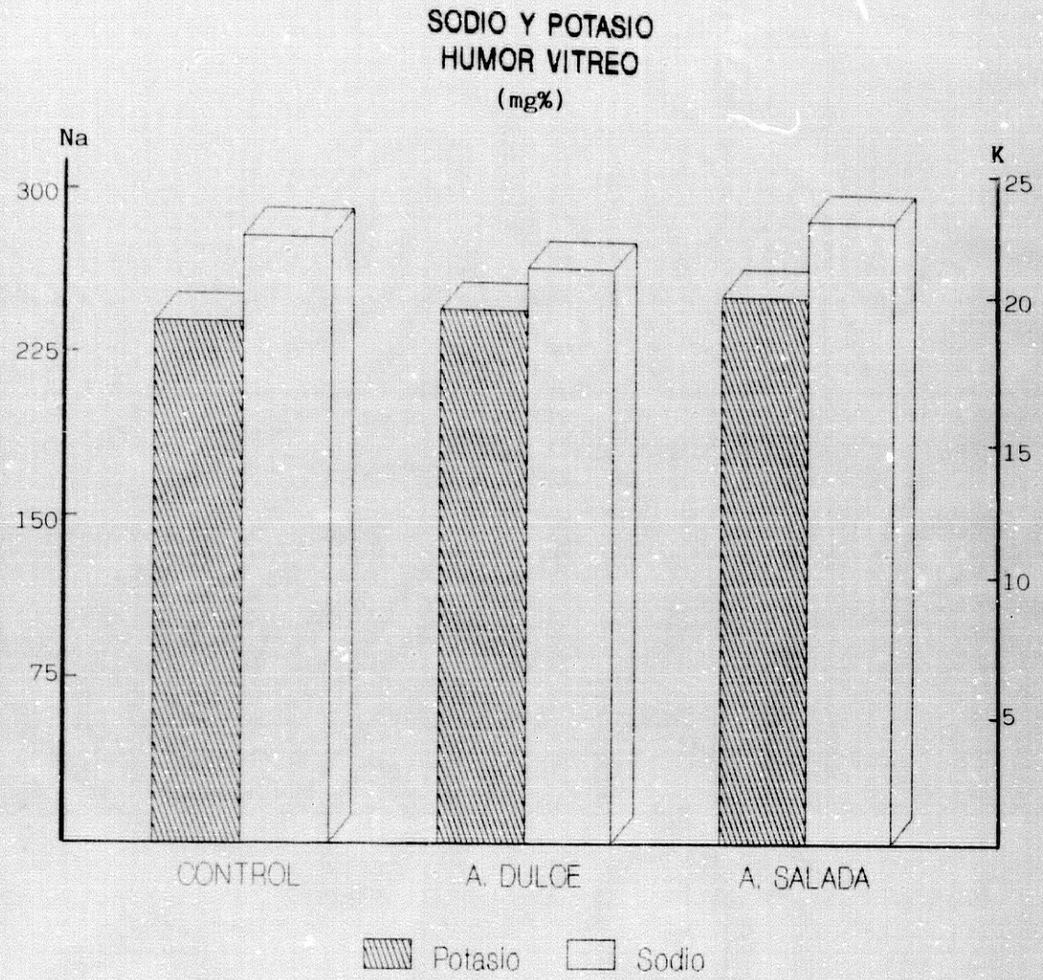


TABLA XIXb

DIFERENCIAS ENTRE SERIES

SODIO

No hay diferencias estadísticamente significativas entre las tres series.

POTASIO

No hay diferencias estadísticamente significativas entre las tres series.

FOSFATIDIL-COLINA
lavado endobronquial
(%)

TABLA XX

SERIE:	CONTROL	A. DULCE	A. SALADA
ANIMAL			
1	81.52	67.77	58.94
2	73.64	64.95	40.12
3	72.50	64.86	60.76
4	70.28	66.00	59.75
5	67.85	69.51	56.37
6	63.10	63.30	58.53
7	66.62	63.96	60.19
8	71.25	63.98	57.66
9	69.99	63.95	61.64
10	68.30	65.79	57.43
11	69.05	65.95	59.09
12	71.05	62.46	57.12
13	69.75	65.06	56.71
14	65.85	66.82	55.90
15	80.25	74.19	55.98
$\bar{x}$	70.73	65.89	57.34
S.D.	4.90	2.91	5.06
C.V.	6.93	4.42	8.82

FOSFATIDIL-COLINA
lavado endobronquial

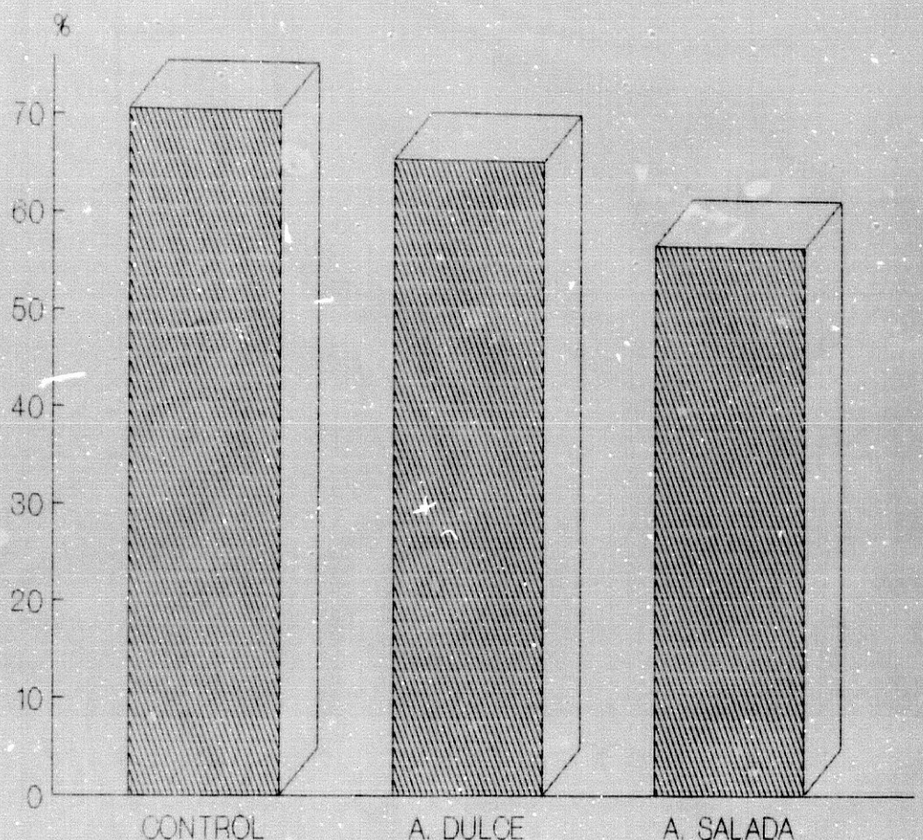


TABLA XXb

DIFERENCIAS ENTRE SERIES

SERIES	t_{exp}	g.l.	SIGNIF.
I-II	3.54	2;42	p<0.01
I-III	9.80	3;42	p<0.001
II-III	6.26	2;42	p<0.001

FOSFATIDIL-COLINA
tejido pulmonar
(%)

TABLA XXI

SERIE:	CONTROL	A. DULCE	A. SALADA
ANIMAL			
1	41.81	42.48	49.41
2	37.89	45.90	52.18
3	45.11	45.37	41.77
4	46.12	39.22	48.58
5	42.92	39.85	47.41
6	43.80	39.06	46.71
7	40.00	40.98	48.58
8	35.09	41.87	48.17
9	45.41	43.69	45.51
10	43.11	39.44	48.23
11	47.81	40.33	51.92
12	43.75	40.33	50.44
13	47.21	38.61	45.66
14	48.44	40.98	47.21
15	45.49	38.62	45.83
$\bar{x}$	43.60	41.67	47.84
S.D.	3.70	2.40	2.66
C.V.	8.49	5.76	5.56

FOSFATIDIL-COLINA
tejido pulmonar

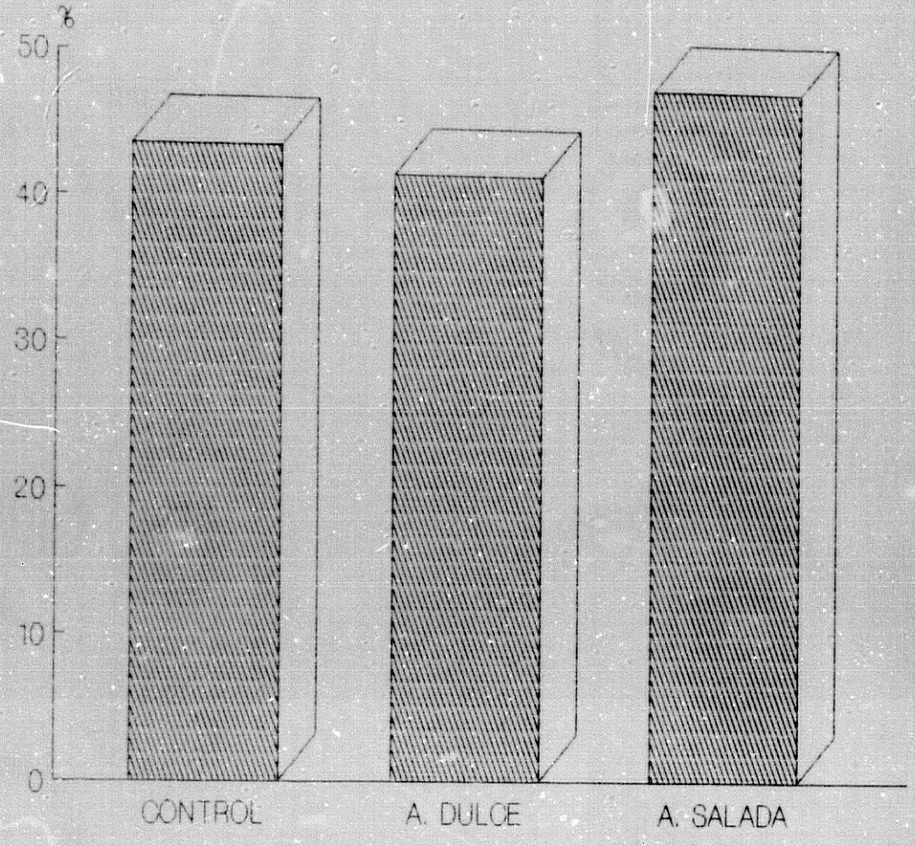


TABLA XXIb

DIFERENCIAS ENTRE SERIES

SERIES	t_{exp}	g.l.	SIGNIF.
I-II	2.03	2;42	N.S.
I-III	3.11	2;42	$p<0.05$
II-III	5.13	3;42	$p<0.01$

FOSFATIDIL-ETANOLAMINA
lavado endobronquial
(%)

TABLA XXII

SERIE:	CONTROL	A. DULCE	A. SALADA
ANIMAL			
1	3.38	10.04	14.04
2	3.36	9.67	7.05
3	5.17	8.36	11.31
4	3.71	8.48	11.77
5	4.63	8.56	12.15
6	4.51	10.06	10.90
7	2.72	9.65	11.14
8	3.85	9.29	11.69
9	4.33	8.75	12.36
10	3.27	9.79	13.53
11	3.32	7.92	11.29
12	3.44	10.05	10.81
13	4.35	8.76	12.04
14	4.12	8.19	13.99
15	4.57	10.29	11.05
$\bar{x}$	3.91	9.19	11.67
S.D.	0.67	0.79	1.67
C.V.	17.20	8.64	14.28

FOSFATIDIL-ETANOLAMINA
lavado endobronquial

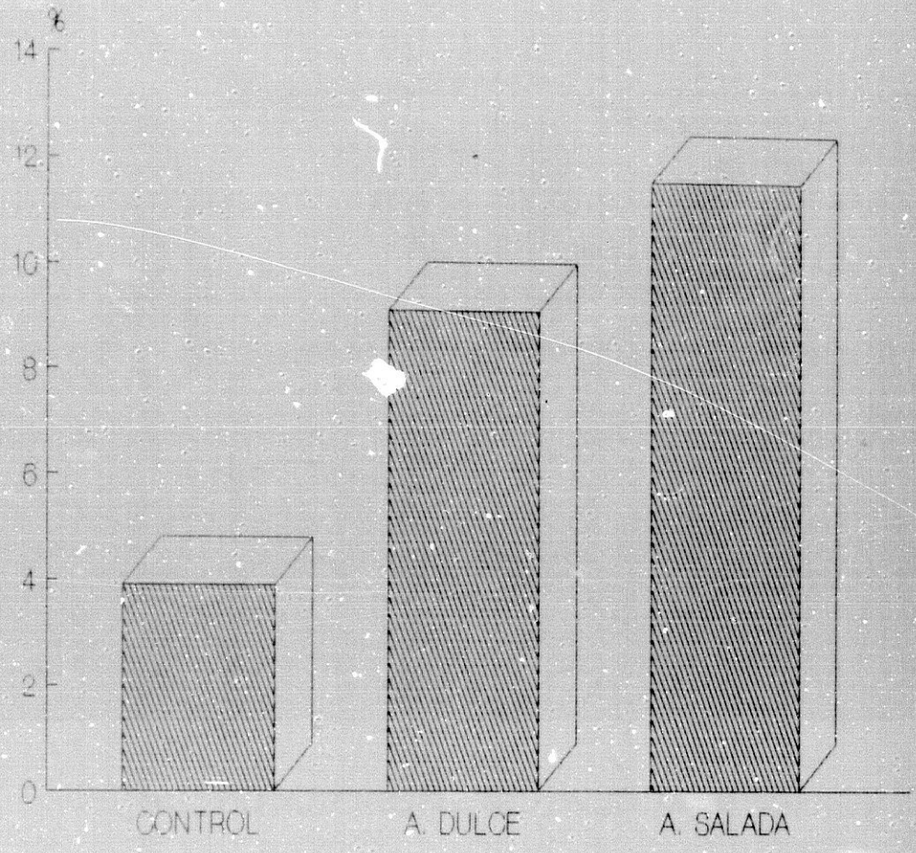


TABLA XXIIb

DIFERENCIAS ENTRE SERIES

SERIES	t_{exp}	g.l.	SIGNIF.
I-II	7.58	2;42	p<0.001
I-III	11.57	3;42	p<0.001
II-IlI	3.57	2;42	p<0.01

FOSFATIDIL ETANOLAMINA
tejido pulmonar
(%)

TABLA XXIII

SERIE:	CONTROL	A. DULCE	A. SALADA
ANIMAL			
1	27.57	25.85	24.89
2	22.14	28.06	21.38
3	22.45	22.84	26.16
4	25.72	21.32	24.75
5	26.55	25.88	25.71
6	19.44	19.62	23.99
7	23.96	23.04	23.26
8	25.07	18.20	26.02
9	20.30	24.82	21.31
10	21.57	20.32	22.82
11	19.72	20.34	23.20
12	20.93	21.67	22.52
13	18.55	20.01	22.25
14	20.86	23.10	22.90
15	20.96	23.91	21.41
$\bar{x}$	22.39	22.59	23.51
S.D.	2.77	2.75	1.67
C.V.	12.35	12.18	7.12

FOSFATIDIL-ETANOLAMINA
tejido pulmonar

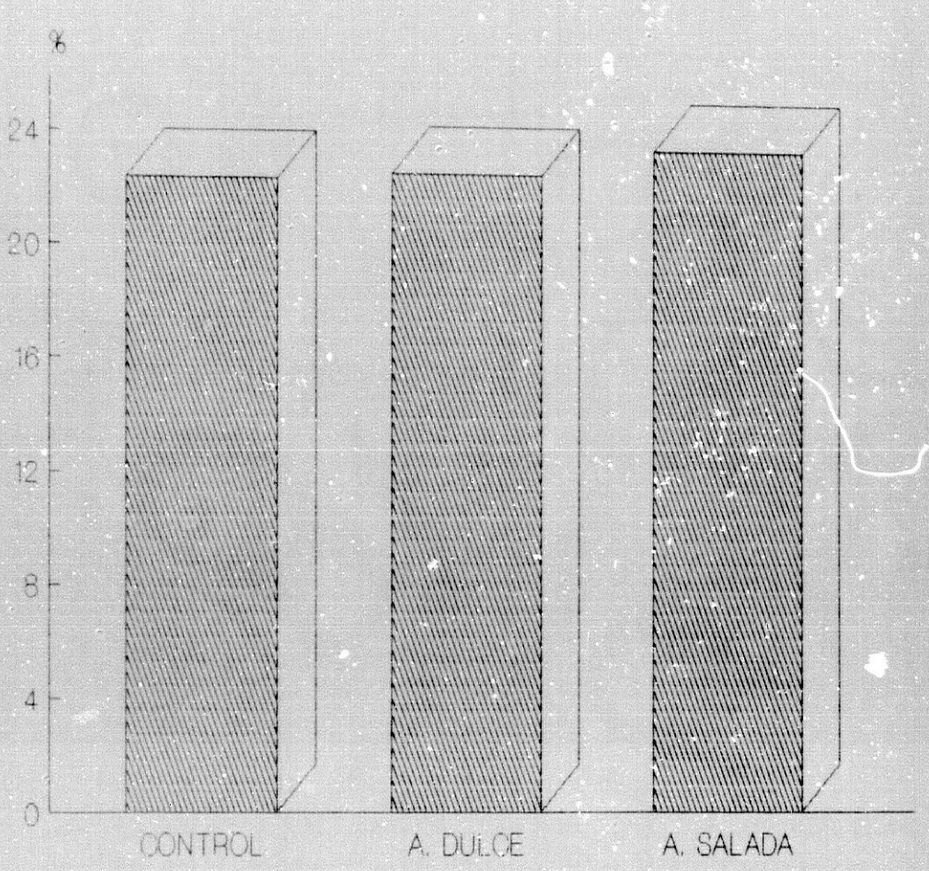


TABLA XXIIIb

DIFERENCIAS ENTRE SERIES

No hay diferencias estadísticamente significativas entre las tres series.

FOSFATIDIL-GLICEROL
lavado endobronquial
(%)

TABLA XXIV

SERIE:	CONTROL	A. DULCE	A. SALADA
ANIMAL			
1	6.96	10.00	16.26
2	6.03	10.08	10.17
3	10.29	13.50	14.87
4	10.63	12.87	17.67
5	9.33	13.17	17.49
6	9.02	13.86	18.72
7	7.38	14.00	18.96
8	7.13	11.89	15.26
9	11.30	13.80	14.30
10	7.21	11.78	16.75
11	6.44	13.67	19.52
12	5.47	14.62	18.25
13	7.94	13.15	18.72
14	8.09	12.30	17.98
15	10.04	15.59	17.03
$\bar{x}$	8.22	12.95	16.80
S.D.	1.79	1.54	2.40
C.V.	21.78	11.89	14.30

FOSFATIDIL-GLICEROL
lavado endobronquial

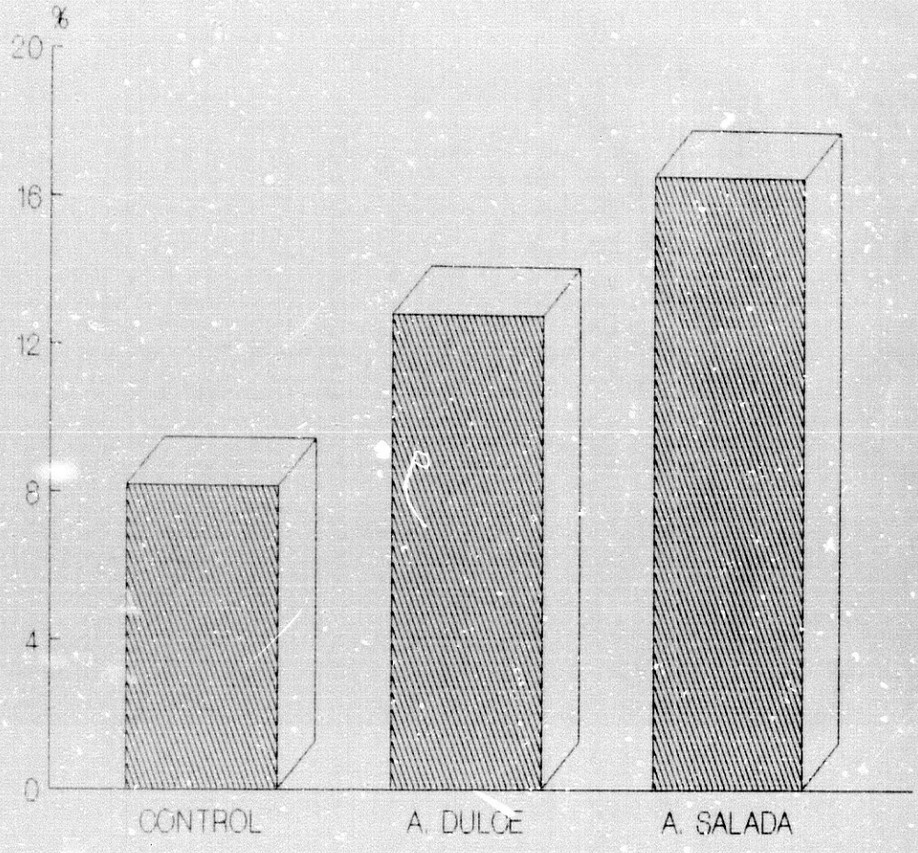


TABLA XXIVb

DIFERENCIAS ENTRE SERIES

SERIES	t_{exp}	g.l.	SIGNIF.
I-II	6.67	42	p<0.001
I-III	12.08	42	p<0.001
II-III	5.41	42	p<0.001

FOSFATIDIL- SERINA
tejido pulmonar
(%)

TABLA XXV

SERIE:	CONTROL	A. DULCE	A. SALADA
ANIMAL			
1	9.60	9.68	8.56
2	12.37	9.71	8.55
3	9.94	11.32	10.74
4	10.60	8.82	10.49
5	10.73	9.10	8.49
6	11.07	12.16	10.74
7	11.35	13.19	11.97
8	12.82	11.13	8.79
9	11.94	13.06	12.07
10	9.92	11.28	9.93
11	12.32	10.72	8.40
12	9.33	10.24	8.00
13	8.92	9.68	9.14
14	9.82	9.08	8.98
15	9.48	8.83	11.71
$\bar{x}$	10.68	10.53	9.77
S.D.	1.25	1.46	1.41
C.V.	11.66	13.88	14.46

FOSFATIDIL-SERINA
tejido pulmonar

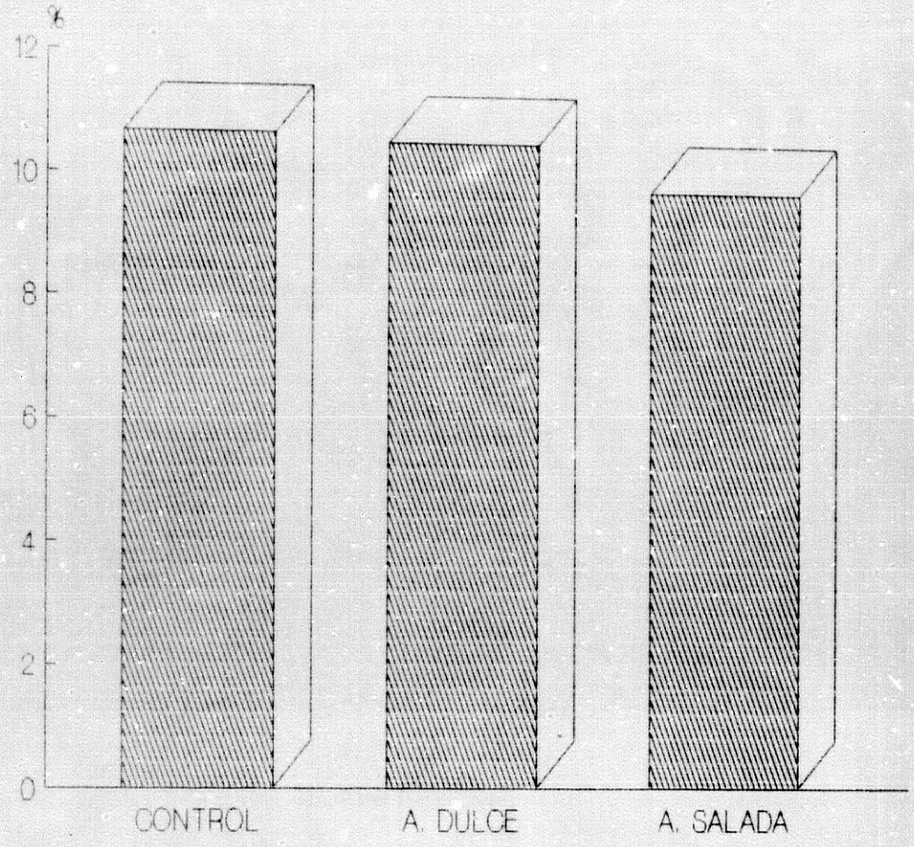


TABLA XXVb

DIFERENCIAS ENTRE SERIES

No hay diferencias estadísticamente significativas entre las tres series.

ESFINGOMIELINA
tejido pulmonar
(%)

TABLA XXVI

SERIE:	CONTROL	A. DULCE	A. SALADA
ANIMAL			
1	7.39	6.84	6.09
2	7.28	6.55	6.66
3	5.74	6.87	7.05
4	5.80	5.76	5.50
5	6.52	7.13	4.98
6	6.18	6.46	6.43
7	6.76	7.42	5.95
8	7.04	5.42	6.18
9	6.75	6.17	6.29
10	5.53	5.51	6.45
11	5.64	6.51	5.55
12	7.65	7.66	6.39
13	9.13	8.38	8.66
14	8.10	7.50	9.04
15	7.28	6.43	8.23
$\bar{x}$	6.85	6.71	6.63
S.D.	1.01	0.83	1.12
C.V.	14.71	12.31	17.58

ESFINGOMIELINA
tejido pulmonar

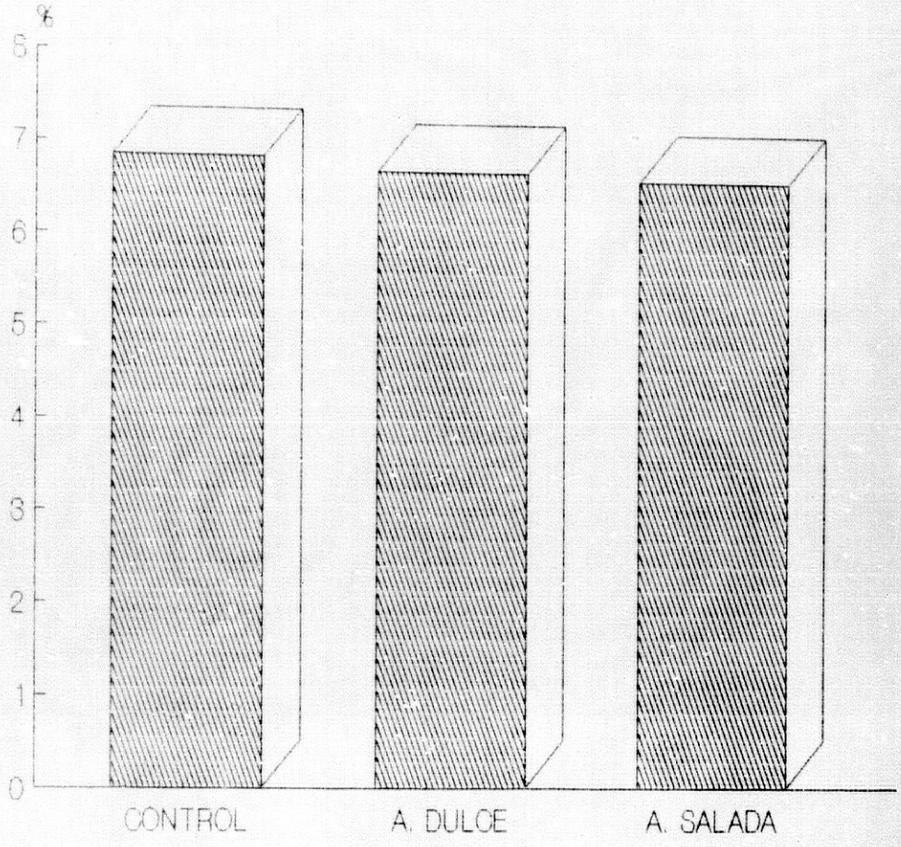


TABLA XXVIb

DIFERENCIAS ENTRE SERIES

No hay diferencias estadísticamente significativas entre las tres series.

FOSFATIDIL- INOSITOL
tejido pulmonar
(%)

TABLA XXVII

SERIE:	CONTROL	A. DULCE	A. SALADA
ANIMAL			
1	7.17	6.02	8.19
2	10.89	5.99	8.36
3	8.42	6.59	7.95
4	6.92	5.31	6.36
5	7.19	7.17	6.52
6	9.92	7.45	5.47
7	10.19	8.20	6.95
8	10.75	7.51	6.65
9	10.65	8.61	7.19
10	8.66	7.43	7.71
11	10.53	7.67	6.75
12	9.00	8.30	7.39
13	8.58	6.56	8.27
14	7.53	6.67	8.52
15	6.98	8.86	7.73
$\bar{x}$	8.89	7.22	7.33
S.D.	1.50	1.03	0.88
C.V.	16.90	14.27	11.98

FOSFATIDIL-INOSITOL
tejido pulmonar

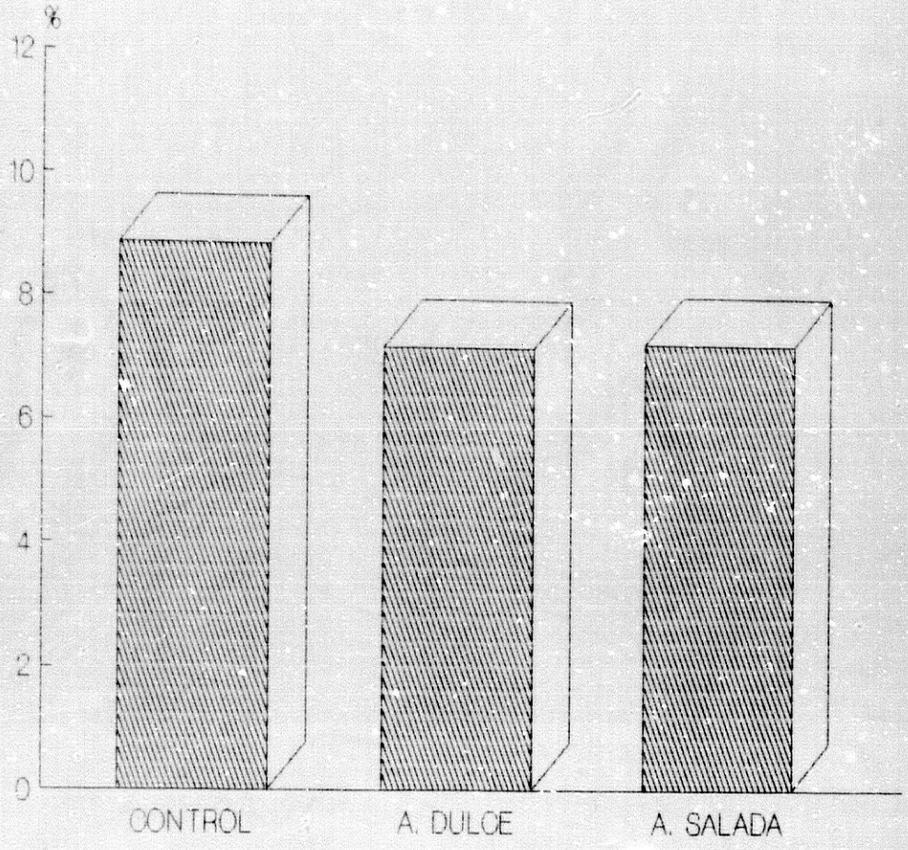


TABLA XXVIIb

DIFERENCIAS ENTRE SERIES

SERIES	t_{exp}	g.l.	SIGNIF.
I-II	4.17	42	p<0.01
I-III	3.72	42	p<0.05
II-III	0.45	42	N.S.

PEPTIDO NATRIURETICO AURICULAR (A.N.P.)
plasmático
(pg/ml)

TABLA XXVIII

SERIE:	CONTROL	A. DULCE	A. SALADA	INMERSION
ORIGEN:	A	A	A	A
ANIMAL				
1	76.51	378.13	198.15	93.72
2	83.15	415.31	163.37	88.41
3	89.52	349.63	125.49	107.35
4	67.34	295.67	207.88	77.99
5	88.41	383.23	222.35	96.07
6	92.23	401.70	183.48	-
7	67.73	395.78	151.87	-
8	70.44	302.51	247.15	-
9	78.51	287.89	197.98	-
10	82.01	324.34	158.14	-
11	92.27	402.22	167.42	-
12	68.49	307.81	244.32	-
13	70.33	348.30	227.51	-
14	71.59	422.27	173.27	-
15	88.40	359.54	188.22	-
$\bar{x}$	79.19	358.27	190.44	92.61
S.D.	9.44	45.86	35.14	10.92
C.V.	11.92	12.80	18.45	11.78

PEPTIDO NATRIURETICO AURICULAR
plasmático

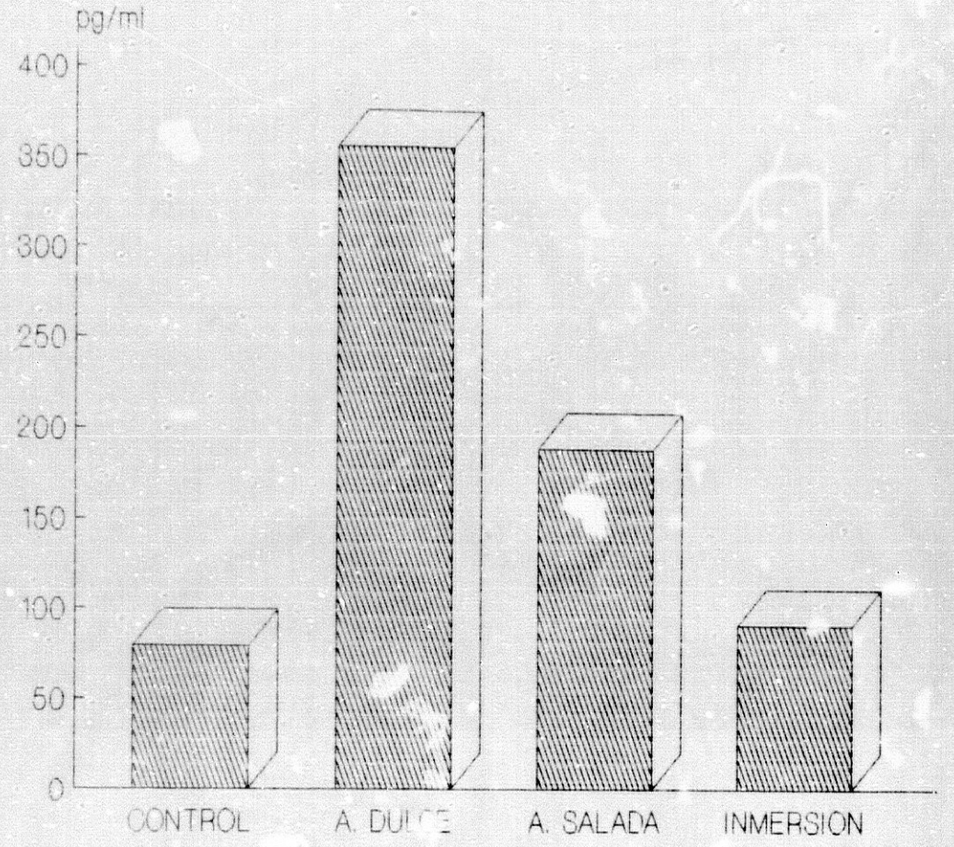


TABLA XXVIIIb

DIFERENCIAS ENTRE SERIES

SERIES	t_{exp}	g.l.	SIGNIF.
I-II	36.42	4;46	p<0.0001
I-III	14.33	3;46	p<0.001
I-IV	0.69	3;46	N.S.
II-III	21.94	3;46	p<0.0001
II-IV	32.16	3;46	p<0.0001
III-IV	12.41	3;46	p<0.001

PEPTIDO NATRIURETICO AURICULAR (A.N.P.)
Auricula Derecha y Auricula Izquierda
(pm/mg)

TABLA XXIX

SERIE:	CONTROL		A. DULCE		A. SALADA		INMERSION	
	AD	AI	AD	AI	AD	AI	AD	AI
ANIMAL								
1	58.2	15.4	73.1	17.1	77.4	23.1	73.4	17.2
2	73.4	23.3	68.4	19.0	65.2	24.3	80.2	27.9
3	78.2	20.5	69.4	23.3	68.4	22.3	76.3	30.0
4	45.9	16.2	67.7	27.4	80.2	27.4	64.3	21.5
5	50.5	19.4	60.3	29.3	73.9	25.1	87.8	23.1
6	73.9	23.1	55.5	19.3	67.2	20.5	-	-
7	82.1	19.7	73.4	22.0	70.1	19.6	-	-
8	77.2	18.4	68.9	30.3	63.1	25.2	-	-
9	82.7	26.0	83.4	38.1	72.3	19.3	-	-
10	60.1	16.4	77.4	29.5	76.3	23.1	-	-
11	73.5	27.4	77.2	22.4	61.1	20.1	-	-
12	78.5	23.9	80.4	27.7	58.5	17.3	-	-
13	90.0	37.4	85.4	23.1	69.7	23.2	-	-
14	67.5	23.4	68.9	20.3	75.1	27.3	-	-
15	75.4	30.1	77.3	24.0	78.3	21.8	-	-
$\bar{x}$	71.2	22.7	72.5	24.9	70.5	22.6	76.4	23.9
S.D.	12.4	5.9	8.2	5.5	6.6	2.9	8.7	5.1
C.V.	17.4	25.9	13.1	22.2	9.3	12.8	11.3	21.4

PEPTIDO NATRIURETICO AURICULAR
Auricula Derecha - Auricula Izquierda

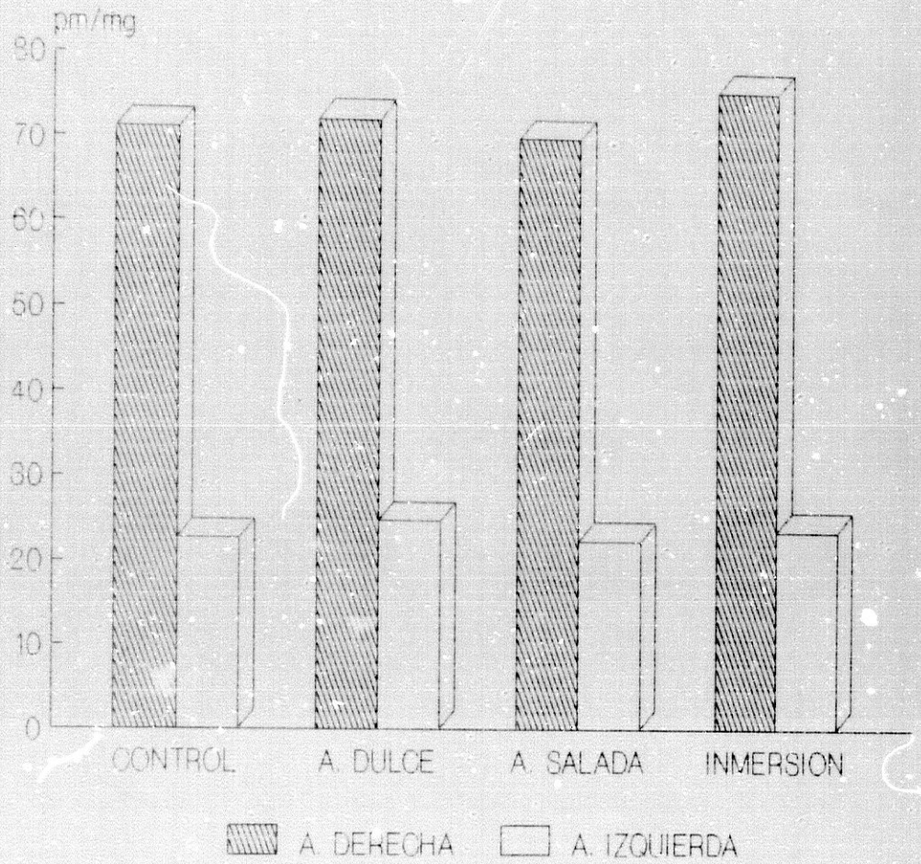


TABLA XXIXb

DIFERENCIAS ENTRE SERIES

AURICULA DERECHA

No hay diferencias estadísticamente significativas entre las cuatro series.

AURICULA IZQUIERDA

No hay diferencias estadísticamente significativas entre las cuatro series.

TABLA XXX

COMPARACION DE LOS COCIENTES ENTRE DIVERSOS FOSFOLIPIDOS DEL LAVADO Y DEL TEJIDO PULMONAR.

FOSFATIDIL-COLINA lavado / FOSFATIDIL-COLINA tejido

MEDIAS	SERIES	t_{exp}	g.l.	SIGNIF.
I:1.62	I-II	0.28	42	N.S.
II:1.58	I-III	7.34	42	p<0.001
III:1.19	II-III	7.06	42	p<0.001

FOSFATIDIL-ETANOLAMINA lavado / FOSFATIDIL-ETANOLAMINA tejido

MEDIAS	SERIES	t_{exp}	g.l.	SIGNIF.
I:5.73	I-II	7.25	42	p<0.001
II:2.46	I-III	8.53	42	p<0.001
III:2.01	II-III	3.29	42	p<0.01

FOSFATIDIL-COLINA lavado / FOSFATIDIL-ETANOLAMINA lavado

MEDIAS	SERIES	t_{exp}	g.l.	SIGNIF.
I:18.09	I-II	15.07	42	p<0.001
II:7.17	I-III	18.17	42	p<0.001
III:4.91	II-III	2.98	42	p<0.05

FOSFATIDIL-COLINA lavado / FOSFATIDIL-GLICEROL lavado

MEDIAS	SERIES	t_{exp}	g.l.	SIGNIF.
I:8.60	I-II	7.99	42	p<0.001
II:5.08	I-III	11.52	42	p<0.001
III:3.41	II-III	3.53	42	p<0.01

FOSFATIDIL-GLICEROL lavado / FOSFATIDIL-ETANOLAMINA lavado

MEDIAS	SERIES	t_{exp}	g.l.	SIGNIF.
I:2.10	I-II	7.08	42	p<0.001
II:1.41	I-III	6.75	42	p<0.001
III:1.43	II-III	0.33	42	N.S.

6. DISCUSION

6.1. DISCUSION PARCIAL

El primer aspecto que queremos resaltar en el capítulo de Discusión de esta Tesis Doctoral, correspondería acaso más concretamente al capítulo de Resultados, ya que nos referimos a los hallazgos obtenidos en la realización de la autopsia de todos y cada uno de los animales de la muestra experimental.

No obstante, nos concedemos esta licencia por el hecho de que los hallazgos de las autopsias no han sido manejados por nosotros como Resultados propiamente dichos. Son muchas las publicaciones que describen los resultados del examen necrópsico, siendo de sobra conocidos y, con los fines de esta Tesis, no procedía su estudio detenido.

Hay que especificar que nosotros no hemos realizado una autopsia completa de los animales, con ausencia -por ejemplo- de la disección del cráneo, y ello por estar condicionados por el tipo de marcador que queríamos estudiar. La determinación de parámetros bioquímicos exige una recogida precoz de las muestras, lo que no permite un examen necrópsico detenido. De todos modos, dado que la obtención de muestras exigía una

amplia y cuidadosa disección de ciertas zonas del animal, estimamos procedente aprovechar la ocasión para comprobar la presencia de algunos de los signos clásicos de la sumersión vital, como la espuma traqueobronquial, aumento del tamaño pulmonar con presencia de las manchas de Paltauf, sangre fluida, etc... Los pulmones se mostraban, en su conjunto, aumentados de tamaño de modo homogéneo, no apreciándose zonas con un incremento volumétrico mayor a otras; igualmente, la coloración tenía caracteres de homogeneidad, con las características ya descritas.

Todos estos signos típicos aparecieron en los dos grupos problema, con mayor o menor intensidad, pero sin diferencias significativas inducidas por el tipo de agua.

Igualmente, a lo largo de la experiencia analizamos el comportamiento de los animales durante el proceso de sumersión anotando las reacciones más evidentes. Es este un método clásico en el estudio de la sumersión, empleado por primera vez por BROUARDEL y VIBERT en 1880, y posteriormente por SWANN y SPAFFORD (1947-1951), ORLOWSKI (1986) y otros muchos.

La observación detenida se fundamentaba en la posibilidad de encontrar diferencias durante la realización de la autopsia entre la sumersión vital en agua dulce y agua salada, y por tanto, comprobar la posible existencia de esas diferencias durante el proceso de la muerte.

El comportamiento de nuestra muestra experimental se puede resumir en las siguientes fases:

1. **Fase de Inmovilidad**: tras ser introducido el animal en el agua, y tras 3 ó 4 segundos de bruscos movimientos debidos al estímulo del contacto con el agua, el animal permanecía totalmente inmóvil sin aspirar ni espirar aire ni agua, con los ojos cerrados y gran taquicardia. Duración aproximada: 90 segundos.

2. **Fase de Agitación:** comienza a los 90 segundos, un poco antes de que se produzca la expulsión del hongo de espuma. Primero comenzaban a agitarse sin hacer movimientos respiratorios, pero poco después aparecían profundas inspiraciones y la expulsión evidente de espuma por la boca. El animal abre los ojos y se mantiene una gran taquicardia y taquipnea. Duración aproximada: 60 segundos.

3. **Fase de Agonía:** comienza a los 150 segundos (aproximadamente), tras ir agotándose el animal en la fase de lucha. La respiración se hace lenta y pausada, los latidos cardíacos comienzan a hacerse imperceptibles, el animal cierra los ojos y va perdiendo su tensión muscular.

Este esquema de comportamiento corresponde tanto a la sumersión vital en agua dulce como en agua salada, y es totalmente superponible a las descripciones clásicas ya conocidas. Igualmente, los hallazgos de la autopsia no permiten establecer diferencia alguna entre ambos grupos. Este resultado confirma lo ya señalado por muchos autores (GORDON, 1972; GORDON et al, 1988) que afirman que de los hallazgos de autopsia no es posible establecer el diagnóstico diferencial antes mencionado, siendo para ello necesario acudir a marcadores más específicos y sensibles que resalten las diferencias fisiopatológicas entre ambos mecanismos de muerte.

DISCUSION

El análisis y valoración de los resultados obtenidos, así como la discusión de los mismos con vistas a analizar nuestra hipótesis de partida, comprobando la utilidad o no de los nuevos marcadores bioquímicos de la sumersión vital que proponemos, plantea una primera dificultad evidente, derivada del gran número de datos y amplia información obtenida tras nuestro trabajo experimental. Este gran volumen de resultados exige, desde nuestro punto de vista, tanto un análisis pormenorizado e individualizado de ellos, así como un exámen global del comportamiento fisiopatológico y bioquímico, en relación a la sumersión vital, en la muestra experimental empleada.

Por ello, y con vistas a una mejor sistematización de este apartado, procederemos en primer lugar al análisis de los resultados del estudio estadístico aplicado sobre cada uno de los marcadores, para realizar posteriormente una discusión conjunta de los mismos, una vez desbrozada la maraña inicial de datos y seleccionados los que revisten mayor importancia.

6.1.1. PARAMETROS MEDICO-PONDERALES

Como era de suponer inicialmente, muchos de los parámetros médico-ponderales no arrojan información alguna en su relación con la muerte por sumersión, pero si nos confirman la homogeneidad de la muestra experimental empleada.

Tal y como ya se ha mencionado en otro capítulo, la muestra, constituida por animales criados en el Servicio de Animales de Laboratorio de la Universidad de Granada, reunía las condiciones ideales de homogeneidad referente a aspectos como edad, peso, dieta, etc... Este aspecto viene confirmado por la ausencia de diferencias estadísticamente significativas en lo que se refiere a datos como el peso del animal, corazón y aurículas, datos que, aunque esperados, nosotros hemos preferido evaluar estadísticamente, ya que ello no revestía ninguna dificultad. Con objeto de no mostrar una serie de datos que, ya a simple vista, no presentan diferencias significativas, hemos representado sólo la gráfica y la tabla que muestra el peso del animal (tabla I y Ib). El corazón y las aurículas han dado los siguientes pesos medios (expresados en gramos):

SERIE	CORAZON	A. DERECHA	A. IZQUIERDA
I	4.413	0.185	0.209
II	4.368	0.177	0.205
III	4.290	0.169	0.193

Efectivamente, ninguno de esos datos debe encontrarse modificado, por razones que son evidentes. Las aurículas liberan uno de nuestros marcadores bioquímicos, el Péptido Natriurético Auricular, pero las cantidades liberadas (picogramos), no tienen reflejo en el peso, que viene expresado

en unidades mucho mayores. En relación al peso del animal, este se efectuó con la única intención de controlar la muestra antes del sacrificio (Capítulo 4; Material y Método). Medidas del peso posteriores a la muerte hubieran carecido de toda significación y de posterior aplicación práctica a casos humanos. No ocurre lo mismo en el caso del peso de los pulmones, órgano que,como es bien conocido, sufre la acción directa del líquido de sumersión.

La medida de peso real en los pulmones (peso de ambos pulmones con 5 cm. de tráquea tal y como son extraídos del cadáver) ha dado diferencias estadísticamente significativas entre las tres series estudiadas por nosotros (tabla II y IIb), siendo la serie de sumersión en agua dulce (serie II) la que da resultados más altos, seguido de la serie de sumersión en agua salada (serie III) y con gran diferencia de ambos respecto a la serie control (serie I.) Las diferencias entre las series de sumersión vital y la serie control eran esperadas y evidentes. Lógicamente, en el caso de los problemas (II y III), el paso del fluido de sumersión al aparato respiratorio es el responsable del aumento del peso.

Sí puede sorprender el hecho de que los pesos reales de los pulmones más altos y estadísticamente diferentes al resto, corresponden a la serie II. Este resultado va en contra de lo hallado por COPELAND (1985), quien no encuentra diferencias en el peso pulmonar en el tipo de sumersión en humanos, y de YAMAMOTO et al (1983), quien encontró en ratas pesos más altos empleando solución salina hipertónica que cuando empleó agua dulce. Hay que considerar que la composición de esa solución salina hipertónica (1.7 gr%.) no es idéntica a lo que se conoce como agua de mar (2.3 gr%.), a la que si se asemeja fielmente la utilizada por nosotros realizada según la fórmula ya mencionada de LYMAN y FLEMING (1940). GIAMMONA y MODELL (1967) encontraron un peso menor en los corazones de los animales experimentales muertos en agua salada, concordando con nuestros hallazgos. Este hallazgo debe de ser, en nuestro caso, analizado teniendo en cuenta el tiempo que tardó el animal en morir. Pese a la

similitud que macroscópicamente ofrecen, no cabe duda de que el mayor tiempo que tardaron en morir los animales sumergidos en agua dulce va a facilitar un mayor y más profundo paso de agua a las vías respiratorias, siendo, a nuestro entender, la causa de la ya mecionada diferencia.

El denominado *peso teórico*, calculado según una relación peso pulmonar/peso animal, ofrece, en buena lógica, una total homogeneidad.

Con la finalidad de obtener la mayor información posible, objetivamos el incremento de peso de los pulmones tanto en cifras absolutas como en porcentaje (tabla V y Vb), comprobando que se produce un mayor incremento, tanto en cifras absolutas -gramos-, como porcentualmente, en las sumersiones en agua dulce, lo cual era totalmente previsible a la vista de los resultados y teniendo en cuenta la homogeneidad de la muestra.

Otro grupo de parámetros métrico-ponderales está constituido por los pesos del estómago del animal (tabla IV y IVb) y de sus contenidos líquidos y sólidos (tabla V y Vb), dirigidos a comprobar la ausencia o presencia del paso del fluido del líquido de sumersión al aparato digestivo. Si bien en algunos casos se produjo una deglución efectiva, esta no fue lo suficientemente intensa como para justificar diferencias estadísticamente significativas entre las series , lo que confirma el conocimiento ya clásico de que en la sumersión vital no se produce -en lo que se refiere al mecanismo de la muerte- afectación del aparato digestivo. Algunos autores señalan que es posible la producción de una asfixia simple por espasmo laríngeo tras deglución de grandes cantidades de agua (GISBERT, 1986). Entradas de líquido de sumersión pasivamente tras la muerte no se produjeron ya que la permanencia de los animales en el agua fue mínima.

Finalmente, dos parámetros que hemos incluído dentro de este grupo, como son el tiempo que tarda en aparecer el

hongo de espuma y el tiempo que tarda en morir el animal, merecen una especial atención, sobre todo teniendo en cuenta su íntima relación con los hallazgos ya referidos de los pesos pulmonares (tabla VI y VIb).

Mientras que en el tiempo que tarda en aparecer el hongo de espuma no hemos encontrado diferencias estadísticamente significativas entre las series problema -debiendo señalar aquí que en todos los casos este hongo se produjo- no sucede así en el tiempo que tardo el animal en morir, donde hemos encontrado diferencias estadíticamente significativas en favor de la serie II.

Efectivamente, los animales sumergidos en agua dulce tardaron mas tiempo en morir que los sumergidos en agua salada (tabla VI y VIb). Este hallazgo va en contra del concepto clásico de que la supervivencia, en el caso de la sumersión vital, en agua salada es mayor que en agua dulce. Hoy en día son muchos los autores que aún apoyan esta teoría y otros muchos los que abogan por la teoría contraria (MODELL et al, 1967; MAXWELL, 1970; YAMAMOTO et al, 1983; PARIKH, 1988), y otros que no encuentran diferencias significativas entre los periodos de supervivencia tras la sumersión en agua dulce y agua salada.

La mayor supervivencia en agua dulce explica el hallazgo mencionado anteriormente de un mayor peso en los pulmones en esos casos, dado que a mayor supervivencia le corresponderia una mayor entrada de fluído de sumersión en los pulmones, el edema agudo de pulmón sería mas grave e intenso, etc... No obstante hay que tener en cuenta dos aspectos importantes a la hora de analizar la duración de la agonía:

1º La diferencia estadística obtenida no es excesivamente importante, y en su presencia puede haber intervenido el hecho de que el diagnóstico de muerte se hizo por simple palpación de los pulsos carotídeo y cardiaco (GIAMMONA y MODELL, 1967). Este método ha podido inducir a errores,

habiéndonos sido imposible monitorizar al animal ya que ello hubiera influído negativamente sobre otros aspectos de este trabajo experimental, tal y como justificamos en el Capítulo de Material y Método. Sin embargo, el cese -aunque sea detectado a *grosso modo*- de las funciones cardíaca y pulmonar, nos garantiza, desde la perspectiva de la fisiopatología de la sumersión, un correcto diagnóstico de muerte.

2º Son muchos los autores que coinciden actualmente en negar el valor real de este parámetro, antiguamente muy empleado, por el gran número de factores que influyen en él: capacidad de resistencia del individuo, temperatura del agua, momento de la sumersión, etc. (POLSON y GEE, 1973; KNIGHT, 1976; GIERSTEN, 1977; GORDON y SHAPIRO, 1988; PARIKH, 1988). Por lo tanto, en unas determinadas cirscuntancias, por ejemplo, las nuestras, los animales van a morir en un menor tiempo en agua salada, lo que no significa que esta sea más letal en general.

6.1.2. PARAMETROS HEMATOLOGICOS

El análisis de los resultados del estudio estadístico de los parámetros hematológicos es acaso el más fácil, dada su concordancia con lo señalado por la gran mayoría de los autores con anterioridad, y con lo que nos planteamos en nuestra hipótesis de partida. Ello justifica el empleo de estos parámetros en la presente Tesis Doctoral como elementos de control del resto de los parámetros bioquímicos más novedosos.

Los niveles de hemoglobina plasmática se han modificado sensiblemente en nuestras series. La hemoglobina plasmática se ha incrementado en la serie II con respecto a las series I y III (tabla VII y VIIb), no existiendo diferencias entre las series control y agua salada. En la sumersión en agua dulce se produce, por la diferencia de osmolaridades, el paso de agua al interior del hematíe, con posterior ruptura del mismo, liberándose gran cantidad de hemoglobina al plasma. Según cita DESMAREZ (1963), FAINER argumentaba que este enorme aumento súbito de hemoglobina era la causa de la muerte.

Sin embargo, los mismos autores que propusieron su uso, BROUARDEL y VIBERT en 1880, hicieron notar poco después la poca fiabilidad de los datos así obtenidos porque la hemólisis postmortal y putrefactiva hace que aumenten sistemáticamente estos valores, siendo imposible diferenciar si la causa fue previa o no a la muerte. En este mismo sentido se expresaron PALTAUF, (1900) y THOINOT,(1916), y posteriormente la gran mayoría de los autores. Experimentalmente si que se encuentra una diferencia, siempre que la sangre sea recogida inmediatamente después del fallecimiento del animal. En la práctica, cuando la autopsia se dilata varias horas, esta prueba carece de toda validez.

Pese a no haber diferencias estadísticamente

significativas, queremos resaltar el hecho de que el agua salada tiene lo que hemos llamado un *efecto protector* sobre el hematíe, dificultando su ruptura. Observando la tabla VII, vemos unos niveles de hemoglobina plasmática más bajos en la serie III (animales ahogados en agua salada); creemos que ello es debido a que el aumento de sodio plasmático hace que el hematíe pierda parte de su contenido intracelular, que sale al plasma para compensar la hiperosmolaridad que éste tiene; el hematíe queda arrugado, estando su membrana menos tensa, y siendo por lo tanto más resistente.

Finalmente, no hemos encontrado diferencias arterio-venosas en ninguna de las tres series, lo que habla en favor de un equilibrio de molaridad en la totalidad de la sangre del sistema circulatorio antes de la muerte.

El proceso de hemólisis inducido por el agua dulce, si bien influye en las concentraciones de hemoglobina plasmática, no lo hace, lógicamente, en las de **hemoglobina total**, salvo por el hecho de producir una hemodilución. Por contra con el agua salada se produce un fenómeno de hemoconcentración que justifica el incremento de los niveles de hemoglobina total (tabla VIII y VIIIb).

El estudio de este parámetro con fines diagnósticos fue propuesto por BROUARDEL y VIBERT en 1880, al igual que hicieron con tantos otros parámetros hematológicos. Si consideramos el valor de hemoglobina total como estable, el paso de agua lo hará disminuir y la salida de plasma, en sumersión en agua salada, lo aumentará. Sin embargo, el principal problema para su uso es que no se conocen los valores previos de la víctima antes de morir, por lo que el hecho de encontrar en un cadáver 12.5 o 13 gramos de hemoglobina no nos asegura una muerte en agua dulce con la presencia de hemodilución. Autores clásicos indicaban que en agua dulce se produce una disminución de hemoglobina, aunque hay otros muchos que decían que no hay diferencias significativas.

DISCUSION

Al igual que con la hemoglobina plasmática, no hemos encontrado diferencias significativas entre las sangres arterial y venosa (tabla VIIIb), lo que habla, nuevamente, en favor de una mezcla homogénea de ambos tipos de sangre.

Por ello, ya en 1916, THOINOT afirmaba en su "Tratado de Medicina Legal" que *esta práctica es de poco interés experimental*. Con el están de acuerdo la gran mayoría de los autores de los grandes tratados de Medicina Legal y Forense de la actualidad, cuando ni siquiera citan este tipo de pruebas.

Ello no quiere decir que su estudio no ofrezca resultados válidos. Autores como SWANN y SPAFFORD (1951) y MODELL(1969) la han estudiado y concluyen que el uso de este parámetro, conjuntamente con otros de tipo hematológico como Hemoglobina Plasmática, Volumen Corpuscular Medio y Número de Hematíes, puede ofrecer datos que inclinen certeramente hacia uno u otro diagnóstico.

Los valores obtenidos al determinar el **Volumen Corpuscular Medio** arrojan diferencias claramente significativas para la serie II, al aumentar en ésta el volumen de los hematíes por el paso de agua dulce al interior de estas células. Por el contrario, ante una solución plasmática hipertónica, como acontece en la serie III, se provoca una salida del contenido intraeritrocitario al plasma sanguíneo y al pulmón, con lo que el hematíe ve disminuir significativamente su volumen (tabla IX y IXb).

Al ser sus valores calculados indirectamente (valor hematócrito / número de hematíes) su estudio adolece de los defectos de los anteriores parámetros, habiendo sido, por estos motivos, pocas veces valorado.

Nosotros no hemos encontrado diferencias estadísticamente significativas entre las sangres arterial y

venosa (tabla IXb).

El número de hematíes ha sido significativamente menor en la serie II (tabla X y Xb). La disminución del número de eritrocitos en la serie II debe de ser achacada a dos factores: la hemodilución y la destrucción de estos elementos por la baja tonicidad del agua que penetra. Este hecho ya fue observado por BROUARDEL y VIBERT en 1880. Los mismos problemas expuestos al hablar de la hemoglobina plasmática son los que nos encontramos al estudiar el número de hematíes, por razones obvias. Por lo tanto, su validez es más que relativa, no siendo hoy en día aconsejado por ningún autor como parámetro a estudiar para basar un diagnóstico.

El número de hematíes encontrado en la serie III (agua salada), es superior a los de la serie I (control), lo que nos induciría a pensar en que ha existido una hemoconcentración, concordando estos datos con otros de tipo hematológico, como la hemoglobina total (tabla VIII).

Al igual que en el resto de los parámetros hematológicos, no hemos encontrado diferencias arterio-venosas (tabla Xb).

Los resultados referentes a los valores del Hematocrito son también fácilmente explicables. Nuestros resultados permiten comprobar la existencia de diferencias entre las series problema y la serie control (tabla XI y XIb). En ambos casos el valor hematocrito es mayor, aunque por procesos distintos.

En los animales sumergidos en agua salada, la existencia de un fenómeno de hemoconcentración hace que, pese a la disminución en un 10% del Volumen Corpuscular Medio, aumente este valor respecto a la serie control.

Por otro lado, en el agua dulce -pese a la lisis

y hemodilución que ocasiona- el gran tamaño de los hematíes restantes hace que su valor hematocrito sea superior al de la serie control y equiparable al de la serie III.

No han sido muchos los autores que lo han estudiado siendo, en condiciónes experimentales, sus resultados similares a los de este trabajo (SWANN y SPAFFORD, 1951; FARTHMAN y DAVIDSON, 1965; MODELL et al, 1967; ORLOWSKI, 1987).

Las diferentes tonicidades, en relación al plasma, de los fluidos que hemos empleado en la sumersión, nos ha impedido utilizar este parámetro como marcador de la hemodilución. Sin embargo, es éste un parámetro de gran valor en la práctica clínica, sobre todo quirúrgica, pues conociendo los datos previos del paciente y utilizando sustancias isotónicas, es el más fiable, rápido y sencillo de determinar de los marcadores de hemodilución, tal y como pone de manifiesto en sus múltiples experiencias -internacionalmente reconocidas- el Catedrático de Patología Quirúrgica de nuestra Facultad, Prof. Vara Thorbeck (VARA-THORBECK y GUERRERO, 1980; GUERRERO y VARA-THORBECK, 1982; VARA-THORBECK y GUERRERO, 1985; VARA-THORBECK et al, 1986; VARA-THORBECK y ROSELL-PRADAS, 1986; VARA-THORBECK y GUERRERO, 1987; VARA-THORBECK et al, 1988).

No hay evidencia -al igual que en los otros marcadores- de diferencias arterio-venosas (tabla XIb).

Desde que fueron la gran mayoría de ellos propuestos a finales del siglo pasado, estos denominados *parámetros hematológicos* han debido de sufrir las más diversas críticas, algunas de ellas con tan sólido fundamento, que han conducido a su abandono, no mereciendo hoy la consideración de los tratadistas clásicos de la Medicina Legal.

En primer lugar es objeción importante la falta de objetividad o relatividad de los datos; al no poder conocer los valores normales del ahogado en vida se hubo de recurrir a

las diferencias arterio-venosas, que alcanzaron su máximo apogeo con la técnica de GETTLER (1921), aunque pronto se vió que la sangre se podía llegar a mezclar tan que era imposible encontrar diferencias. Perdida la objetividad y, existiendo casos en que las hemodiluciones o hemoconcentraciones no son lo suficientemente masivas como para ofrecer claros caminos, este tipo de técnicas comenzaron a no usarse.

En segundo lugar, este tipo de parámetros se ven muy afectados por los fenómenos putrefactivos, que llegan a alterar sus valores hasta el extremo de no poder interpretarlos. Como señala GORDON (1972) sólo en condiciones totalmente estandarizadas de laboratorio y con una inmediata recogida de las muestras es posible obtener datos significativos. Efectivamente, tal y como señalamos unas líneas antes, la mayoría de las autopsias médico-legales tienen una data de varias horas, cuando no de días e incluso semanas. Cuando el perito tiene acceso a tomar muestras, puede dar por seguro que en la gran mayoría de los casos, estos parámetros no le van a ser útiles.

Finalmente y en tercer lugar, la posibilidad de emplear nuevos marcadores de tipo bioquímico (principalmente iones) o ajenos al organismo (diatomeas), han inducido a los diversos autores a abordar aquel tipo de métodos.

Sin embargo, una vez más se confirma que en condiciones totalmente artificiales y alejadas, cuando no opuestas, a la realidad, el diagnóstico de sumersión vital y el diferencial entre agua dulce y agua salada, se podía hacer perfectamente con el solo uso de los parámetros hematológicos hasta aquí analizados.

Los resultados concernientes a la concentración de proteinas en suero se explican por el mecanismo de la hemodilución, que justifica que los mayores niveles se encuentren en la serie I (control) y menores en la serie II (agua dulce)

(tabla XII y XIIb). El estudio de este marcador de sumersión vital no es, sorprendentemente a nuestro entender, de los que más atención ha merecido por parte de los diversos autores. Pese a adolecer de los mismos defectos con que contaban los parámetros de la serie roja, su fácil determinación y mayor homogeneidad de sus niveles entre diferentes individuos hacen que su estudio pueda ser francamente útil.

Así lo entiende el Profesor parisino M. DURIGON (1988), quien en una reciente comunicación al XIV Congreso Internacional de Medicina Legal y Medicina Social propone a las proteínas plasmáticas como los mejores marcadores de hemodilución, tras haber hecho un detallado estudio de otros muchos posibles marcadores.

En la serie II (agua dulce) hay diferencias en la concentración arterio-venosa de proteínas, tiene niveles medios mayores la sangre venosa que la arterial. Ello abogaría en favor de una mayor hemodilución de la sangre arterial, que es la que primero recibe al agua que penetra por los pulmones. Sin embargo, este dato se contradice parcialmente con los de parámetros anteriores, en que no habría diferencias arterio-venosas. Pese a que la diferencia es mínima, pensamos que las proteínas recogen más fielmente la realidad del proceso, que los parámetros hematológicos que serían instrumentos más burdos para medir una diferencia tan sutil.

Las series II y III no ofrecen diferencias arterio-venosas (tabla XIIb).

Finalmente, en referencia a las medidas de la osmolaridad, las concentraciones iónicas del agua salada, referidas especialmente a los niveles de Sodio, justifican que la osmolaridad haya alcanzado sus cifras más altas en los animales de la serie III (tabla XIII y XIIIb). Por contra, no hay diferencias entre la serie I control y la serie II,sumersión en

agua dulce, lo que coincide con referencias de otros autores (RAMMER y GERDIN 1976; FOROUGHI, 1971). La íntima relación que la osmolaridad tiene con el sodio, del cual depende principalmente, hace que no haya sido un parámetro estudiado independientemente, sino que siempre lo fue en relación al mencionado ión. Una vez conocidos los valores de sodio, el valor de la osmolaridad es secundario, pues puede verse afectada por otros elementos (proteinas principalmente), que pueden hacer difícil la evaluación de sus resultados (RAMMER y GERDIN, 1976).

6.1.3. IONES PLASMATICOS Y DEL HUMOR VITREO

El análisis de los resultados de los niveles de iones estudiados en nuestro trabajo experimental (Na,K,Cl,Ca,Mg) merece un especial detenimiento, dado que en la alteración del balance hidroelectrolítico se basan muchas de las teorías existentes sobre el mecanismo de muerte en la sumersión vital. Lógicamente en este análisis cobran una especial importancia los iones Na y K.

El **Sodio** es un catión de una especial importancia en el líquido extracelular que interviene en la regulación del equilibrio ácido-base, asociado en gran parte al Cloro y al bicarbonato (MURRAY et al, 1988). Igualmente cumple la importante misión de mantener la presión osmótica del organismo, protegiéndolo así de la pérdida excesiva de líquido. Así mismo, preserva la excitabilidad normal de la musculatura y la permeabilidad celular regulando el volumen de la célula. La mayor parte se encuentra en líquidos extracelulares del organismo, con cifras de:

Sangre total..... 160 mEq /l
Plasma..... 143 mEq /l

En el campo Médico-Legal ha sido estudiado por numerosos autores para conocer su comportamiento postmortal, como JETTER, (1959), NAUMANN, (1959), SCHMIDT, (1970), VILLANUEVA, (1980), etc...(cítados por HERNANDEZ-CUETO,1985).

Los niveles más altos de Sodio los hemos obtenido en la serie de sumersión en agua salada (III) (tabla XIV y XIVb). Por otra parte, no hemos obtenido diferencias entre las series I y II (Control, Agua dulce). Resultados similares a los nuestros fueron obtenidos en trabajos previos por SWANN y SPARDFORD

(1951), MODELL y DAVIS (1959), MAXWELL (1970) y PÜSCHEL et al (1982). De los trabajos aquí mencionados, fueron los de SWANN y SPAFFORD en 1951 el punto de partida para la teoría de la muerte por fibrilación ventricular en la sumersión vital, hoy en franca discusión. Efectivamente, son hoy muchos los autores los que a pesar de reconocer la existencia de una alteración del balance electrolítico durante la sumersión vital, especialmente en agua salada, consideran que ello no justifica el diagnóstico de muerte por fibrilación ventricular abogado inicialmente y de forma especial por SWANN y SPARDFORD en 1951 (MODELL y DAVIS, 1959; GORDON, 1972; MAESTRACCI, 1984).

Nosotros abordaremos el estudio del mecanismo de muerte más adelante, siendo nuestra intención aquí tan solo comentar el resultado estadístico obtenido. El hecho de que los niveles más altos se obtengan en la serie III es lógico dado el aporte de este electrolito que supone el agua salada. Por razonamiento contrario, esperábamos encontrar los niveles más bajos de sodio en la serie II con respecto a la serie control, razón al fenómeno de hemodilución. Sin embargo, hay que resaltar que la gran mayoría de los autores coinciden en señalar que las diferencias en el contenido de sodio entre las sumersiones en agua dulce y agua salada con respecto a la serie control, aunque se producen, son de mínima entidad; ello podría justificar nuestro hallazgo, sobre todo si tenemos en cuenta que nuestros resultados numéricos han dado cifras medias ligeramente más altas para la serie II con respecto a la serie I, aunque sin diferencias estadísticamente significativas (tabla XIV).

Es obligado analizar ahora los resultados del Cloro dado que, como ya mencionamos anteriormente, su metabolismo en la regulación del equilibrio ácido-base está intimamente relacionado con el del sodio. De hecho, los resultados obtenidos en el estudio estadístico han sido similares al sodio, con valores significativamente elevados en la serie III respecto a las series II y I, que no presentan diferencias (tabla XV y XVb).

El cloro, cuyos valores normales se situan entre 96 y 106 mEq /l, es el principal anión de los fluidos extracelulares interviniendo muy activamente en el mantenimiento del equilibrio ácido-base y de la osmolaridad,(MURRAY et al, 1988).

Los niveles de cloro han sido empleados clásicamente como método para la determinación de la muerte por sumersión vital, cuantificando sus niveles junto con los de sodio, en el conocido Test de GETTLER (1921), hoy en desuso. Dicho test fue ideado por el mencionado autor, tras comprobar que los test y pruebas conocidas hasta entonces no le ofrecían resultados fiables, y que se alteraban rápidamente con el paso del tiempo. GETTLER propuso medir el contenido de cloruro sódico (NaCl) en ambos ventrículos y calcular la diferencia; (VI-VD: NaCl en ventrículo izquierdo - NaCl en ventrículo derecho); si ésta era menor de 25 mg, la persona no había muerto por sumersión; si la diferencia era mayor de +25 mg (hay más cantidad en corazón izquierdo), la muerte fue por sumersión en agua salada; finalmente, y al contrario, si la diferencia es de -25 o aún mas negativa (hay mas ClNa en cámaras derechas), la muerte fue por sumersión en agua dulce. SWANN y SPAFFORD (1951) refieren que YAMAKAMI (1922) obtuvo resultados similares a los de GETTLER.

Esta prueba tuvo gran predicamento, y fueron numerosos los centros que la realizaron sistemáticamente con resultados diversos. Por ello, ALAN R. MORITZ (1944), Director del Departamento de Medicina Legal de la Universidad de Harvard, realizó una profunda revisión de los trabajos publicados hasta la fecha, siendo los resultados ciertamente desalentadores. Cuando las determinaciones de NaCl se realizan sobre animales de experimentación en condiciones standard, los resultados son coherentes y prometedores, pero al hacerlo sobre muestras humanas, los resultados varían y hacen que el método pierda totalmente su validez. MORITZ lo achaca, en parte, al uso de diferentes técnicas de cuantificación, pero los resultados eran evidentes.

Trabajos posteriores (ver citas en el próximo párrafo) volvieron a insistir en su invalidez, señalando que es la hipótesis, y no el método, la que está equivocada: en la gran mayoría de los fallecidos por sumersión el corazón late un número suficiente de veces como para que exista una perfecta mezcla y homogeneidad de la sangre de ambas cámaras cardíacas.

No obstante, la gran importancia del cloro a nivel extracelular y su participación en los procesos antes mencionados en íntima relación con el sodio han justificado que sus niveles en la sumersión vital hayan sido investigados por multitud de autores. En muchos trabajos, al igual que nos sucede a nosotros, el comportamiento de este ión corre paralelo al sodio, observándose incrementos del mismo en la sumersión en agua salada y disminuciones en la sumersión en agua dulce, (MODELL y DAVIS, 1969; MAXWELL, 1970; FOROUGHI, 1971; ORLOWSKI et al, 1987). También todos los autores, como en el caso del sodio, coinciden en señalar que las modificaciones de este ión son mínimas, por lo que su interpretación es compleja y acaso su participación en el mecanismo de muerte mínima. De los mencionados, sólo FOROUGHI (1971) refiere encontrar diferencias arterio-venosas, confiriendo cierta validez al test gettleriano.

Otro ión que reviste una especial importancia en el mecanismo fisiopatológico durante la sumersión vital es el Potasio. Nosotros hemos obtenido para este ión los niveles más altos en la serie control (tabla XVI y XVIb), con respecto a ambas series problema, y sin diferencias entre estas dos últimas

El potasio constituye el principal catión del líquido intracelular, pero es también un componente muy importante del líquido extracelular, debido a la influencia que tiene sobre la actividad muscular, especialmente en el miocardio. El metabolismo y funciones de este ión, así como su papel en

relación a los potenciales de membrana y en la conducción del impulso nervioso, es bien conocido y de una trascendencia innegable.

Intimamente relacionado con el sodio, se mantiene en equilibrio constante mediante la bomba sodio-potasio de la membrana celular. La energía necesaria para el funcionamiento de esta bomba es proporcionada por el ATP. Este ión ha sido ampliamente estudiado en el cadáver para determinar la data de la muerte en sangre, L.C.R. y humor vítreo, (LUNA 1978; VILLANUEVA, 1980), también se ha empleado para establecer el diagnóstico postmortal del infarto de miocardio por NAVARRETE (1976) y DE COSTELLO (1977) (citados por HERNANDEZ-CUETO, 1985) y para la determinación de la data de la muerte por ADJUNTATIS y COUTSELINIS (1975) y por STURNER (1964). Por último, este ión ha sido empleado para evaluar algunas asfixias experimentales en un trabajo realizado por VILLALOBOS en nuestra Cátedra en 1976, comprobando una elevación del mismo en la sofocación y en la estrangulación, confirmando los hallazgos de MODELL et al (1969), quien afirmó la gran liberación de potasio a consecuencia de hipoxias severas

La más reciente bibliografía (MODELL et al, 1969; MODELL y DAVIS, 1969; ORLOWSKI et al, 1987) aboga en favor de que los niveles de potasio son similares en la sumersión en agua dulce y salada. Esta afirmación está en contra de lo que clásicamente se ha venido afirmando: el paso de agua hipotónica a la sangre provoca hemólisis y salida de hemoglobina y potasio. La salida de hemoglobina ha podido ser confirmada por nosotros al detectar incrementos significativos de ésta en el plasma (tabla VII y VIIb); sin embargo, los niveles de K en los conejos ahogados en agua dulce son iguales a los conejos ahogados en agua salada. Aceptando la existencia de lísis eritrocitaria, el exceso de potasio liberado debería de ser detectable en plasma. El hecho de que nosotros no hayamos podido detectar el incremento nos hace pensar en varias posibilidades:

1. Que no haya existido tal aumento, extremo éste que es difícil de aceptar habida cuenta la existencia de ruptura masiva de celulas rojas (tabla X y Xb).

2. Que el aumento se haya visto compensado por la hemodilución, situación que no puede ser totalmente admitida puesto que otros iones no han sufrido una hemodilución de tal intensidad.

3. Que el organismo, tras detectar un incremento súbito y masivo de este ión de especial nocividad y que debe de mantenerse oscilando en unos márgenes muy estrechos, ponga en marcha drásticos mecanismos tendentes, bien a eliminarlo por la orina, bien a recaptarlo y ganarlo para otras células, forzando un funcionamiento al máximo de la bomba sodio/potasio y de otros posibles mecanismos. La monitorización del animal, con un control contínuo electrocardiográfico hubiese permitido detectar modificaciones significativas de los niveles de potasio.

El planteamiento de nuestro trabajo hace que sea meramente descriptivo. Llegados a estos extremos, lo procedente sería diseñar un estudio que explique estas contradicciones. Sin embargo, hay una serie de datos que, sin explicar el citado mecanismo, si apoyan nuestros resultados:

1. Por un lado se encuentran los trabajos antes citados en los que no aparece un incremento de potasio en ahogados en agua dulce.

2. El mecanismo de muerte por fibrilación ventricular, secundaria a grandes incrementos de potasio en el plasma, se halla -desde que por primera vez BANTING et al (1938) propusieron primera vez esta posibilidad- en franca discusión, no siendo en estos momentos aceptado por muchos autores (MODELL y DAVIS, 1969; SCHWAR, 1972; CAMPS et al, 1976; RAMMER y GERDIN, 1976; GIERTSEN, 1977; CURRAN et al, 1980; YAMAMOTO et al,1983; ORLOWSKI et al, 1987). Hay otros autores que citan a la

fibrilación como posible causa de la muerte (SWANN y SPAFFORD, 1951; SIMONIN, 1962; FOROUGHI, 1971; POLSON y GEE, 1973; KNIGHT, 1976; PARIKH, 1988), aunque ninguno de ellos aconseja cuantificar el potasio plasmático como parámetro con validez diagnóstica, lo cual habla en favor, cuando menos, de una gran inestabilidad de éste, que le hace perder su validez.

3. Existen numerosos trabajos de *tipo clínico* en los que se estudian personas que han podido ser recuperadas antes de fallecer ahogadas (near-drowning, en terminología inglesa). En estas circunstancias, MODELL y MOYA (1966), MODELL y DAVIS (1968), MODELL (1978) y MAESTRACCI (1984) han podido demostrar que **no existe hiperpotasemia** en estos pacientes recuperados de aguas dulces, a pesar de que algunos de ellos llegaron a las salas de reanimación pocos minutos después de ser recuperados. Ello aboga en favor de mecanimos muy potentes por parte del organismo para eliminar el exceso de potasio, propio de toda ruptura celular. Además, estos resultados clínicos niegan, lógicamente, la posibilidad de que se produzca con gran frecuencia la fibrilación y muerte.

4. Atención especial merece el hecho -muy especialmente resaltado por Jerome MODELL, Jefe del Departamento de Anestesiología de la Universidad de Florida, y con una gran casuística en recuperación de accidentados- de que la mayoría de los ahogados tragan menos de 20 ml de agua por kg de peso (1.5 litros en un adulto de 75 kg), por lo que este autor y su equipo dudan que la muerte se deba a alteraciones iónicas, achacándola, en todos los tipos de agua, a la anoxia (MODELL y MOYA, 1966; MODEL y DAVIS, 1968; MODELL, 1978).

5. Finalmente, el hecho de que el humor vítreo no presente cifras elevadas de potasio habla en favor de que su incremento en el plasma, si grande, fue breve; de lo contrario, a pesar de que la pronta recogida de las muestras hizo que el contacto plasma/humor vítreo fuera breve, habría, cuando menos, indicios de aumento.

DISCUSION

El **MAGNESIO** es un ión que participa en el metabolismo celular al activar gran número de sistemas enzimáticos, principalmente fosfatasas y enzimas que participan en reacciones cuyo elemento esencial es el ATP; sobresalen la fosfatasa alcalina, adenosintrifosfatasa, miosin-ATPasa, enolasa, creatin-kinasa, etc...(VERNON y VACKERC, 1978; LUNA, 1980. Citados por HERNANDEZ-CUETO, 1985). En condiciones normales, los niveles de calcio y magnesio se encuentran en constante equilibrio, habiéndose advertido la existencia de un antagonismo de estos en la permeabilidad de la membrana. El cociente calcio/magnesio va a indicar el estado del metabolismo celular, siendo su posibilidad diagnóstica muy similar al cociente sodio/potasio (HERNANDEZ-CUETO, 1985).

Este ión ha sido profusamente estudiado en el cadáver para comprobar su comportamiento postmortal, para el diagnóstico de la causa de la muerte, y determinación de la duración de la agonia (VILLANUEVA, 1980), para el diagnóstico diferencial entre heridas mortales y postmortales (HERNANDEZ-CUETO ,1985), etc...

Nosotros hemos obtenido los niveles más altos de Magnesio en el grupo III (tabla XVII y XVIIb), lo que está justificado claramente por la alta concentración de este ión en el agua salada empleada en nuestro trabajo. Ello justifica los hallazgos anteriores de ADJUTANTIS y COUTSELINIS, en 1975 y de COUTSELINIS y BOUKIS (1976), quienes demostraron que los altos niveles de magnesio en líquido cefalo-raquídeo y humor vítreo confirmaban el diagnóstico de sumersión en agua de mar. Niveles elevados de magnesio en agua salada fueron también previamente encontrados por SWANI y SPAFFORD en 1951, explicando el hallazgo de igual manera.

Aunque los niveles son iguales en las series I y II, la diferencia estadísticamente significativa que existe entre las sangres arterial y venosa de la serie II, manifestando la sangre arterial valores menores de magnesio que la venosa

(tabla XVIIb). Este hallazgo no podría explicarse exclusivamente por el factor dilución, pues ya hemos expuesto, para otros parámetros, que la sangre se mezcla hasta ser homogénea.

El **CALCIO** es el catión más abundante del organismo, encontrándose el 90% en el esqueleto. La calcemia normal -situada entre 9 y 11 mg%- es un factor constante en cada individuo. De esta cantidad, aproximadamente la mitad está unida a proteinas plasmáticas, encontrándose otro tanto en forma iónica y difusible. Este calcio iónico de los líquidos corporales es necesario para la coagulación sanguínea, para la normal contracción de la musculatura esquelética y cardíaca y para la función nerviosa. Interviene también en el proceso de degranulación mastocítica y en el mantenimiento de la integridad de las mucosas de los endotelios vasculares, estando en constante equilibrio con el ión anteriormente estudiado, el magnesio. Ha sido estudiado con fines médico-legales para conocer su comportamiento postmortal (VILLANUEVA, 1980).

Nuestros resultados arrojan los niveles más altos en los grupos problema y sin diferencia entre ellos, aunque son estadísticamente diferentes respecto al grupo control (tabla XVIII y XVIIIb). Son pocas las experiencias que estudian el comportamiento del ión calcio en la sumersión vital. Acaso la más importante de todas sea la referida en los trabajos de SWANN y SPAFFORD (1951), quienes encontraron una elevación en los niveles de calcio en la serie III (agua salada) y una disminución en la serie II (agua dulce); dichos autores fundamentan estos resultados en la existencia de una hemoconcentración o una hemodilución, respectivamente, sin considerar la influencia de otros posibles factores. En un trabajo realizado en nuestro propio Departamento de Medicina Legal en 1976, VILLALOBOS encontró comportamientos irregulares, con tendencia al aumento, de los valores de calcio arterial en conejos sumergidos con vida en agua dulce.

En el análisis de nuestros resultados, no podemos afirmar que el aumento de calcio en la serie II (A. dulce) provenga del contenido del fluido empleado para la sumersión experimental, dada que en ella la concentración de este ión fue mínima. Sin embargo -aunque sin valor estadístico- las concentraciones de este ión son mayores en los animales sacrificados en agua salada respecto a los de agua dulce (tabla XVIIIb). Sólo cabe interpretar este hallazgo por el hecho de que la entrada violenta de la columna de agua durante la sumersión produce una ruptura de diversos elementos estructurales con liberación de calcio al plasma. Paralelamente, el súbito desequilibrio producido en el cociente Ca/Mg, por el radical aumento del magnesio en la serie III y la diferencia arterio-venosa de la serie II, puede producir resultados que, cuando la sangre es recogida instantes después de producirse la muerte, tienen dificultad de ser explicados de acuerdo con unos mecansimos fisiopatológicos poco flexilbles.

También hemos realizado las determinaciones de los iones sodio y potasio en **HUMOR VITREO**, siguiendo las experiencias de otros autores buscando un compartimento estéril y fácilmente accesible para determinar los dos más importantes iones relacionados con la sumersión. No obstante, no hemos encontrado diferencias entre los tres grupos estudiados en lo que se refiere a los iones sodio y potasio (tabla XIX y XIXb).

Reiteramos en este apartado lo ya expuesto al analizar los resultados del potasio, el cual, pese a la lísis de hematíes, no sufre grandes incrementos plasmáticos, probablemente debido a los mecanismos que pone en marcha el organismo para evitar su exceso. También destacamos que el relativamente poco tiempo que permanece este medio en contacto con el plasma, puede provocar estos resultados.

Finalmente, en este apartado dedicado al análisis

del resultado de los iones, nos permitimos señalar que siguiendo trabajo recientemente publicado (ABDALLAH et al, 1985), hemos intentado realizar la determinación de **ESTRONCIO** en plasma en nuestras muestras. Hemos comprobado que con la técnica a nuestra disposición (Espectrofotometría de Absorción Atómica), y pese a seguir las condiciones expuestas por los autores mencionados, no nos ha sido posible determinar las concentraciones de estroncio al ser sus niveles normales extremadamente bajos (0.03 ug/ml), superando la capacidad analítica de la técnica empleada. En el reciente XIV Congreso Internacional de Medicina Legal y Medicina Social, celebrado en Lieja el pasado mes de Septiembre de 1988, PIETTE et al presentaron una comunicación en la que se manifestaban en el sentido de que, al ser los valores normales en suero tan bajos, los resultados obtenidos no son muy fiables, aunque la detección de cantidades de estroncio en suero superiores a las normales hablarían en favor de una sumersión vital en agua salada.

Como se puede deducir de todo lo expuesto en este apartdo, la detección de electrolitos -en general- tampoco es la panacea a que aspira el patólogo forense que ha de enfrentarse con casos reales, y las razones son varias.

En primer lugar, cada vez hay un acuerdo más generalizado de que los cambios iónicos -hidroelectrolíticos en general- no son muy grandes en víctimas humanas. Como señalan CAMPS et al (1976) en un texto de gran prestigio en el mundo anglosajón, el paso de la columna de agua a los alveolos produce su colapso, al igual que el de los pequeños vasos que portan la sangre; se produce un *shunt* que impide el intercambio gaseoso y, simultáneamente, el hidroelectrolítico.

En segundo lugar, la gran variabilidad que presentan las muertes por sumersión hace que en la práctica no existan unos patrones típicos de comportamiento de estos elementos, por lo que su aplicación sistemática puede no rendir los resultados apetecidos.

En tercer lugar, hemos de considerar el hecho ya mencionado, de que en la mayoría de las sumersiones no pasan más de 20 ml/kg peso de agua al pulmón, lo que origina cambios iónicos pequeños, o, cuando menos, no tan pronunciados como podrían teóricamente imaginarse (ver las referncias de MODELL et al en la sección del Potasio).

Finalmente y en cuarto lugar, la instauración de fenómenos putrefactivos hace variar las concentaciones de estos elementos, bien aumentándolos, bien disminuyéndolos, em impide que los valores encontrados tras el preceptivo análisis puedan ser base fiable para un correcto diagnóstico.

Todo este conjunto de circunstancias desfavorables hace que en la mayoría de los textos de Medicina Legal y Forense no se aconsejen técnicas de determinación de iones como medio para establecer el diagnóstico de sumersión, aún reconociéndose que hay casos en que el empleo combinade de ciertos iones puede facilitar dicho diagnóstico.

Nosotros debemos mencionar que en nuestras condiciones artificiales e ideales, y al igual que ocurrión con los marcadores hematológicos, con el conocimiento de los valores de ciertos iones hubiésemos podido establecer el diagnóstico de sumersión vital y, posteriormente, el diferencial entre sumersión en agua dulce y sumersión en agua salada.

ADDENDUM:

Las concentraciones de los principales iones fueron, en el *agua salada* utilizada por nostros, las siguientes:

Na:	931 mg%	**Cl:**	1470 mg%
K:	188 mg%	**Mg:**	837 mg%

6.1.4. FOSFOLIPIDOS DEL SURFACTANTE

El análisis de los resultados del estudio de los componentes del surfactante pulmonar en la sumersión plantea unas especiales dificultades.

En primer lugar, por la ausencia de experiencias previas en la bibliografía mundial sobre el tema. En segundo lugar, por la propia complejidad de los componentes, ya que algunos de ellos han podido ser estudiados en este trabajo bien sólo en el lavado pulmonar (Fosfatidil-Glicerol [PG]), bien sólo en el tejido pulmonar (Fosfatidil-Serina [PS], Fosfatidil-Inositol [PI] y Esfingomielina [S]), y por fin otros, en ambos tipos de muestra (Fosfatidil-Colina [PC] y Fosfatidil-Etanolamina [PE]). Esta distribución queda justificada por una larga y minuciosa puesta a punto de la técnica empleada, en la que fueron analizadas las diferentes zonas del pulmón -para comprobar posibles diferencias porcentuales en su composición- y los diversos métodos de extracción y cuantificación. Los fosfolípidos escogidos han sido los que se han mostrado más significativos cuali y cuantitativamente en cada una de las muestras finalmente seleccionadas.

Pese a la diversidad de trabajos realizados, incluso hoy en día no se conoce claramente la significación fisiológica y fisiopatológica de estos componentes, ni las modificaciones que se producen en sus cadenas biosintéticas a consecuencia de la acción de las más diversas noxas. Por ello, nos tendremos que limitar la mayoría de las ocasiones a una simple relación de resultados, limitando cuidadosamente lo que es la discusión de los mismos que, cuando sea posible hacerla, la llevaremos a cabo con suma prudencia.

DISCUSION

Antes de comenzar a analizar de modo puntual cada uno de los diferentes fosfolípidos, consideramos procedente recordar dos datos necesarios para la correcta valoración e interpretación de los razonamientos posteriores.

En primer lugar, hay que recordar que el proceso de obtención del lavado endobronquial -pese a ser metodológicamente idéntico en todas las series- debe de ser valorado ponderadamente. Los lavados de los pulmones de la serie control se efectuaban sobre órganos intactos de animales ya sacrificados, con todo su contenido fosfolipídico. Por el contrario, la extracción efectuada en las series problema estaba ya alterada por los cambios que les produjo el líquido de sumersión -que no es otro que un lavado "in vivo"-, efecto este que es el que nosotros pretendemos objetivar en el presente trabajo.

En segundo lugar, conviene recordar que las unidades en que se expresan los resultados del estudio de los fosfolípidos son tantos por ciento respecto a un total que lo conforman todos los fosfolípidos de la muestra. Por lo tanto, el aumento o disminución de los valores de un determinado fosfolípido no significa obligatoriamente que haya una disminución en términos absolutos, sino que puede deberse simplemente a un aumento o disminución paralelo de otro fosfolípido, bien de los que han sido determinados por nosotros, bien de los que no lo fueron.

La expresión porcentual de la composición fosfolipídica pulmonar es la universalmente utilizada excepto en trabajos muy específicos. La principal razón (VAN GOLDE, 1976) es que la gran diversidad de fosfolípidos obliga a tomar como referencia el contenido total, lo que facilita enormemente el análisis de los resultados.

Pero más concretamente en nuestro caso, el análisis en cifras absolutas estaría en gran parte sesgado por la

presencia del factor -inevitable en nuestro planteamiento- *lavado pulmonar*. Efectivamente, expresar los datos en cifras absolutas exige una minuciosa técnica que garantice que siempre se parte de una cantidad exactamente igual de tejido pulmonar. Ello es posible de conseguir en pulmones intactos, que no han sido lavados ni han sido sometidos a un proceso de sumersión vital. De no ser así, el tejido pulmonar va a tener una cantidad, muy variable, de agua en su interior, por lo que el hecho de pesar una determinada cantidad -por ejemplo, 1 gr- no nos asegura que ese gramo sea todo tejido pulmonar; en unas ocasiones, puede que un 10% sea agua, pero en otras, ésta puede ser el 20, 30 ó 40% del total del peso. Este hecho no puede ser obviado de ningún modo, y, a lo más que se puede llegar -como ya se explicó en el capítulo de Material y Método-, es a calcular teóricamente el peso en vivo del pulmón (una vez conocido el peso del animal) y a suponer que todo el incremento de peso se debe al agua, la cual se supone distribuida uniformemente por todo el pulmón.

Razonamientos similares se pueden hacer en el caso de que el material empleado sea lavado endobronquial.

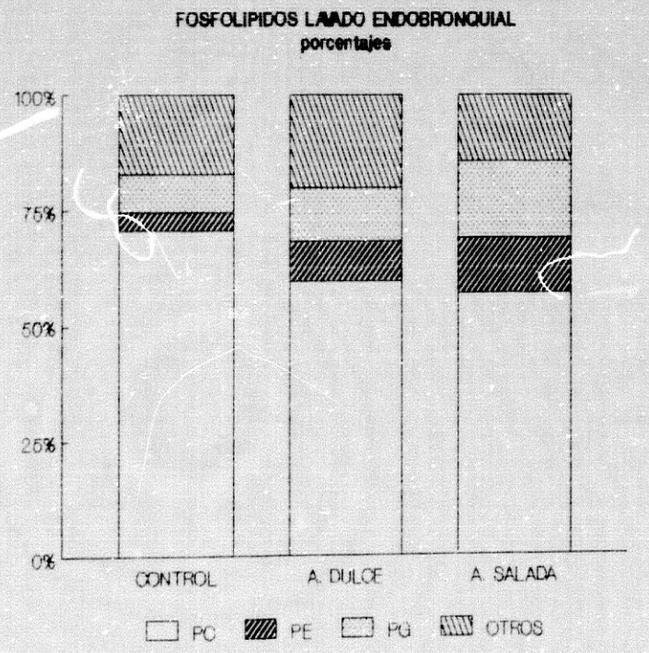
Todo este complejo proceso se ve aún más dificultado en la práctica forense, objetivo hacia el cual se dirigen nuestros trabajos. En ella, la gran variabilidad de situaciones posibles y ya comentadas dista mucho de la homogeneidad conseguida con una muestra experimental como la empleada en este estudio.

Se impone el empleo, ampliamente sancionado por los estudiosos del surfactante, de analizar los datos desde el prisma de las proporciones, de la cantidad de un determinado fosfolípido respecto del total, al ser un parámetro independiente del peso, y, por tanto, más fiable.

DISCUSION

La **Fosfatidil-Colina (PC)** es el mayor componente del surfactante pulmonar. Hay que recordar que en nuestra serie control este fosfolípido supone el 70% del total en el lavado endobronquial y el 43.6% en tejido pulmonar tras lavado (tablas XX y XXI).

Las concentraciones encontradas en *lavado endobronquial* son mayores en la serie I (control) y menores en la serie III (agua salada), con diferencias estadísticamente significativas entre todas ellas (tabla XX y XXb, $p<0.001$). El hecho de encontrar los mayores niveles en la serie control demuestra dos cosas: la primera, que en las condiciones experimentales se produce un lavado eficaz de la fosfatidil-colina que recubre los alveolos. La segunda, que en las series problema durante el proceso de sumersión, y más concretamente dede que el animal expulsa por primera vez el hongo de espuma, se producen una serie de profundas inspiraciones y expiraciones que hacen que penetre agua profundamente en el pulmón, arrastrando gran cantidad de fosfolípidos.



Como queda representado en la figura anterior, cuando nosotros tenemos acceso a estudiar el lavado endobronquial, un cierto porcentaje de la fosfatidil-colina ya ha desaparecido. Paralelamente y, al igual que pasan agua y electrolitos a la circulación, parte de la Fosfatidil-Colina y de otros fosfolípidos pueden pasar -solubilizados o emulsionados- del pulmón a la sangre, contribuyendo a que los niveles en las series problema sean más bajos.

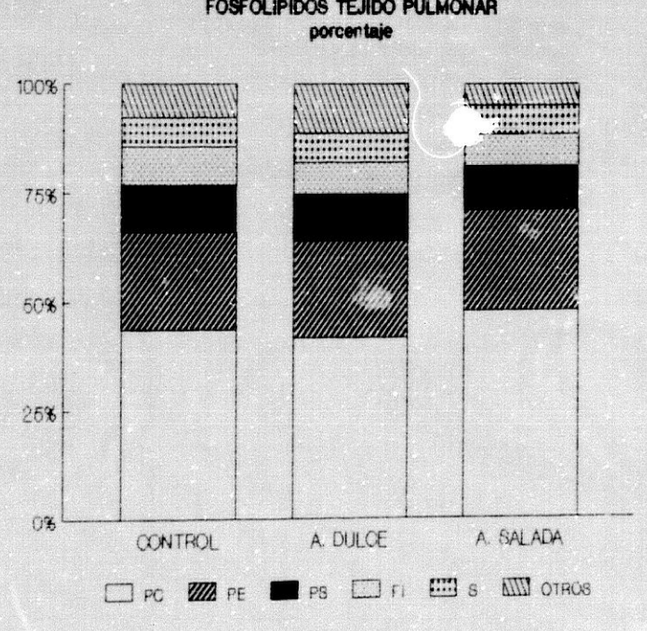
Los niveles de Fosfatidil-Colina en el *tejido pulmonar* muestran diferencias significativas (tabla XXI y XXIb) para la serie III. Sin embargo, los resultados son bastante similares, por lo que su valoración debe de ser cuidadosa. Debemos de tener presente que la cantidad de fosfolípidos en el tejido pulmonar es mucho mayor que la obtenida en lavados endobronquiales, por lo que debemos admitir que una pérdida como la que supone el lavado que efectúa la sumersión vital puede no tener repercusiones cuantitativas en el tejido pulmonar.

Conviene tener en cuenta que, durante el proceso de puesta a punto, pudimos comprobar que el hecho de lavar los pulmones con los diferentes tipos de solución empleados en nuestro trabajo (agua dulce, agua salada y solución salina), no provoca cambios en las cifras absolutas ni relativas de los fosfolípidos del lavado endobronquial ni del lavado pulmonar. Quiere esto decir que ninguno de los fluidos tiene capacidad *per se* y en unas mismas condiciones de extraer mayor o menor cantidad de fosfolípidos que otro, por lo que el mecanismo que interviene no debe de ser la solubilidad. Por lo tanto, las variaciones deben de ser achacadas -en el caso de las series problema- a los diferentes tipos de reacción vital ante la sumersión.

La serie I representa valores similares a la II. Pese a que los valores obtenidos en el lavado endobronquial hacen sospechar que se ha perdido una mayor cantidad de PC en la serie II y que, por lo tanto, el pulmón debería de presentar menores cantidades, debemos de tener presente que la cantidad de PC

existente en el pulmón es mucho mayor a la de los lavados endobronquiales, por lo que un lavado -por enérgico que pueda ser- pudiere no hacer descender de modo significativo las reservas tisulares totales. Por el contrario, la serie III ofrece resultados distintos: según los datos obtenidos del lavado, se ha perdido más PC que en la serie II, pero el tejido pulmonar tiene mayores valores, como si tal pérdida no hubiese acontecido. Ello indica que el patrón de distribución de la fosfatidil-colina en la sumersión en agua dulce y salada es distinta, pero sin que se pueda cuantificar el fenómeno, ya que el tipo de cálculo que se hace -distribución porcentual de los distintos componentes- lo invalida, pues una misma cantidad en cifras absolutas puede representar un porcentaje diferente sobre un total, dependiendo de la presencia en mayor o menor grado de los otros fosfolípidos.

Aunque es posible dar cifras absolutas, los errores hubieran sido mayores, y la información menor, puesto que lo interesante es conocer el *patrón de distribución* de los diversos fosfolípidos, pues es el estudio de su conjunto el que nos puede ofrecer diferencias lo suficientemente consistentes como para proponer su aplicación en la práctica forense.



Sin embargo, la validez de los datos obtenido por el sistema proporcional es, para nosotros, totalmente satisfactoria, al encajar con nuestra hipótesis de partida: la sumersión vital puede hacer variar las proporciones existentes entre los diversos fosfolípidos del lavado endobronquial o pulmonar y del propio tejido pulmonar, pudiendo servir estas variaciones como parámetro indicador de la vitalidad de la sumersión y, paralelamente, de la tonicidad del líquido.

El analizar los datos en cifras absolutas, aparte de la poca fiabilidad que, como hemos recientemente expuesto, nos ofrece, obligaría a estudiar este tema desde un aspecto puramente bioquímico y biofísico, perspectivas ambas que escapan de nuestros intereses, al ser el presente un trabajo inicial y de aproximación al tema que busca unos resultados objetivables y evidentes que puedan ser aplicados a la práctica de la Medicina Legal.

La relación existente entre las cifras porcentuales de PC del tejido pulmonar y del lavado endobronquial (PC lavado/PC tejido) varían de modo significativo en la serie III respecto de la I y II, que son similares. Dicho cociente es de 1.622 en la serie I, 1.584 en la serie II y 1.197 en la serie III (tabla XXX). Pese a que hemos citado diferencias significativas entre las tres series en lo referente a PC en el lavado pulmonar, la no existencia de grandes diferencias a nivel tisular, aunque hay un aumento significativo de la PC en la serie III, hacen que estos cocientes se igualen en las series I y II. En la serie III, el aumento de la proporción de PC en el tejido pulmonar unido a la gran disminución de los valores de éste en el lavado hacen que su cociente disminuya de modo significativo sobre los demás.

Resulta parcialmente incoherente este comportamiento de la serie III si utilizamos el razonamiento de que la menor cantidad de PC en el lavado endobronquial se debe a que se ha perdido durante la sumersión vital, por lo que debería

haber menor cantidad en el pulmón. La serie II se comporta de modo más coherente, siempre comparando con la serie I o control: disminuyen sus valores (aunque de modo no significativo) en tejido pulmonar, y lo hacen paralela y significativamente en el lavado endobronquial, por lo que se podría argumentar que la sumersión vital en agua dulce produce un lavado y pérdida de este fosfolípido, lo que se manifiesta por una disminución -sin evidencia estadística- de los niveles tisulares, y por una disminución significativa de la PC recuperada por lavados endobronquiales.

No existen estudios -según nuestras referencias- en que se haya analizado la composición fosfolipídica del surfactante tras sumersión vital ni tras procesos *hiperagudos* como puede ser pasar de la normalidad a la muerte por inundación alveolar en tres minutos. Existen trabajos en ambos sentidos, pero desde diferentes perspectivas y con distintos modelos y fines.

GIAMMONA y MODELL (1967) diseñaron un amplio trabajo en que ahogaron perros con cuatro distintos tipos de agua: destilada, destilada con cloro, suero salino isotónico y agua salada. El objetivo fue -aparte de obtener una serie de datos métrico-ponderales que ya hemos comentado- determinar la tensión superficial del surfactante tras sufrir uno de los cuatro diferentes insultos, consiguiendo demostrar que es el agua dulce (agua destilada con o sin cloro) la que más capacidad nociva tiene, ya que disminuye el índice de tensión superficial desde las 1.45 unidades normales hasta 1 (agua sin cloro) o hasta 0.89 (agua clorada), tanto en los extractos pulmonares como en el fluido traqueal. Estos hallazgos concuerdan -en el sentir de los autores- con la tesis de que *el edema pulmonar consecuente a la aspiración de agua dulce puede deberse a un cambio físico o químico del surfactante pulmonar, así como a una sobrecarga circulatoria*. Los mecanismos exactos de producción son

desconocidos, aunque BONDURANT y CLEMENTS (1962) demsotraron *in vitro* que el agua destilada inactiva al surfactante pulmonar. SCARPELLI et al (1965) demostrraron en sus estudios que una mínima concentración de NaCl (0.15 - 0.20 N) es esencial para mantener la tensión superficial, lo que atribuyen a una interacción del agua dulce con la subfase iónica de la película de surfactante, perdiendo éste su principal característica y función: la capacidad anticolapsante.

Lo más plausible es que, tal y como intuyeron los autores mencionados, la alteración de la función pulmonar se debe a una desestructuración del surfactante en la esfera biofísica, sin que dé tiempo al desarrollo de cambios bioquímicos (GIAMMONA y MODELL, 1967; MORGAN y EDMUNDS, 1967).

En este sentido, múltiples trabajos en los que se ha provocado Edema Agudo Pulmonar (E.A.P.) haciendo respirar a los animales atmósferas con gran contenido en oxígeno o provocándoles una oclusión arterial, han conseguido demostrar, desde el punto de vista bioquímico, que las alteraciones de los fosfolípidos sólo aparecen en las áreas hemorrágicas y claramente pstológicas a la simple observación visual. Las alteraciones fosfolipídicas -pese a ser procesos que se desarrollan en 4 ó 5 días, dando tiempo a que se alteren algunos fosfolípidos y a que aparezcan vías alternativas de síntesis- son mínimas: leve disminución ($p<0.1$) del palmitato y aumento del estearato asociados a la fosfatidil-colina, disminución de la cantidad de fosfatidil-colina, fosfatidil-etanolamina y, lógicamente, de la estabilidad alveolar. Estas observaciones, en explicación de sus propios autores, son inespecíficas, siendo lo más destacable su *focalidad*: las partes del tejido pulmonar que, ya a la simple observación, no muestran focos hemorrágicos, tampoco van a dar diferencias significativas en su composición fosfolipídica. Por lo tanto, no hay una alteración generalizada de las fuerzas alveolares en los modelos experimentales descritos.

DISCUSION

En los grandes textos de Medicina Legal, se acepta que el agua dulce produce una grave alteración del surfactante, que secundariamente ocasiona un E.A.P., el cual se ve agravado si la hemodilución tiende a provocar exudación al espacio alveolar (DÉROBERT, 1974; CAMPS et al, 1976; CURRAN et al, 1980). Por su lado, al agua salada se le achaca una menor capacidad de destrucción del surfactante, pero una mayor capacidad de provocar E.A.P., habida cuenta la capacidad de extraer plasma del torrente circulatorio que posee el agua hipertónica.

Estas descripciones coinciden con los trabajos experimentales antes mencionados, aunque tratar de diferenciar claramente ambos procesos, que evolucionan hacia el exitus -en nuestro caso- en tres minutos, puede resultar arriesgado.

Asumiendo nuestros resultados, el agua salada puede haber provocado un más grave E.A.P.; por ello, el lavado vital ha producido una mayor extracción de PC, y, cuando nosotros hacemos el lavado, aparecen menos cantidades de ésta. Puede ser que la PC extraída mantuviera su capacidad anticolapsante y una alta tensión superficial, pero ha sido lavada tras ser arrancada de la áred alveolar por el edema pulmonar. El E.A.P. provocado por el agua dulce fue capaz de desestructurar también al surfactante -y concretamente a su principal componente, la PC-, aunque quizás la menor intensidad del E.A.P. (extremo éste que nosotros no hemos podido cuantificar) hace que el lavado vital extraiga menos cantidad de PC, por lo que en el lavado postmortal nosostros tenemos capacidad de extraer una mayor cantidad. Según las apreciaciones de múltiples autores, la PC extraída puede tener menos capacidad anticolapsante, aunque es un parámetro que, en este trabajo, no hemos analizado.

La Fosfatidil-Etanolamina (PE), el segundo componente más importante -cuantitativamente hablando- del

surfactante pulmonar, presenta, por contra, un comportamiento totalmente diferente.

En el *lavado endobronquial* ofrece unos valores superiores en la serie III (agua salada), siendo los mínimos los de la serie I (control) (tabla XXII y XXIIb). Este hecho puede explicarse por diferentes mecanismos. En primer lugar, consideramos que estos cambios pueden deberse a un artefacto producido por la disminución de los niveles de fosfatidil-colina, que hace que aumenten, proporcionalmente, los porcentajes de fosfatidil-etanolamina. Así, en la serie II, donde la fosfatidil-colina baja desde el 70.73% de la serie control hasta un 65.88%, la fosfatidil-etanolamina aumenta de un 3.91 a un 9.19% ; en la serie III, la fosfatidil-colina baja al 57.34%, subiendo la etanolamina a un 11.67%.

El otro mecanismo que podría explicar este resultado se basa en que exista un aumento de la cantidad absoluta de PE en los lavados de las series II y III, lo que hablaría en favor de una menor capacidad de extracción del lavado clásico (serie I, sobre pulmones de animales ya fallecidos), mientras que en las series II y III el aumento debería ser explicado argumentando una mayor capacidad de movilización de la PE por parte del proceso de sumersión vital -en el que el Edema Agudo Pulmonar puede ser un factor determinante- aunque no es capaz de movilizarlo inicialmente de tal manera que se expulse durante las respiraciones agónicas.

En nuestras condiciones, en la serie control la relación PC/PE es de 18.1, que disminuye a 7.16 en la serie II y lo hace aún más, hasta 4.9, en la serie III (tabla XXX). Estas variaciones se deben tanto a un aumento proporcional de la PE como a una disminución de la PC, tal y como aparece en la tabla siguiente:

TABLA RESUMEN
FOSFOLIPIDOS LAVADO ENDOBRONQUIAL

FOSFOLIPIDO	PC	PE	PG			
COCIENTE				PC/PE	PC/PG	PG/PE
SERIE						
I	70.7	3.91	8.22	18.1	8.6	18.1
II	65.9	9.19	13.00	7.2	5.1	1.4
III	57.3	11.67	16.80	4.9	3.4	1.4

Los niveles de Fosfatidil-Etanolamina en tejido pulmonar aparecen similares en las tres series, sin diferencias significativas entre ellas (tablas XXIII y XXIII). Este hecho no es de extrañar, porque la cantidad de este fosfolípido es muy grande en el tejido pulmonar en comparación con los lavados, hasta el extremo de que -al igual que argumentamos con la PC- por mucha cantidad que se pierda durante las respiraciones desesperadas en el proceso de sumersión, en el momento de hacer los cálculos finales no son significativos.

El cociente existente entre los porcentajes de PE tejido/PE lavado en las diversas series, ilustra parcialmente el proceso ocurrido. En la serie I es de 5.72, en la II, de 2.46 y en la III, 2.01, todas estadísticamente diferentes entre sí (tabla XXX). Comparando con la serie control, la disminución del cociente en las series problema, toda vez que las cantidades del numerador -PE tisular- son similares, se debe a un aumento significativo de la PE del lavado endobronquial.

Los resultados del Fosfatidil-Glicerol muestran valores y cambios similares a los de la Fosfatidil-Etanolamina en lavado endobronquial (tabla XXIV). Su determinación no se realizó en tejido pulmonar ya que, habida cuenta la pequeña proporción

que representa en el tejido pulmonar [1.7% según ROONEY (1985) y 1.2% en nuestros estudios de puesta a punto], los resultados que de sus variaciones pudieramos obtener no hubieran ofrecido fiabilidad estadística.

Hacemos extensivos los comentarios efectuados al analizar la Fosfatidil-Etanolamina en lavado endobronquial, resaltando nuevamente el hecho de que su aumento porcentual es paralelo a la disminución de Fosfatidil-Colina.

Este paralelismo Fosfatidil-Glicerol - Fosfatidil-Etanolamina, queda claramente reflejado en la tabla XXX, donde los cocientes establecidos entre estos dos fosfolípidos y la Fosfatidil-Colina, que es el principal fosfolípido, son similares. Así, el cociente PC/PE es mayor en la serie I y menor en la serie III, con diferencias estadísticas entre las tres (tabla XXX). El cociente PC/PG da los mismos resultados.

Sin embargo, el cociente PG/PE es mayor en la serie I que en la II y III, que son iguales (tabla XXX). El análisis detenido de los resultados nos muestra que, efectivamente, tanto la PE como la PG aumentan en relación a la PC, que disminuye (tablas XX, XXII y XXIV). La diferencia del cociente mencionado entre la serie control y las problema, pone de manifiesto que la PE aumenta, en relación a sus valores control, más que la PG; este aumento mayor es similar en ambas series problema, lo que iguala los cocientes (tabla XXX). Sobre los valores de la serie control, la PE aumenta un 235% sus valores en el agua dulce, y un 298% en el agua salada. Por su parte y con los mismos presupuestos, ala PG aumenta un 145% en agua dulce y un 204% en agua salada.

Todo ello significa que además de existir un aumento respecto al conjunto de los fosfolípidos del lavado pulmonar y de tener un comportamiento homogéneo, analizando la interrelación entre ellas obtenemos que la PE aumenta proporcionalmente más que el PG, y ello puede deberse a que el PG

sea más fácilmente arrastrado en las sumersiones vitales que la PE, siempre comparándose con las de la serie control, donde el lavado postmortal muestra menor capacidad de extraer estos fosfolípidos.

El resto de los fosfolípidos estudiados corresponden al tejido pulmonar y suponen las fracciones menos abundantes, de las que ya suponíamos no ibamos a obtener resultados definitivos, pero que se realizaron por ser metodológicamente accesibles y por ser este el estudio inicial de abordaje al tema. En el caso de estos fosfolípidos (Fosfatidil-Serina, Fosfatidil-Inositol, Esfingomielina),no hemos podido hacer determinaciones en el líquido endobronquial por haber obtenido en la puesta a punto trazas sin valor significativo. La **Fosfatidil-Serina** (tabla XXV y XXVb) y la **Esfingomielina** (tabla XXVI y XXVIb) no muestran ningún comportamiento diferente en lo que a los tres grupos estudiados se refiere, lo que no puede llevarnos a afirmar que relmente no sufren la acción de la sumersión, sino que se debe tratarse de un problema exclusivamente cuantitativo. Por esa misma razón, debemos interpretar con suma cautela el resultado obtenido con el **Fosfatidil-Inositol**, donde hemos encontrado los niveles más altos en el grupo control (tabla XXVII y XXVIIb)), lo que podría interpretarse como el resultado de la acción de la sumersión, es decir, la sumersión produce una disminución de los niveles de este fosfolípido a nivel pulmonar, al ser arrastrado por el líquido de sumersión, que, reiterándolo una vez más, produce un enérgico lavado endobronquial vital.

Se ha confirmado nuestra hipótesis de partida, según la cual, el lavado endobronquial que supone una sumersión vital hace cambiar las proporciones de los diversos fosfolípidos en el momento de ser estudiados en el cadáver, bien en lavado endobronquial, bien en tejido pulmonar. Para su aplicación a la Medicina Legal y Forense, son estos unos datos totalmente válidos y altamente positivos. En un primer trabajo de aproximación al tema, independientemente de la complejidad implícita que ello

conlleva, los resultados son totalmente satisfactorios. Una rápida visión de los resultados, representados en su totalidad gráficamente en figuras expuestas páginas inmediatamente anteriores, muestran diferencias claramente significativas, lo que nos hace pensar en el posible desarrollo de nuevos estudios que, basados en este, puedan analizar desde una más profunda perspectiva biofísica y bioquímica los resultados aquí referidos.

En el lavado endobronquial de animales muertos por sumersión vital aparece, independientemente de la tonicidad del agua, una disminución de los niveles porcentuales de Fosfatidil-Etanolamina y un aumento paralelo de los de Fosfatidil-Etanolamina y Fosfatidil-Glicerol, existiendo diferencias significativas entre las tres series (tabla XXX) tanto en términos absolutos de porcentaje como en los cocientes PC/PE y PC/PG, pudiendo diferenciarse con ello una sumersión vital de una postmortal y posteriormente una en agua dulce de otra en agua salada.

La valoración de los resultados obtenidos en tejido pulmonar debe de ser más cautelosa, aunque a la vista de las cifras obtenidas los niveles de Fosfatidil-Colina son ligeramente superiores en la serie III y menores en la serie II, y las de Fosfatidil-Inositol superiores en la serie control a las dos series problema, que arrojan valores similares.

6.1.5. PEPTIDO NATRIURETICO AURICULAR

Procede en primer lugar recordar que en la determinación de este parámetro se ha utilizado una cuarta serie (Serie IV o de Inmersión) con la que se ha pretendido descartar los efectos que la inmersión -con cabeza fuera del agua- y el stress pudieren tener sobre los niveles de ANP, tal y como queda recogido en el capítulo de Material y Método.

Cualquier parámetro que se pretenda aplicar al campo de la Tanatoquimia debe de cumplir un requisito básico: tener estabilidad postmortal. Por ello, antes de enfrentarnos con una aplicación práctica de esta hormona -totalmente nueva en el campo médico-legal-, nos vimos obligados a realizar un trabajo previo para comprobar su estabilidad postmortal, tanto en plasma arterial como en tejido auricular. Los resultados obtenidos en esta experiencia dieron lugar a una comunicación al XIV Congreso Internacional de Medicina Legal y Medicina Social, celebrado en Lieja en Septiembre de 1988 (LORENTE, HERNANDEZ-CUETO y VILLANUEVA, 1988). Del análisis de los resultados se desprende que en plasma arterial de rata, el ANP tiene una estabilidad hasta las 8 horas, tiempo en el que, por imposiciones del modelo experimental, se hizo la última determinación. En tejido auricular existe una estabilidad similar hasta las 8 horas, decreciendo lentamente los niveles a las 12, 16, 24 y 32 horas, momento de la última determinación. Estos resultados nos permiten aplicar el ANP al campo de la tanatoquimia con garantías de que, al menos en los períodos de tiempo estudiados, encontraremos los niveles suficientes como para realizar determinaciones válidas.

Los resultados obtenidos en la determinación del ANP plasmático son realmente excepcionales, pues ambas series problema (sumersión en agua dulce -II- y sumersión en agua salada -III-) arrojan cifras superiores a las series control (I y IV).

Con estos datos, se puede afirmar que el marcador aquí propuesto es útil para realizar el diagnóstico diferencial entre sumersión vital y sumersión postmortal. Pero el análisis de los valores ofrece aún más datos favorables, tal y como puede observarse en la tabla XXVIII. Así, los niveles de ANP de la serie II (agua dulce) son significativamente superiores a los de todas las demás series (tabla XXVIIIb). Los de la serie III (agua salada) son significativamente superiores a los de la series control I y IV (tabla XXVIIIb), y los de las series control I (muerte por sobredosis barbitúrica) y serie IV (inmersión) son similares, sin que existan diferencias estadísticamente significativas (tabla XXVIIIb). De acuerdo con estos reaultados, el estudio de los niveles de ANP plasmático serviría para diferenciar entre sumersión vital en agua dulce y en agua salada, al ser los valores alcanzados en estas significativamewnte diferentes.

Las modificaciones acaecidas a este marcador corresponden a nuestra hipótesis de partida, pero la valoración de los resultados se encuentra -al igual que los fosfolípidos del surfactante- con el problema de la inexistencia de una bibliografía previa a nivel mundial, por lo que no pueden ser debidamente contrastadas.

En el momento de elaborar la hipótesis de partida, conocíamos que los incrementos de ANP se deben a múltiples causas, unas fisiológicas y otras patológicas, pero todas con una vía final común: la dilatación de las paredes de las aurículas, y especialmente de la aurícula derecha.

Según los modelos fisiopatológico aceptados, en la sumersión penetra agua al sistema circulatorio, unas veces sola y en mayor cantidad (sumersión vital en agua dulce), y otras en menor cantidad y acompañada por electrolitos (sumersión en agua salada). Por lo tanto, el aumento de volumen circulante debe de conducir a una distensión de las paredes auriculares y liberación de ANP; así está comprobado en diversos trabajos experimentales, donde aumentos del volumen circulante por inyección intravenosa

de sueros de diversa tonicidad elevan los niveles de ANP plasmático (LANG et al, 1985; HIRTH et al, 1986; KATO et al, 1986; BLIZARD et al, 1987). También la inmersión en agua dulce, que es un conocido mecansimo de incremento del volumen circulante, aumenta significativamente los niveles de ANP (MIKI et al, 1986; OGIHARA et al, 1986; PENDERGAST et al, 1987). Finalmente, es interesante conocer que la sobrecarga con sodio,ión este tan relacionado con el equilibrio hídrico del organismo, y aún sin aumento inicial paralelo del volumen circulante, es capaz de liberar ANP de las aurículas con posterior incremento en plasma (ARJAAMA y VUOLTEENAHO, 1985; KATO et al, 1986).

El mayor incremento de los niveles de ANP en la serie II (sumersión vital en agua dulce) en comparación con la serie III (sumersión vital en agua salada) se explica por el mayor aumento de la volemia que el agua dulce produce, provocando una mayor y más brusca distensión de las paredes auriculares, que liberan gran cantidad del polipéptido en cuestión. En la serie III, el agua salada hizo que se incrementaran los niveles plasmáticos de sodio, factor este que puede también influir en la liberación de ANP, independientemente de que exista una mayor o menor hipervolemia. Sin embargo, como señalan KATO et al (1986), los incrementos de sodio en plasma se siguen automáticamente de incrementos de agua, que en los fluidos orgánicos acompaña indefectiblemente a este ión, por lo que los resultados deben de ser manejados con prudencia.

Nuestros resultados no dan diferencias estadísticamente significativas en los niveles auriculares de ANP, ni en la aurícula derecha ni en la izquierda (tabla XXIX y XXIXb). Este hecho puede quedar plenamente justificado si tenemos en cuenta que la cantidad de esta hormona almacenada en ambas aurículas es mucho mayor a la existente circulando en el plasma, por muy aumentada que esté; aunque la vida media del ANP sea muy corta -de 1 a 3 minutos- (GNÄNINGER et al, 1986; YANDLE et al, 1986) y su secreción sea contínuada y elevada en casos de

distensión auricular, el reservorio existente en el tejido auricular supera ampliamente las necesidades del momento. En este sentido, es necesaria la instauración de fenómenos crónicos para disminuir estos almacenes auriculares (McKENZIE , 1986), puesto que procesos de corta duración no tienen capacidad de hacerlo (PETTERSON et al, 1986).

A pesar de la falta de significación de las cifras obtenidas en las aurículas, queremos poner de manifiesto que el cociente ANP aurícula derecha/ANP aurícula izquierda es diferente de la serie control (3.13) a la serie de agua dulce (2.51) o de agua salada (3.11). Observando estos datos, consideramos que la realización de experiencias similares en series de mayor número de animales podría arrojar diferencias estadísticamente significativas.

Conociendo la influencia de la inmersión y del stress en el ANP, ya que ambas son capaces de elevar los niveles de este péptido en plasma, nos propusimos descartar la influencia de ambos procesos en nuestros animales problema. Pese a que todos los datos bibliográficos previos abogaban en contra de que un stress (BLIZARD y MORRIS, 1987) y unas inmersiones de corta duración (OGIHARA et al, 1986; PENDERGAST et al, 1987) pudieran aumentar los niveles plasmáticos de ANP de modo significativo, realizamos una cuarta serie con el único objetivo de descartar que la elevación del ANP en las series problema se debiera a la inmersión o al stress y no al paso de agua a la circulación. Para ello los animales fuerosn sometidos a inmersión y stress en las mismas condicones que los sumergidos, no experimentando variaciones respecto a la serie control, por lo que -al menos en nuestras condiciones experimentales- el incremento de ANP plasmático se debió a un paso de agua a la circulación, fenómeno propio de la sumersión vital.

Nos hallamos, pues, ante un marcador nuevo para la Medicina Legal y de enorme utilidad si la extrapolación de los datos experimentales es confirmada en casos prácticos con

víctimas humanas, ya que es capaz de diferenciar entre sumersiones vitales y postmortales y, dentro de estas, entre sumersiones en agua dulce y agua salada.

Pese a que es en la próxima página donde se estudian las correlaciones, consideramos procedente analizar aquí la obtenida entre los niveles plasmáticos de ANP y el tiempo que tarda el animal en morir.

Efectivamente, al correlacionar ambos parámetros obtenemos una r=0.836 en los animales muertos en agua salada, y una r=0.721 en la serie de sumersión en agua dulce. Estos datos vienen a ser la rigurosa comprobación matemática de nuestra hipótesis de partida de que la liberación de ANP se produce en la sumersión por un aumento del volumen y/o de los niveles de Sodio, manteniéndose mientras dure el estímulo; en buena lógica, cuanto más tiempo dure el estímulo -la agonía-, mayores niveles plasmáticos habrá.

ESTUDIO DE LAS CORRELACIONES

Cualquier investigación que se aborde desde una perspectiva científica debe, necesariamente, incluir un estudio de correlaciones. No es simplemente un tributo a la moda, ni tampoco a la magia de las matemáticas; es un instrumento que pone de manifiesto un fenómeno que luego debe interpretarse.

En nuestro caso hemos realizado un cruce *todo contra todo*, obteniendo unas 2700 diferentes correlaciones, ante las que había que tomar las siguientes decisiones:

*1. **Nivel de Corte***: En biología y en un estudio de las características del presente, podríamos haber aceptado como significativas o, al menos con indicios de significación, correlaciones con coeficientes de 0.4. Con este nivel de corte se obtenían casi 1000 diferentes correlaciones significativas. Ello supondría el realizar un análisis de las mismas, explicando los hallazgos obtenidos, lo que queda casi fuera de nuestros fines. Con un nivel de corte de 0.5, se obtenían 320, con 0.6 se obtenían 130; finalmente, se aceptó 0.7, con lo que se obtenía 32 correlaciones significativas ($p<0.0001$).

*2. **Análisis de los resultados***: este análisis nos lleva a plantearnos diferentes situaciones.

1. Existencia de correlaciones que se deben al azar y que no pueden tener ninguna explicación fisiopatológica, tales como niveles de potasio arterial/peso pulmonar teórico.

2. Existencia de correlaciones a las que nosotros, a la luz de los conocimientos actuales, no estamos en condiciones de dar una explicación. Podrían ser debidas al azar estadístico, pero también a una verdadera relación fisiopatológica, como Péptido Natriurético Auricular/Fosfatidil-Etanolamina tisular.

3. Correlaciones evidentes que se esperaba encontrar, y que derivan, bien de la homogeneidad de la muestra, bien del propio fenómeno, cuales son las correlaciones de un mismo parámetro en sangre arterial y venosa o peso del animal y peso de las vísceras.

4. Hallazgos novedosos propios de nuestra tesis, que se han comentado ampliamente, cual es el caso de la relación entre niveles de ANP y tiempo de la agonía.

5. Correlaciones que cabe esperar y que no se producen, o que lo hacen con un nivel sde significación más bajo del esperado. Es el caso de la correlación osmolaridad/sodio plasmático; esta correlación es evidente, hasta el punto de que la osmolaridad puede calcularse con gran exactitud a partir del contenido de sodio. El hecho de que no encontremos esta correlción se debe sencillamente a un problema metodológico. Nuestro objetivo no era la exacta determinación de la osmolaridad, por lo que no se tomaron las precauciones necesarias para evitar las interferencias: congelación y anticoagulantes. Nuestras muestras tenían que ser congeladas y debían llevar EDTA por exigencias técnicas para otros parámetros.

3. Estrategia de Redacción: otra cuestión a plantear es si plasmábamos en esta tesis todas las correlaciones mayores de 0.40. Hemos decidido que no, y ello por razones estéticas de no incluir un listado de números que, muchas veces, nada significa. Para obviar la falta de información que ello pudiera suponer, se dan todos los datos en las tablas de resultados, lo que permitiría,a cualquier persona interesada, obtenerlos. De este modo somos conscientes de que el hecho de que muchas de las correlaciones que nosotros obtenemos con 0.7 ó más se den sólo en una serie -debiendo darse en las otras dos, dado que son fenómenos independientes de la sumersión- por ejemplo, peso del animal/peso corazón [que en la serie III tiene una r=0.73, siendo de 0.69 para la serie II y de 0.63 para la serie I] podrían crear sorpresa al lector. Cualquier investigador

versado en estadística sabe que cuando se adopta un criterio tan exigente como es, en biología, el de una correlación (r) de 0.70 en datos que se analizan en un sólo punto, pueden aparecer este tipo de *sorpresas*.

Aceptando los anteriores presupuestos, las correlaciones superiores a 0.70 que hemos obtenido son las siguientes:

SERIE CONTROL

Calcio art / Calcio ven: 0.70
Calcio art / Hemoglobina art: 0.71
Hemoglobina plasmática art / Hemoglobina plasmática ven: 0.74
Hemoglobina plasmática art / Tiempo agonía: 0.87
Hemoglobina total art / Número de hematíes art: 0.78
Hemoglobina total art / Hemoglobina total ven: 0.79
Proteínas art / Proteínas ven: 0.87
Osmolaridad art / Osmolaridad ven: 0.99
Cloro art / Cloro ven: 0.70
ANP aurícula derecha / PE tejido: -0.77

SERIE II

Magnesio art / Magnesio ven: 0.79
Hemoglobina plasmática art / Hemoglobina plasmática ven: 0.94
Hemoglobina total ven / Proteínas art: -0.71
Magnesio art / ANP plasmático: 0.76
Potasio art / Peso pulmonar teórico: 0.74
Hemoglobina plasmática art / PE pulmonar: 0.72
Sodio plasmático arterial / Peso corazón: 0.79
Calcio art / Número de hematíes ven: 0.74

Calcio art / Volumen Corpuscular Medio art: -0.80
Calcio art / Volumen Corpuscular Medio ven: 0.71
Volumen Corp. Medio art / Volumen Corp. Medio ven: 0.77
Proteínas ven / Osmolaridad art: 0.71
Proteínas ven / Peso estómago: 0.73
Proteínas ven / Peso contenido sólido estómago: 0.75
Osmolaridad art / Osmolaridad ven: 0.81
ANP plasmático / Tiempo en morir: 0.72

SERIE III

Volumen Corp Medio art / Volumen Corp Medio ven: 0.74
Hematocrito art / Volumen Corp Medio ven: 0.82
Cloro art / Cloro ven: 0.87
Peso animal / Peso corazón: 0.73
Tiempo hongo / Tiempo morir: 0.77
ANP plasmático / Tiempo en morir: 0.83

6.2. DISCUSION GLOBAL.

Las primeras observaciones con rigor científico realizadas por VIBERT y BROUARDEL en el año 1880 demostrando que en la sumersión vital tiene lugar el paso de agua a los pulmones y al torrente circulatorio, produciendo una dilución de la sangre y cambios osmóticos esenciales para explicar el mecanismo de muerte, se confirman -una vez más- en nuestro trabajo.

A favor de este proceso hablan factores como el aumento del peso real de los pulmones o aquellos otros que abogan en favor de una hemodilución, con la consecutiva disminución del nivel de proteinas.

El mecanismo de muerte exacto en la sumersión es hoy en día motivo de discusión entre los investigadores, como lo ha venido siendo desde hace décadas. De la lectura del capítulo de Introducción se ha podido deducir que han sido numerosísimos los estudios realizados hasta la actualidad sobre el mecanismo de muerte en este tipo de asfixia, entre los que acaso debemos destacar aquí dos ya mencionados repetidamente, como son los de BROUARDEL y VIBERT de 1880 y los de SWANN y SPAFFORD dese 1947 a 1951 y que supusieron verdaderos puntos de inflexión en el

conocimiento del mecanismo de muerte en la sumersión, a pesar de que en la actualidad sean duramente discutidos.

La discusión que se obtiene tras la lectura detenida de esta bibliografía es evidente y no muy alentadora. Todas las teorías emitidas sobre el mecanismo de muerte en la sumersión parecen ser ciertas, al menos parcialmente. Nosotros tenemos el convencimiento, que compartimos con multitud de autores, de que en la muerte por sumersión se produce la suma de tres mecanismos fundamentales: esto es, el paso de agua a los pulmones con la rotura alveolar, las alteraciones hidroelectrolíticas a consecuencia de la llegada de fluido de sumersión al torrente circulatorio y el efecto de hemodilución y arrastramiento de los componentes del surfactante pulmonar, con las consecutivas alteraciones morfológicas de los alveolos pulmonares.

La certeza de si son estos procesos -combinados o independientemente- u otros desconocidos hasta la actualidad, los que justifican los hallazgos que posteriormente se obtienen en la autopsia de un sumergido, creemos que será difícil de obtener. Ello es debido a la gran situaciones posiboles dentro de la sumersión vital, donde se combinan tres grandes factores con míltiples posibilidades cada uno de ellos.

En primer lugar, influye el tipo de sumersión que se puede producir en una persona que cae al agua: sumersión con paso de agua a los pulmones -teniendo en cuenta el tiempo de duración de ésta y la cantidad de agua deglutida,entre otros factores- sumersión-hidrocución, etc...

En segundo lugar, hay factores intrínsecos del individuo, como son la edad, la capacidad de defensa, la posible presencia de alcohol o tóxicos en el organismo capaces de hacer disminuir los reflejos y la capacidad de defensa, existencia de patologías previas que puedan agravarse con la sumersión e incluso ser la causa de la muerte, repleción gástrica, etc...

Finalmente y en tercer lugar, hay factores que dependen del líquido de sumersión: cantidad de sales, presencia de contaminantes tóxicos o no, temperatura, movimientos y turbulencias de las aguas, profundidad, etc...

Consideramos que los tres mecanismos antes mencionados son los que pueden explicar la causa de muerte en la gran mayoria de las sumersiones que se corresponden asu vez, en el mayor número de casos, con sumersiones con paso de agua alos pulmones, proceso que ha correspondido al sufrido en nuestra muestra experimental. Estos mecanismos son los que pueden explicar la causa de muerte, bien por un fenómeno de asfixia, bien por un proceso de fibrilación ventricular tras gran alteración hidroelectrolítica.

Estos tres mecanismos han quedado patentes en los resultados de muchos de los parámetros estudiados por nosotros. Hablarian a favor de la entrada de agua resultados ya referidos como peso de los pulmones o cantidad de proteinas. A favor de las alteraciones electrolíticas, los resultados obtenidos con los iones, pero especialmente el Na, Cl, Ca y Mg. A favor de las alteraciones en el surfactante pulmonar, los resultados altamente significativos obtenidos en el lavado endobronquial con la Fosfatidil-Colina, Fosfatidil-Etanolamina y Fosfatidil-Glicerol.

Hay que sañalar, sin embargo, que las afirmaciones señaladas anteriormente presentan algunas limitaciones para nosotros. Muchas de ellas se postulan por deducirse que deben producirse así, pero no porque se hayan comprobado científicamente. Otras han sido comprobadas pero no se conoce exactamente la alteración producida.

Nos ha llamado considerablemente la atención que en la bibliografia mundial se defiende el mecanismo de muerte por fibrilación ventricular en sumersión vital en agua dulce, mientras que los mismos que lo afirman no han sido capaces de encontrar pruebas fehacientes que justifiquen dicho mecanismo de

muerte. La alteración electrolítica a consecuencia de cualquier tipo de sumersión vital es evidennte. Y más evidente es que dicha alteración fisiopatológicamente hablando, debe ser más grave en el caso de agua dulce. Nosotros hemos comprobado la presencia de una alteración electrolítica importante que afecta a nuestra muestra problema (series II y III) pero de ello no se deduce la posibilidad de un mecanismo de muerte por fibrilación ventricular. Es indudable que las alteraciones comprobadas por nosotros van a tener una significación fisiopatológica importante, pero a la vista de los resultados obtenidos para el ión potasio no podemos afirmar que haya causa alguna que justifique la muerte por fibrilación ventricular en la sumersión vital en agua dulce. Por contra, sí coincidimos con multitud de investigadores (DEN OTTER et al, 1960; FORTHMAN y DAVIDSON, 1965; MODELL y DAVIS, 1969; MODELL et al, 1969; MAXWELL, 1970; CAMPS et al, 1976; GIERTSEN, 1977; ORLOWSKI, 1987; POLSON y GEE, 1988, entre otros muchos) en señalar que las alteraciones electrolíticas existen pero no son especialmente intensas.

Por ello consideramos que la sumersión es un síndrome complejo caracterizado por el paso de un líquido al pulmón que provoca:

1. Alteraciones anatómicas y funcionales del alveolo que conducen a una dificultad de la hematosis.

2. Perturbación de la dinámica cardíaca.

3. Perturbación metabólica compleja: dilución protéica, grandes cambios en la serie roja, alteraciones electrolíticas, etc...

El organismo pone en marcha rápidamente mecanismos para controlar la hiperpotasemia y el aumento del volumen circulante. De ahí que no se encuentren niveles altos de potasio en plasma y sí un aumento exagerado de los niveles de Péptido Natriurético Auricular.

Finalmente, un extremo importante para nosotros es la afectación que se produce sobre el sistema pulmonar por la entrada del fluido de sumersión. La destrucción o la dilución del surfactante pulmonar justifica sobradamente lo señalado por SIMONIN (1973) y por GISBERT (1986) en el sentido de que se producirá una dilatación de los alvelolos más grandes y un colapso de los más pequeños. Ambos fenómenos tendrán como consecuencia la imposibilidad del intercambio gaseoso, bien porque el capilar es comprimido, bien porque el colapso alveolar lo impide.

En resumen, y como hemos señalado ya con anterioridad, conocer el mecanismo exacto de muerte en la sumersión vital es muy difícil, y ello, porque se combinan la existencia de multitud de formas de sumersión y de factores ambientales e individuales junto con la existencia de diversos procesos fisiopatológicos cientificamente comprobados.

No obstante, no es objetivo de esta tesis -como hemos dicho previamente- formular hipótesis sobre el mecanismo de muerte en las asfixias, limitándonos por ello tan sólo a este relación de datos que confirman los procesos fisiopatológicos más aceptados.

Con este trabajo de investigación ha sido nuestra intención, exclusivamente, la obtención de marcadores bioquímicos que permitan el diagnóstico de la sumersión vital, así como el diagnóstico diferencial entre sumersión en agua dulce-sumersión en agua salada, objetivos que por otra parte no nos parecen despreciables.

Desde nuestra experiencia en el Departamento de Medicina Legal de Granada, que se ha distinguido mundialmente por ser uno de los primeros impulsores de la Tanatoquimia,en su aplicación especial a la Patología Forense, podemos afirmar que el empleo de los marcadores bioquímicos debe ser enormemente prudente y especializado. Efectivamente, en la investigación de

la sumersión que el patologo debe afrontar en la sala de autopsias, la mayor información se obtiene de la conjunción de su experiencia y sus conocimientos con un exámen necrópsico pormenorizado. La mayoría de los signos clásicos macroscópicos de la sumersión vital tienen un valor relativo, pero adquieren un valor absoluto si se emplean conjuntamente. La conjunción lógica en el cadáver de hallazgos como hongo de espuma abundante, edema pulmonar, congestión encefálica, higado cardiaco, etc... dirigen certeramente hacia el diagnóstico. El empleo de técnicas complementarias puede postergarse a los casos en que la duda o la necesidad de obtener un diagnóstico exacto y preciso lo exija.

Con ello queremos afirmar que el empleo de marcadores bioquímicos no debe de hacer confiarse al patólogo de tal manera que signos macroscópicos le pasen inadvertidos o no los sepa valorar adecuadamente por creer, falsamente, que posteriores pruebas complementarias de laboratorio pueden aclaralo todo.

No se debe deducir de lo afirmado anteriormente que no se puedan emplear -incluso de modo sistemático- dichos marcadores. De hecho, otra de las características propias de los trabajos experimentales de nuestro Departamento de Medicina Legal es la inmediata aplicabilidad práctica de los resultados obtenidos. Ello queda plasmado también en este trabajo desde el momento en que podemos afirmar la utilidad de la determinación de los fosfolípidos Fosfatidil-Colina, Fosfatidil-Etanolamina y Fosfatidil-Glicerol en lavado endobronquial y, sobre todo, del Péptido Natriurético Auricular en plasma para el diagnóstico de la sumersión vital y la diferencia de si esta se produjo en agua dulce o salada.

Efectivamente, y ya ha sido discutido profusamente con anterioridad, el comportamiento de los fosfolípidos del lavado endobronquial y, en menor grado, del tejido pulmonar, ha sido bastante satisfactorio. La ausencia de información previa sobre el tema limita considerablemente nuestra capacidad de discusión; sin embargo, si podemos afirmar que la determinación

de niveles de Fosfatidil-Colina, Fosfatidil-Etanolamina y Fosfatidil-Glicerol en el lavado endobronquial de los sumergidos permite diferenciar claramente la sumersión vital de la postmortal, además de hacer lo propio entre una sumersión en agua dulce y agua salada.

Pese a haber obtenido diferencias estadísticamente significativas entre los niveles de Fosfatidil-Colina en las tres series, y en los niveles de Fosfatidil-Inositol entre la serie control y las problema, la poca diferencia existente entre los valores nos hace aceptar con recelos dicho resultado, necesitando de un más profundo estudio que lo confirme.

Por último, el Péptido Natriurético Auricular ha confirmado todas nuestras esperanzas. Las diferencias de sus niveles entre lo grupos problema (II y III) con respecto a los grupos control (I y IV) es tan evidente que nos permite afirmar sin lugar a dudas la utilidad de este parámetro bioquímico como mmarcador de la sumersión vital . Ello confirma nuestra hipótesis de partida de que la liberación de A.N.P. se estimula por la dilatación auricular consecutiva al incremento de la volemia en una sumersión vital. Igualmente, las diferencias de nivel entre los grupos problema (tabla XXVIII y XXVIIIb) son sugestivas de un mayor incremento de la volemia en las sumersiones en agua dulce, permitiendo el diagnóstico diferencial entre sumersión en agua dulce y sumersión en agua salada, independientemente de la influencia que el incremento de sodio pueda tener.

El resto de los resultados obtenidos, y ya discutidos en este capítulo, constituyen un bloque de referencia para los nuevos marcadores, que además confirman los resultados obtenidos previamente por otros autores. La ausencia de correlación entre ellos, como ya ha sido explicada, y con los nuevos marcadores bioquímicos, indica que tratándose de fenómenos inmersos en el idéntico proceso de la sumersión, tienen comportamientos independientes y en algunos casos complementerios. Esa ausencia de correlaciones puede que se

produjera también entre los propios individuos de la muestra, especialmente si estos se trataran de humanos, experiencia que esperamos poder realizar muy proximamente con los marcadores que han arrojado resultados más favorables en la presente Tesis Doctoral.

Si le sumamos factores individuales, climáticos, ambientales, etc... podemos afirmar -emulando a la frase tan certera y profusamente utilizada en clínica de que "no hay enfermedades, sino enfermos"-, que para el patólogo forense ***no hay sumersión, sino ahogados***.

7. CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

PRIMERA: La determinación del Péptido Natriurético Auricular en plasma es útil para establecer el diagnóstico de la sumersión vital y para el diagnóstico diferencial de si ésta se produjo en agua dulce o en agua salada.

SEGUNDA: El proceso de sumersión vital produce alteraciones del surfactante pulmonar evidenciables en el lavado endobronquial, especialmente referido a los fosfolípidos Fosfatidil-Colina, Fosfatidil-Etanolamina y Fosfatidil Glicerol, lo que permite el diagnóstico de sumersión vital y la posterior diferenciación de si esta se produjo en agua dulce o salada.

TERCERA: En el fenómeno de la sumersión vital se producen modificaciones electrolíticas que son más evidentes en el caso de los iones Sodio, Cloro y Magnesio, permitiendo por sí solas establecer el diagnóstico diferencial entre sumersión en agua dulce y sumersión en agua salada.

CUARTA: En nuestras condiciones, el estudio de los iones Sodio y Potasio en Humor Vítreo no tiene validez alguna para establecer el diagnóstico de sumersión vital.

QUINTA: Del análisis conjunto de los parámetros hematológicos evaluados por nosotros se deduce que, por sí solos, son útiles para establecer la vitalidad de la sumersión, así como para diferenciar las acaecidas en agua dulce de las acaecidas en agua salada.

8. BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

ABDALLAH AM, HASSAN SA, KABIL MA, GHANIM AEE. Serum strontium stimation as a diagnostic criterium of the type of drowning water. *For Sci Int*, 1985; **28**: 47-52

ACKERMANN U. Structure and function of Atrial Natriuretic Peptide *Clin Chem*, 1986; **32**: 241-247

ADAMSON IYR, BOWDEN DH. *Exp Mol Pathol*, 1973; **18**: 112-124 (Citados por Spitzer et al, 1975)

ARJAAMA O, VUOLTEENAHO O. Sodium ion stimulates the release of Atrial Natriuretic Polypeptides (ANP) from rat atria. *Biochem Biophys Res Commun*, 1985; **132**: 375-381

ATLAS SA, LARAGH JH. Atrial Natriuretic Peptide: a new factor in hormonal control of blood pressure and electrolyte homeostasis. *Ann Rev Med*, 1986; **37**: 397-414

AVERY ME, SAID S. Surface phenomena in lungs in health and disease. *Medicine*, 1965; **41**: 503-526

BALLERMAN BJ, BRENNER BM. Biologically active atrial peptides. *J Clin Invest*, 1985; **76**: 241-2048

BIBLIOGRAFIA

BATENBURG JJ, LONGMORE WJ, Van GOLDE LMG. The synthesis of phosphatidylcholine by adult rat lung alveolar type II cells in primary culture. *Biochim Biophys Acta*, 1978; 529: 160-170

BATENBURG JJ, Van GOLDE LMG. Formation of pulmonary surfactant in whole lung and isolated type II cells. *Rev Perinat Med*, 1979; 3: 73-114

BECKMAN DL, WEISS HS. Hyperoxia compared to surfactant washout on pulmonary compliance in rats. *J Appl Physiol*, 1969; 26: 700-709

BENNETT HJ, WAGNER T, FIELDS MD. Acute hyponatremia and seizures in an infant after a swimming lesson. *Pediatrics*, 1983; 72: 125-127

BERNSTEIN RE. Potassium and sodium balance in mammalian red cells. *Science*, 1954; 20: 459-460

BIANCHI C, GUTKOWSKA J, THIBAULT G, GARCIA R, GENEST J, CANTIN M. Radioautographic localitation of I-Atrial Natriuretic Factor in rat tissues. *Histochemistry*, 1985; 82: 441-452

BLIGH EG, DYER WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol*, 1959; 37: 911-917

BLOCH K, SCOTT J, ZISFERIN J, FALLON J, MARGOLIES M, SEIDMAN C, MATSUEDA G, HOMCY C, GRAHAM R, SEIDMAN J. Biosynthesis and secretion of proatrial natriuretic factor by cultured rat cardiocytes. *Science*, 1985; 230: 1168-1171

De BOLD AJ. Heart atria granularitry effects on changes in water-electrolyte balance. *Proc Soc Exp Biol Med*, 1979; 161: 508-511.

BIBLIOGRAFIA

De BOLD AJ, **BORENSTEIN HB, VERESS AT, SONNENBERG GH.** A rapid and potent natriuretic response to intravenous injection of atrial myocardial extracts in rats. *Life Sci*, 1981; 28: 89-94

De **BOLD AJ.** Tissue fractionation studies on the relationship between an atrial natriuretic factor and specific atrial granules. *Can J Physiol Pharmacol*, 1982; **60**: 324-330

BOMPIANI GD, RAMILLES CH, HATT PY. Le tronc commun du faisceau de Hiss et de cellules claires de l'oreillette droite. *Arch Mal Coeur*, 1959; **52**: 1257-1265

BRIGGS JP, MARIN-GREZ M, STEIPE B, SCHUBERT G, SCHNERMANN J. Inactivation of atrial natriuretic substance by kallikrein. *Am J Physiol*, 1984; **247**: F480-F484

BRINKMANN B, FECHNER G, PÜSCHEL K. Zur Lungenhistologie bei experimentellen Ertrinken. *Z Rechtsmed*, 1983; **89**: 267-277

BÜRGISSER E, RAINE AEG, ERNE P, KAMBER B, BÜHLER FR. Human cardiac plasma concentrations of atrial natriuretic peptide quantified by radioreceptor assay. *Biochem Biophys Res Commun*, 1985; 133: 1201-1209

CAMPS FE, ROBINSON AE, LUCAS BGB. drowning: immersion. En: Gradwohl's Legal Medicine. Bristol, John Wright and sons, Ltd, 1976: 349-355

CARAMELO C, FERNANDEZ-CRUZ A,VILLAMEDIANA M, LOPEZ-NOVOA JM. Systemic and regional hemodinamic effects of a synthetic Atrial Natriuretic Factor in conscious rats. *Clin Sci*, 1986; 71: 323-325

BIBLIOGRAFIA

CISCAR F, FARRERAS P. Diagnóstico hematológico. Clínica y laboratorio. Barcelona, Jims, ed.,1964: 211-247

CLEMENTS JA. Pulmonary edema and permeability of alveolar membranes. *A M Arch Env Health*, 1961; 2: 280-293

CLEMENTS JA. Surfactant in pulmonary disease. *N Engl J Med*, 1965; 272: 1336-1337

COPELAND AR. An assesment of lung body weight in drowning cases. The Metro Dade County experience from 1978 to 1982. *Amer J For Med Pathol*, 1985; 6: 301-304

COUTSELINIS A, BOUKIS D. The estimation of Mg^{2+} concentration in cerebrospinal fluid (C.S.F.) as a method of drowning diagnosis in sea water. *For Scie*, 1976; 7: 109-111

CURRAN WJ, McGRAY AL, PETTY CS. Drowning. En: Modern Legal Medicine, Psichiatry and Forensic Science. Philadelphia, FA Davis Co, 1980: 262-264

CURRIE MG, GELLER DM, COLE BR, BOYLAN JC, YuSHENG W, HOLMBERG SW, NEEDELMAN P. Bioactive cardiac substances: potent vasorelaxant activity in mammalian atria. *Science*, 1983; 221: 71-73

CURRIE MG, GELLER DM, CHAO J, MARGOLIUS HS, NEEDELMAN P. Kallikrein activation of a high molecular weight atrial peptide. *Biochem Biophys Res Commun*, 1984; 120: 461-466

CHAPEAU C, GUTKOWSKA J, SCHILLER PW, MILNE RW, THIBAULT G, GARCIA R, GENEST J, CANTIN M. Localization of inmunorreactive synthetic Atrial Natriuretic Factor (ANF) in the heart of various animal species. *J Hystochem Cytochem*, 1985; 33: 541-550

BIBLIOGRAFIA

DEBINSKI W, GUTKOWSKA J, KUCHEL O, THIBAULT G. ANF-like peptide(s) in the peripheral autonomic nervous system. *Biochem Biophys Res Commun*, 1986; **134**: 279-283

DÉROBERT L. Submersion. En: Médecine Légale. Paris, Flammarion Médecine-Sciences, 1974: 398-433

DESMAREZ JJ. Contribution a l'étude de la noyade expérimentale. *Ann Méd Lég*, 1963; **43**: 14-27

DESMAREZ JJ. Les carences du oxygène: la noyade. En: Manual de Médecine Légale a l'usage des juristes. Bruselas-París, Presses Universitaires, 1967: 235-242

DETHLOFF LA, GILMOR. LB, HOOK GER. Sepaartion of pulmonary surfactant phospholipids by high performance liquid chromatography. *J Chromatogr*, 1986; 382: 79-87

DIETZ PE, BAKER SP. Drowning. Epidemiology and Prevention. *Am J Pathol*, 1974; **64**: 303-312

DOBBS LG, MASON RJ. Pulmonary alveolar type II cells isolated from rats. *J Clin Invest*, 1979; 63: 378-387

DOBBS LG, MASON RJ, WILLIAMS MC, BENSON BJ, SVEISCH K. secretion of surfactant by prymary cultures of alveolar type II cells isolated from rats. *Biochim Biophys Acta*, 1982; 713: 118-127

DOBBS LG, GONZALEZ RF, MARINARI LA, MESCHER EJ, HAWGOOD S. The role of calcium in the secretion of surfactant by rat alveolar type II cells. *Biochim Biophys Acta*, 1986; 877: 305-313

DURLACHER SH, FREIMUTH HC, SWAN Jr HE Blood changes in man following death due to drowning. *Arch Pathol*, 1953; 56: 454-461

BIBLIOGRAFIA

EDITORIAL Drinking and Drowning. *Br Med J*, 1979; 1: 70-71

EDWARDS BS, ACKERMANN DM, SCHWAB DR, HEUBLEIN DM, EDWARDS WD, WOLD LE, BURNETT JC. The relationship between atrial granularity and circulating Atrial Natriuretic Peptide in hamsters with congestive heart failure. *Mayo Clin Proc*, 1986; 61: 517-521

ESKAY R, ZUKOWSKA-GROJEC Z, HAAS M, NIKES DL. Circulating atrial natriuretic peptide in conscious rats: regulation of release by multiple factors. *Science*, 1986; 232: 636-639

FABRE E, MARTINEZ MA, RUIZ J, SERRANO JL, VEINTEMILLA MJ. A practical method to analyze the phospholipids in the amniotic fluid using HPTLC. *Rev Esp Fisiol*, 1986; 42: 171-178

FARTHMANN EH, DAVIDSON AIG. Fresh water drowning at lowewred temperature. An experimental study. *Am J Surg*, 1965; 109: 410-415

FERNANDEZ-CRUZ A, MARCO J, CUADRADO LM, GUTKOWSKA J, RODRIGUEZ-PUYOL D, CARAMELO C, LOPEZ-NOVOA JM. Niveles plasmáticos de Péptido Natriurético Auricular en pacientes cirróticos. *Lancet (Ed. Esp.)*, 1986; 8: 359-360

FLYNN TG, DAVIES PL. The biochemistry and molecular biology of atrial natriuretic factor. *Biochem J*,1985; 232: 313-321

FOLCH J, LEES M, SLOANE-STANLEY GH. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem*, 1957; 226: 497-507

FOROUGHI E. Serum changes in drowning. *J For Sci*, 1971; 16: 269-282

BIBLIOGRAFIA

FRANCO V, KLEINB. The microdetermination of chlorides in serum and spinal cord. *J Lab Clin Med*, 1951; **37**: 950-954

FROSOLONO MT, SLIVKA S, CHARMS BS. Acyl transferase activities in dog lung microsomes. *J Lipid Res*, 1971; **12**: 69-103

FUNAYAMA M, AOKI Y, SEBETAN IM, SAGISAKA K. Detection of diatoms in blood by a combination of membrane filtering and chemical digestion. *For Sci Int*, 1987; **34**: 175-182

GARCIA R, CANTIN M, GENEST J. Relationship of specific granules to the natriuretic and diuretic activity of rat atria. *Experientia*, 1982; **38**: 1071-1073

GENEST J. The atrial natriuretic factor. *Br Heart J*, 1986; **56**: 302-316

GERBES AL, ARENDT RM, PAUMGARTNER G. Atrial natriuretic factor. Possible implications in liver disease. *J Hepatol*, 1987; **5**: 123-132

GETTLER AO. A method for the determination of death by drowning. *J A M A*, 1921; **27**: 1650-1652

GIAMMONA ST, MODELL JH. Drowning by total immersion. Effects on pulmonary surfactant of distilled water, isotonic saline, and sea water. *Amer J Dis Child*, 1967; **114**: 612-616

GIBSON TR, SHIELDS PP, GLEMBOTSKI CC. The conversion of Atrial Natriuretic Peptide (ANP)-(1-126) to ANP-(99-126) by rat serum: contribution to ANP cleavage in isolated perfused rat hearts. *Endocr*, 1987; **120**: 764-772

GIERSTEN JC. Drowning while under the influence of alcohol. *Med Sci Law*, 1970; **10**: 216-219

BIBLIOGRAFIA

GIERSTEN JC. Drowning. En: Forensic Medicine. CG Tedeschi, W Eckert, LG Tedeschi (vol III). Philadelphia, WB Saunders Co, 1977: 1317-1322

GILLFILLAN AM, CHU AJ, SMART DA, ROONEY SA. Single plate separation of lung phospholipids including disaturate phosphatidylcholine. *J Lipid Res*, 1983; **24**: 1651-1656

GISBERT JA. Sumersión. En: Medicina Legal y Toxicología. Valencia, Fundación García Muñoz, 1983: 570-579

GLUCK L, MOTOYAMA EK, SMITH HL. The biochemical development of surface active in mammalians lung. I. The surface-active phospholipids; the separation and distribution of surface-active lecithin in the lung of the developing rabbit fetus. *Pediatr Res*, 1967; **1**: 237-246

GNÄDINGER MP, LANG RE, HASLER L, UEHLINGER DE, SHAW S, WEIDMAN P. Plasma kinetics of synthetic alpha-human Atrial Natriuretic Peptide in man. *Mineral Electrolyte Metab*, 1986; **12**: 371-374

GOETZ KL, WANG BC, GEER PG, LEADLE RJ, REINHARDT HW. Atrial strechts increases sodium excretion independently of release of atrial peptides. *Am J Physiol*, 1986; **250**: 946-950

VAN GOLDE LMG. Metabolism of phospholipids in the lung. *Am Rev Respir Dis*, 1976; **114**: 977-1000

VAN GOLDE LMG, DEN BREEJEN JN, BATENBURG JJ. Isolated alveolar type II cells: a model for studies on the formation of surfactant dipalmitoylphosphatidylcholine. *Biochem Soc Transac*, 1985; 13: 1087-1089

BIBLIOGRAFIA

GOODMAN-GILMAN A, GOODMAN LS, GILMAN A. Hipnóticos y sedantes. En: Goodman-Gilman A, Goodman LS, Gilman A, eds. Las bases farmacológicas de la terapeútica. Buenos Aires, Panamericana, 1982: 297-300

GORDON I The anatomical signs in drowning. A critical evaluation. *For Sci*, 1972; 1: 389-395

GORDON I, SHAPIRO HA, BERSON SD. Rapids death from interference with oxigenation of the tissues. En: Forensic Medicine, a guide to principles. New York, Churchill Livingstone, 1988: 81-125

GREENBERG BD, BENCEN HJ, SEILHAMER JJ, LEWICKI JA, FIDDES JC. A.N.P.: a new hormon. *Nature*, 1984; 312: 656-658

GREENE DG. Pulmonary edema. En: FENN HO, RAHN H, ed. Handbook of Physiology: a critical, comprehensive presentation of physiological knowledge and concepts. New York, Raven Press, 1965: 1585-1600 (Citado por Morgan, 1971)

GREENWOOD FC, HUNTER WM. The preparation of ^{131}I labelled Human Growth Hormone of high specific radioactivity. *Biochem J*, 1963; 89: 114-123

GUALDI G. La diatomee nella diagnosi di annegamento. Parte I: Biologia delle diatomee. *Zacchia*, 1968; 4: 31-74

GUERRERO JA, VARA-THORBECK R. Normovolämische Hämodilution und Hirnödem. *Zent Bl Chirurg*, 1982; 107: 1374-1380

GUTKOWSKA J, THIBAULT G, MILNE RW, JANUSCEWICZ P, SCHILLER PW, CANTIN M, GENEST J. Radioimmunoassay of Atrial Natriuretic Factor (ANF) in rat atria. *Proc Dsoc Exper Biol Med*, 1984a; 176: 105-108

BIBLIOGRAFIA

GUTKOWSKA J, THIBAULT G, JANUSCEWICZ P, CANTIN M, GENEST J. Direct radioimmunoassay of Atrial Natriuretic Fcator. *Biochem Biophys Res Commun*, 1984b; 122: 593-601

GUTKOWSKA J, GENEST J, THIBAULT G, GARCIA R, LAROCHELLE P, CUSSON JR, KUCHEL O, HAMET P, De LEAN A, CANTIN M. ANF: Circulating forms and radioimmunoassay of Atrial Natriuretic Factor. *Br Heart J*, 1986; 56: 302-316

GUTKOWSKA J. ¿Es el Factor Natriurético Auricular una hormona exclusivamente cardiaca? *Rev Clin Esp*, 1987; 181: 1-3

HANSELL T, ULFENDAL HR. Atriopeptins and renañ cortical papillary blood flow. *Acta Physiol Scand*. 1986; 127: 349-357

HARRISON MH, KEIL LC, WADE JE, GEELEN G, GREENLAF JE. Effect of hydration on plasma volume and endocrine response to water immersion. *J Appl Physiol*, 1986; 61: 1410-1417

HARTLE DK, BRODY MJ. The angiotensin II pressor system of the rat forebrain. *Circ Res*, 1984; 54: 355-359

HARTSHORNE H. Water versus hydrotherapy or an essay on water and its true relations to medicine. Philadelphia: LLoyd P. Smith, 1847: 28 (Cita por GERBES et al, 1987)

HARTTER E, WEISSEL M, STUMMVOLL HK, WOLOSZCZUK W, PUNZENGRUBER C, LUDVIK B. Atrial Natriuretic Peptide concentrations in blood from right atrium in patient with severe right heart failure. *Lancet*, 1985; 3: 93-94

HARTTER E, WOLOSZCZUK W, STUMMVOLL HK. Radioimmunoassay of Atrial Natriuretic Peptides in human plasma. *Clin Chem*, 1986; 32: 441-445

BIBLIOGRAFIA

HENDEY NI. The diagnostic value of diatoms in cases of drowning. *Med Sci Law*, 1973; 13: 23-34

HENRY JP, PEARCE JW. The possible role of cardiac atrial stress receptors in the induction of changes in urine flow. *J Physiol* (London), 1956; 131: 572-579

HIGGINS JA. Separation and analysis of membrane lipid components. En: Findley, Evans, eds. Biological membranes: a practical approach. Oxford, Wasshington DC, IRL press, 1987: 103-121

HIRATA Y, TOMITA M, YOSHIMI H, IKEDA M. Specific receptors for ANF in cultured vascular smooth muscle of rat aorta. *Biochem Biophys Res Commun*, 1984; 125: 562-566

HIRATA Y, TOMITA M, TAKADA S, YOSHIMI H. Vascular receptor binding activities and cyclic GMP responses by synthetic human and rat ANP and receptor down regulation by ANP. *Biochem Biophys Res Commun*, 1985, 128: 538-546

HOOK GER, SPALDING JW, ORTNER MJ, TOMBROPOULOS EG, CHIGNELL CF. Investigation of phospholipids of the pulmonary extracellular lining by electron paramagnetic resonance. *Biochem J*, 1984; 223: 533-542

HORKY K, GUTKOWSKA J, GARCIA R, THIBAULT G, GENEST J, CANTIN M. Effect of different anesthetics on immunoreactive Atrial Natriuretic Factor concentrations in rat plasma. *Biochem Biophys Res Commun*, 1985; 129: 651-657

HUET M, CANTIN M. Ultrastructural cytochemistry of atrial muscle cells. II. Characterization of the protein content of specific granules. *Lab Invest*, 1974; 30: 154-160

BIBLIOGRAFIA

HUNTER WM, GREENWOOD FC. Preparation of Iodine-131 labelled Human Growth Hormone of high specific activity. *Nature*, 1962; 194: 495-496

JACOBS HC, IKEGAMI M, JOBE AH, BERRY DD, JONES S. Reutilization of surfactant phosphatidylcholine in adult rabbits. *Biochim Biophys Acta*, 1985; 837: 77-84

JETTER WW, MORITZ AR. Changes in the magnesium and chloride contents of blood from drowning in fresh and sea water. *Arch Pathol*, 1943; 35: 601-609

JAMIESON JD, PALADE GE. Specific granules in atrial muscle cells. *J Cell Biol*, 1964; 23: 151-172

JIMENEZ W, MARTINEZ-PARDO A, ARROYO V, GAYA J, RIVERA F, RODES J. Atrial Natriuretic Factor: reduced content in cirrhotic rats with ascites. *Am J Physiol*, 1986; 250: F749-F752

JOHN A, STASCH JP, NEUSER D, HIRTH C, MORICH FJ. The use of a monoclonal antibody to measure plasma atriopeptins in rat. *Life sci*, 1986; 38: 1991-1997

KARCH SB. Pathology of the heart in drowning. *Arch Pathol Lab Med*, 1985; 109: 176-178

KARKOLA K, NEITTAANMÄKI H. Diagnosis of drowning by investigation of left heart blood. *For Sci Int*, 1981; 18: 149-153

KARPOVICH PV. Water in the lungs of drowned animals. *Arch Pathol Lab Med*, 1933; 15: 828-833

KATES M. Techniques of lipidology. En: Laboratory trchniques in biochemistry and molecular biology. New York, American Elsevier, 1972: 279-388

KAYE G, CAMM AJ. The role of the atria in fluid volume control. *Brit J Hosp Med*, 1985; 34: 82-88

BIBLIOGRAFIA

KHAN AQ, SIKPI MO, DAS SK. Phospholipid composition of guinea pig lung lavage. *Lipids*, 1985; 20: 7-10

KING RE. Pulmonary surfactant. *J Appl Physiol*, 1982; 53: 1-8

KINNEY EL, CORTADA X, VENTURA R. Cardiac size and motion during water immersion: implications for volume homeostasis. *Am Heart J*, 1987; 113: 345-349

KISCH, B. Electron microscopy of the atrium of the heart. I. Guinea pig. *Exp Med Surg*, 1956; 14: 99-112

KNIGHT B. Drowning. En: Legal aspects of medical practice. Edinburgh, Churchill Livingstone, 1976: 156-159

KOSEKI T. Fundamental examinations of experimental materials and control animals on the diagnosis of death from drowning by the diatom method. *Acta Med Biol*, 1968; 15: 207-219

KYLSTRA JA. Drowning: the role of salts in the drowning fluid. A preliminary report on observations in mice. *Acta Physiol Pharmacol Neerland*, 1962; 10: 327-334

LYMAN J, FLEMMING RH. *J Marine Res*, 1948; 3: 134-142 (Citado por Swann y Spafford, 1951)

DE LEAN A, GUTKOWSKA J, McNICOLL P, SCHILLER PW, CANTIN M, GENEST J. Characterization of specific receptors of atrial natriuretic factors in bovine adrenal zona glomerulosa. *Life Sci*,1984; 35: 2311-2318

LORENTE-CARRILLO M. Transformación del sustrato renal por acción de hormonas alarmínicas. Estudio experimental en el gato por acción de DOCA, Cortisona y ACTH. Tesis Doctoral, Universidad de Granada, 1957: 42-48

BIBLIOGRAFIA

LORENTE JA, HERNANDEZ-CUETO C, VILLANUEVA E. Postmortem stability of the rat ANP. Comunicación al XIV Congreso Internacional de Medicina Legal y Medicina Social. Lieja, Septiembre, 1988

MADERT J, BAUSE HW, PÜSCHEL K, BRINKMANN B. Hämodynamische dysregulation beim Ertrinken in verschieden-osmolaren Flüssigkeiten. *Beitr Gericht Med*, 1982; 40: 109-115

MAESTRACCI P. Las noyades. Notions recentes. *J Med Légale Droit Med*, 1984; 27: 181-188

MAGOON MW, WRIGHT JR, BARITUSSIO A, WILLIAMS MC, GOERKE J, BENSON BJ, HAMILTON RL, CLEMENTS JA. Subfractionation of lung surfactant. Implications for metabolism and surface activity. *Biochim Biophys Acta*, 1983; .750: 18-31

MAVIS RD, FINKELSTEIN JN, HALL BP. Pulmonary surfactant synthesis A highly active microsomal phosphatidate phosphohydrolase. *J Lipid Res*, 1978; 19: 467-477

MARIE JP, GUILLEMOT H, HATT PY. Le degré de granulation des cardiocytes auriculaires: étude planimetrique au cours de differents apports d'eau et du sodium chez le rat. *Pathol Biol* (Paris), .976; 24: 549-554

MASON RJ, DOBBS LG. Synthesis of phosphatidylcholine and phosphatidylglycerol by alveolar type II cells in primary culture. *J Biol Chem*, 1980; 255: 5101-5107

MATA P. II. Declarar que un sujeto ha sido asfixiado por sumersión. En: Tratado de Medicina Legal y Cirugía Legal. Madrid, carlos Bailly-Baillere, 1868: 622-642

MAVIS RD, FINKELSTEIN JN, HALL BP. Pulmonary surfactant

synthesis. A highly active microsomal phosphatidate phosphohydrolase in the lung. *J LIpid Res*, 1978; **19**: 467-477

MAXWELL GM. Experimental drowning: coronary haemodinamics and myocardial metabolism in the dog. *Q J Exp Physiol*, 1970; **55**: 330-332

McKENZIE JC, TANAKA I, INAGAMI T, MISONO KS, KLEIN RM. Alterations in atrial and plasma Atrial Natriuretic Factor (ANF) content during development of hypoxia-induced pulmonary hypertension in the rat. *Proc Soc Exp Biol Med*, 1986; **181**: 459-463

McLAUGHLIN LL, WEI Y, STOCKMANN PT, LEAHY KM, NEEDELMAN P. Development, validation and application of an enzyme immunoassay (EIA) of atriopeptin. *Biochem Biophys Res Commun*, 1987; **144**: 469-476

MEAD J, TAKASHIMA T, LEITH D. Stress distribution in lungs: a model of pulmonaru elasticity. *J Appl Physiol*, 1970; 28: 596-608

MIKI M, HAJDUCZOK M, KLOCKE MR, KRASNEY JA, HONG SK, De BOLD AJ. Atrial Natriuretic Factor and renal function during head-out water immersion in conscious dogs. *Am J Physiol*, 1986; 251: R1000-R1004

MIKI K, HONG SK, KRASNEY JA. Mechanism of the increase in plasma volume during head-out water immersion. *Physiologist*, 1987; 30: S100-S101

MISONO KS, GRAMMER RT, FUKUMI H, INAGAMI T. Rat atrial natriuretic factor: isolation, structure and biological activities of four major peptides. *Biochem Biophys Res Commun*, 1984; **123**: 444-451

BIBLIOGRAFIA

MISONO KS, GRAMMER RT, RIGBY JW, INAGAMI T. Photoaffinity labelling of ANF receptor in bovine and rat adrenal cortical membranes. *Biochem Biophys Res Commun*, 1985; 130: 994-1001

MODELL JH, MOYA F. Effects of volume aspirated fluid during chlorinated ffresh water drowning. *Anesthesiology*, 1966; 27: 662-672

MODELL JH, MOYA F, NEWBY EJ, RUIZ BC, SHOWERS AV. The effects of fluid volume in seawater drowning. *Annals Intern Med*, 1967; 67: 68-80

MODELL JH, DAVIS JH. Blood gas and electrolyte changes in human near-drowning victims. *J A M A*, 1968; 203: 99-105

MODELL JH, DAVIS JH. Electrolyte changes in human drowning victims. *Anesthesiology*, 1969; 30: 414-420

MODELL JH, WEIBLEY TC, RUIZ BC, NEWBY EJ. Serum electrolyte concentrations after fresh-water aspiration: a comparison of species. *Anesthesiology*, 1969b; 30: 421-425

MODELL JH. Biology of drowning. *Ann Rev Med*, 1978; 29: 1-8

MONTALDO S. Reperti pulmonari ultrastrutturali nell'asfissia sperimentale da annegamento. *Zacchia*, 1963; 23: 334-352

MORGAN TE, FINLEY TN, HUBER GL FIALKOW H. Alterations in pulmonary surface active lipids during exposure to increased oxygen tension. *J Clin Invest*, 1965; 44: 1737-1744

BIBLIOGRAFIA

MORGAN TE, FINLEY TN, FIALKOW H. Comparison of the composition and surface activity of "alveolar" and whole lung lipids in thec dog. *Biochim Biophys Acta*, 1965b; **106**: 403-413

MORGAN TE. Biosynthesis of pulmonary surface-active lipids. *Arch Intern Med*, 1971; **127**: 401-407

MORGAN TE. Pulmonary surfactant. *New Eng J Med*, 1971b; **284**: 1185-1193

MORITA M, TABATA N, MAYA A. Studies on asphyxia: on the changes of the alveolar walls of rats in the hypoxic state. *For Sci Int*, 1985; **27**: 81-92

MORITZ AR. Chemical methods for the determination of death by drowning. *Physiol Rev*, 1944; **24**: 70-88

MÖTTÖNEN M, RAVANKO O. Nachweiss des Todes durch Ertrinken mittels im Blut gefundener fremder Pflanzenelemente. *Z Rechtsmed*, 1971; **68**: 261-266

MÜLLER B, VON WICHERT P. Bronchoalveolar lavage porteins. *Klin Wochenschr*, 1985; 63: 781-787

MURTHY K, THIBAULT G, GARCIA R, et al.(Citado por GUTKOWSKA et al, 1987).

NAKAYAMA N, OHKUBO H, HIROSE T, INAYAMA S, NAKANISHI S. mRNA sequence for human cardiodilatin atrial natriuretic factor precursor and regulation of precursor mRNA in rat atria. *Nature*, 1984; 310: 699-701

NEEDELMAN P, ADAMS SP, COLE BR, CURRIE MG, GELLER DM, MICHENER ML, SAPER CB, SCHWARTZ D, STANDAERT DG. Atriopeptins as cardiac hormones. *Hypertension*, 1985; 7: 306-310

BIBLIOGRAFIA

NEEDELMAN P. Atriopeptin biochemical pharmacology. *Federation Proc*, 1986; **45**: 2096-2100

VON NEERGAARD K. Neue Auffassungen über einen Grundbegriff der Atemmechanik. *Z Ges Exp Med*, 1929; **66**: 17-23

NILSSON G, PETTERSSON A, HEDNER J, HEDNER T. Increased plasma levels of Atrial Natriuretic Peptide (ANP) in patients with paroxysmal supraventricular tachyarrithmias. *Acta Med Scand*, 1987; **221**: 15-21

NOPANITAYA N, GAMBILL G, BRINKHOUS KM. Fresh water drowning. Pulmonary ultrastructure and systemic fibrinolysis. *Arch Pathol*, 1974; **98**: 361-366

OGAWA K, ITO T, HASHIMOTO H, ITO Y, OHNO O, TSUBOI H, TAKASU N, TANAHASHI T, SATAKE T. Factor Natriurético Auricular plasmático en la insuficiencia cardíaca congestiva. *Lancet* (Ed).

OGIHARA J, SHIMA H, HARA H, TABUCHI K, HASHIZUME K, NAGANO M, KATAHIRA K, KANGAWA K, MATSUO H, KUMAHARA Y. Significant increase in plasma immunoreactive Atrial Natriuretic Polypeptide concentration during head-out water immersion. *Life Sci*, 1986; **38**: 2413-2418

ORLOWSKI JP, ABULLEIL MM, PHILIPS JM. Effects of tonicities of saline solutions on pulmonary injury in drowning. *Crit Care Med*, 1987; **15**: 126-130

PAGE E, GWENDOLYN E, GOINGS E, POWER B, UPSHAW-EARLEY J. Ultrastructural features of atrial peptide secretion. *Am J Physiol*, 1986; **251**: H340-H348

PARIKH CK. Drowning: immersion. En: Parikh's Textbook of medical Jurisprudence and Toxicology. Bombay, Medico-Legal centre, 1986: 210-224

PARIKH CK. Drowning: immersion. En: Medico-Legal postmortem in India. Guidelines for crimen investigations. Bombay, Medical Publications, 1988: 67-73

PARKER F, PETERSON NF. Quantitative analysis of phospholipids and phospholipid fatty acids from silica gel thin-layer chromatograms. *J Lipid Res*, 1965; 6:455-460

PATTEL RE. Properties, function, and origin of the alveolar lining layer. Proc Roy Soc (London), 1958; 148: 217-244

PENDERGAST DR, De BOLD AJ, PAZIK M, HONG SK. Effect of head-out immersion on plasma Atrial Natriuretic Factor. *Proc Soc Exp Biol Med*, 1987; 184: 429-433

PFLEGER RC, THOMAS HG. Beagle dog pulmonary surfactant lipids. *Arch Intern Med*, 1971; 127: 863-872 (Citado por King,1982)

PIETTE M, TIMPERMAN J, PARISIS N. L'apport du strontium dans la démonstration de la noyade du point de vue médico-légal. Comunicación al XIV Congreso Internacional de Medicina Legal y Medicina social. Lieja, Septiembre, 1988

POLSON CJ, GEE DJ. Drowning. En: The essentials of Forensic Medicine. Braumschweig, Pergamon Press, 1973: 440-466

POSSMAYER F, DUWE G, METCALFE R, STEWART-DE HAAN PJ, WONG C, LAS HERAS J, HARDING PGR. Cortisol induction of pulmonary maturation in the rabbit foetus. *Biochem J*, 1977; 166: 485-494

POSSMAYER RF, CASOLA PG, CHAN F, McDONALD P, ORMSETH MA, WONG T, HARDING PGR, TOKMAKJIAN S. Hormonal induction of pulmonary maturation in the rabbit fetus. *Biochem Biophys Acta*, 1981; 664: 10-21

DEL POZO A. Hipnóticos. En: Del Pozo A, ed. Farmacia Galénica especial. Barcelona, Romagraf, 1977: 7-31

PÜSCHEL K, MADERT J, BAUSE HN, BRINKMANN B. Zur Agonochemie des Ertrinkens. *Beitr Gericht Med*, 1982; 40: 99-107

RAINE AEG, PHIL D, ERNE P, BÜRGISSER E, MÜLLER F, BOLLI P, BURKART F, BÜHLER FR. Atrial Natriuretic peptide and atrial pressure in patients with congestive heart failure. *N Engl J Med*, 1986; 315: 533-537

RAMMER L, GERDIN B. Dilution of blood in fresh water drowning. Post-mortem determination of osmolarity and electrolytes in blood, cerebrospinal fluid and vitreous humor. *For Sci*, 1976; 8: 229-234

RANKIN AJ, COURNEYA N, WILSON N, LEDSOME JR. Tachycardia releases Atrial Natriuretic Peptide in the anesthetized rabbit. *Life Sci*, 1986; 38: 1951-1957

RANNER G, JUAN H, UDERMANN H. Zum Beweiswert von Diatomeen im Knochenmark beim Ertrinkungstod. *Z Rechtsmed*, 1982; 88: 57-65

RASCHER W, TULASSAY T, LANG RE. Atrial Natriuretic Peptide in plasma of volume overloaded children with cronic renal failure. *Lancet*, 1985; 2: 303-305

REIDBORD HE. Ultrastructural alterations in rat lungs. *Arch Pathol*, 1966; 81: 103-111

REIDBORD HE. An electron microscopic study of the alveolar-capillary wall following intratracheal administration of saline and water. *Am J Pathol*, 1967; 50: 275-289

REITER C. Zum Nachweiss des Ertrinkungstodes mittels ins Herzblut eingeschwemmter Raucherzellen. *Z Rechtsmed*, 1984; 93: 79-88

REVERTE JM. Eutanasia. En: Las fronteras de la medicina. Límites éticos, científicos y jurídicos. Madrid, Díaz de Santos, 1983: 101-122

RODRIGUEZ-PUYOL D, ARRIBA G, CARAMELO C, FERNANDEZ-CRUZ A, HERNANDO L, LOPEZ-NOVOA JM. Direct glomerular actions of ANP in rat. *Eur J Clin Invest*, 1986; 16: A9-A16

ROONEY SA, CANAVAN PM, MOTOYAMA EK. The identification of phosphatidylglicerol in the rat, rabbit, monkey and human lung. *Biochim Biophys Acta*, 1974; 360: 56-67

ROONEY AS. The surfactant system and lung phospholipid biochemistry. *Am Rev Respir Dis*, 1985; 131: 439-460

SANDERSON RJ, PAUL GW, VATTER AE, FILLEY GF. Morphological and physical basis for lung surfactant action. *Respir Physiol*, 1976; 27: 379-392

SAPER CB, STANDAERT CB, CURRIE MG, SCHWARTZ D, GELLER DM, NEEDELMAN P. Atriopeptin-immunoreactive neurons in the brain: presence in cardiovascular regulatory areas. *Science*, 1985; 227: 1047-1049

SARNAIK AP, VOHRA MP. Near-drowning: fresh, salt, and cold water immersion. *Clinics Sport Med*, 1986; 5: 33-46

SCHWÄR TG. Drowning: its chemical diagnosis. A review. *For Sci*, 1972; 1: 411-417

SCHWARTZ D, GELLER DM, MANNING PT, SIEGEL NR, FOK KR, SMITH CE, NEEDELMAN P. Ser-Leu-Arg-Arg-Atriopeptin III: The major circulating form of atrial peptide. *Science*, 1985; **225**, 397-400

SEIDMAN CE, DUBY AD, CHOI E, GRAHAM RM, HABER E, HOMCY C, SMITH JA, SEIDMAN JG.
Science, 1984; **225**: 324-326

SEYMUR AA. Renal and systemic effects of synthetic ANF. *Hypertension*, 1985; **A7**: 887-904

SHAFFER SG, GEER PG, GOETZ KL. Elevated Atrial Natriuretic Factor in neonates with respiratory distress syndrome. *J Pediatr*, 1986; **109**: 1028-1033

SHENKER Y, SIDER RS, OSTAFIN EA, GREKIN RJ. Plasma levels of inmunoreactive Atrial Natriuretic Factor in healthy subjects and in patients with edema. *J Clin Invest*, 1985;7**6**: 1684-1687

SIMONIN C. Sumersión. En: Medicina Legal Judicial. Barcelona, JIMS, 1962: 225-243

SPITZ WU, SCHNEIDER V. The significance of diatoms in the diagnosis of death by drowning. *J For Sci*, 1964; 9: 11-18

SPITZER HL, RICE JM, McDONALD PC, JOHNSTON JC. Phospholipid biosynthesis in lung mammalian lamellar bodies. *Biochem Biophys Res Commun*, 1975; 66: 17-23

SKOWSKY WR, FISHER DA. The use of thyroglobulin to induce antigenicity to snmall molecules. *J Lab Clin Med*, 1972; 80: 134-144

BIBLIOGRAFIA

SWANN HG, BRUCER M, MOORE C, BEZIEN BL. Fresh water and sea water drowning: a study of the terminal cardiac and biochemical events. *Texas Rep Biol Med*, 1947; 5: 423-427

SWANN HG, BRUCER M. The cardiorespiratory and biochemical events during rapid anoxic death. Fresh water and sea water drowning. *Texas Rep Biol Med*, 1949; 7: 604-618

SWANN HG, BRUCER M. The cardiorespiratory and biochemical events during rapid anoxic death. Obstructive asphyxia. *Texas Rep Biol Med*, 1949; 593-603

SWANN HG, SPAFFORD NR. Body salt and water charges during fresh and salt water drowning, *Texas Rep Biol Med*,1951: 9: 356-382

SWANN HG. Mechanism of circulatory failure in fresh and sea water drowning. *Circul Res*, 1956; 4: 241-244

TANAKA I, MISONO KS, INAGAMI T. Atrial Natriuretic Factor in rat hypothalamus, atria and plasma: determination by specific radioimmunoassay. *Biochem Biophys Res Commun*, 1984; 124: 663-667

TANG J, GEI H, XIE CW, SUEN MZ, HAN JS, WEBBER RJ, CHANGE D, CHANGE JK. Characterization and localization of atriopeptin in rat atrium. *Peptides*, 1984; 5: 1173-1177

TARDIEU A. Muerte por sumersión. En: Tratado de Medicina Legal. Barcelona, La Popular, 1883: 508-523

THIBAULT G, GARCIA R, CARRIER F, SEIDAH NG, LAZURE C, CHRETIEN M, CANTIN M, GENEST J. Structure-activity relationships of rat atrial natriuretic factor (ANF). I. Natriuretic activity and relaxation of smooth intestinal muscle. *Biochem Biophys Res Commun*, 1984; 125: 938-946

BIBLIOGRAFIA

THIBAULT G, GARCIA R, GUTKOWSKA J, . Identification of the released form of atrial natriuretic factor by the perfused rat heart. *Proc Soc Exp Biol Med*, 1986; 182: 138-141

THIBAULT G, GARCIA R, GUTKOWSKA J, BILODEAU J, LAZURE C, SEIDAH NG, CHRÉTIEN M, GENEST J, CANTIN M. The propeptide Asn^{1}-Tyr^{126} is the storage form of rat Atrial Natriuretic Factor. *Biochem J*, 1987; 241: 265-272

THOINOT L. Sumersión. En: Tratado de Medicina Legal. Barcelona, Salvat y Cia, 1916: 614-657

TIERNEY DF, CLEMENTS JA, TRAHAN HJ. Rates of replacement of lecithin and alveolar instability in rat lung. *Am J Physiol*, 1967; 213: 671-676

TIKKANEN I, FYHRQUIST F, METSÄRINNE K, LEIDENIUS R. Plasma Atrial Natriuretic Peptide in cardiac disease and during infusion inn ealthy volunteers. *Lancet*, 1985; 3: 66-69

TIMPERMAN J. The diagnosis of drowning. A review. *For Sci*, 1972; 1: 397-409

TORRE C, VARETTO L, TAPPI F. Scanning electron microscopic ultrastructural alterations of the pulmonary alveolus in experimental drownings. *J For Sci*, 1983; 28: 1008-1012

TORRE C, VARETTO L. Scanning electron microscopic study of the lung in drowning. *J For Sci*, 1985; 30: 456-461

TOSHIMA N, AKINO T. Alveolar and tissue phospholipids of rat lung. *Tohoku J Exp Med*, 1972; 108: 253-263

BIBLIOGRAFIA

TRIPPODO NC, COLE FE, McPHEE AA, PEGRAM BL. Biologic mechanisms of Atrial Natriuretic Factor. *J Lab Clin Med*, 1987; 109: 112-119

TORRE C, VARETTO L, TAPPI E. Scanning electron microscopic ultrastructural alterations of the pulmonary alveolus in experimental drownings. *J For Sci*, 1983; 28: 1008-1012

TULASSAY T, RASCHER W, HAJDU J, LANG RE, TOTH M, SERI I. Influence of dopamine on Atrial Natriuretic Peptide level in premature infants. *Acta Paediatr Scand*, 1987; 76: 42-46

VARA-THORBECK R, GUERRERO JA. Le dextran et l'hémodilution dans la prevention de la thrombo-embolie postopératoire. *Acta Chirurg Belgica*, 1980; 4: 249-55

VARA-THORBECK R, GUERRERO JA. Hemodynamic response of elderly patients undergoing major surgery under moderate normovolemic hemodilution. *Eur Surg Res*, 1985; 17: 372-376

VARA-THORBECK R, LOPEZ-QUIÑONES M, GUERRERO JA, CASTRO J. Modificaciones tromboelastográficas inducidas por la hemodilución con dextrano en cirugía de la cadera. *Cirugía Esp*, 1986; 5: 1061-1069

VARA-THORBECK R, ROSELL-PRADAS J. Prophylaxe der tiefen Venenthrombose (T.V.T.) in der Hüftchirurgie. *Zent Bl Chir*, 1986b; 111: 633-639

VARA-THORBECK R, GUERRERO JA. Renal function in patients undergoing major surgery under moderate normovolemic hemodilution. *Zent Bl Chir*, 1987; 112: 1583-1587

BIBLIOGRAFIA

VARA-THORBECK R, ROSELL J, SALVI M, VARA-THORBECK C. Präoperative Hämodilution als Prophylaxe der postoperativen tiefen Venenthrombose und septischer Frühkomplikationen bei kolorektalen Resektionen. *Zent Bl Chir*, 1988; 113: 1024-1029

VERESS AT, CHONG CK, SONNENBERG H. Inactivation of Atrial Natriuretic Factor in blood. *Can J Physiol Pharmacol*, 1985; 63: 1615-1617Inactivation of Atrial Natriuretic Factor in blood. *Can J Physiol Pharmacol*, 1985; 63: 1615-1617

VIBERT Ch. Submersion. En: Précis de Médecine Légale. Paris, JB Brillière et fils, 1911: 134-163

VILLANUEVA E. Cronotanatodiagnóstico: métodos y crítica. En: Estudios dedicados a Juan Peset Aleixandre. Universidad de Valencia, 1982: 779-809

WEI Y, HOLMBERG SW, LEAHY KM, OLINS PO, DEVINE S, NEEDLMAN P. Heparin interferes with the biological effectiveness of atriopeptin. *Hypertension*, 1987; 9: 607-610

WENKEBACH KF, WINTERBERG H. Die Unregelmassige Herztatigkeit. Verlag Von Wilhelm Engelman, (1927); Leizpig, 252 (Citados por Kaye y Camm, 1985).

WINQUIST RJ. Possible mechanism underlying the vasorelaxant response to ANP. *Fed Proc*, 1986; 45: 2371-2375

WOOD P. Polyuria in paroxysmal tachycardia and paroxysmal atrial flutter and fibrilation. *Br Heart J*, 1963; 25: 273-282 (Citado por Yamaji et al, 1985).

BIBLIOGRAFIA

YAMAJI T, ISHIBASHI M, NAKAOKA H, IMATAKA K, AMANO M, FUJII J. Possible role for Atrial Natriuretic Peptide in polyuria associated with paroxysmal atrial arrhythmias. *Lancet*, 1985; 2: 1211

YAMAMOTO K, YAMAMOTO Y, KIKUCHI H. The effects of drowning media on the lung water content. *Z Rechtsmed*, 1983; 90: 1-6

YANDLE TG, RICHARDS AM, NICHOLLS MG, CUNEO R, ESPINER EA, LIVESEY JH. Metabolic clearance rate and plasma half life of alpha-human Atrial Natriuretic Peptide in man. *Life Sci*, 1986; 38: 1827-1833

YANDLE TG, ESPINER EA, NICHOLLS MG, DUFF H. Radioimmunoassay and characterization of Atrial Natriuretic Peptide in human plasma. *J Clin Endocr Metab*, 1986b; 63: 72-79

YAMAMOTO K, YAMAMOTO Y, KIKUCHI H. The effects of drowning media on the lung water content. An experimental study on rats. *Z Rechtsmed*, 1983; 90: 1-6

YANG-FENG TL, FLOYD-SMITH G, NEMER M, DROUIN J, FRANCKE U. The pronatriodilatin gene is located on the distal short arm of human chromosome 1 and on mouse chromosome 4. *Am J Hum Genet*, 1985; 37: 1117-1128