

Revisão sobre o diagnóstico de afogamento com o uso do plâncton: teste de diatomáceas e de PCR

L. Donadel ^{a,*}, N. Cardoso ^b, A. Hoenisch ^a, L.R.P. Utz ^b

^a Especialistas em Biologia e Genética Forense, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre (RS), Brasil

^b Professoras Orientadoras do Curso de Especialização em Biologia e Genética Forense – Departamento de Biodiversidade e Ecologia, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre (RS), Brasil

* Endereço de e-mail para correspondência: leticiaadonadel@yahoo.com.br. Tel.: +55-51-93638967

Recebido em 22/05/2014; Revisado em 14/10/2014; Aceito em 11/11/2014

Resumo

Afogamento é uma causa muito comum de morte em países como o Brasil, que possuem um extenso manancial hídrico. No entanto, o diagnóstico de morte por afogamento é considerado um dos mais difíceis da ciência forense, pois os sinais comuns utilizados na autópsia podem não estar presentes ou desaparecem rapidamente. Assim, o diagnóstico através do plâncton foi desenvolvido para auxiliar na investigação médico-legal de morte por afogamento. Organismos planctônicos, tais como microalgas podem ser encontrados nos órgãos internos de vítimas de afogamento por serem inaladas juntamente com a água, passando à circulação sanguínea através de pequenas lesões nos alvéolos pulmonares. O teste de diatomáceas trata da análise quantitativa e qualitativa de algas diatomáceas presentes nos tecidos internos das vítimas. A técnica de PCR visa identificar DNA planctônico no sangue e tecidos das vítimas através da confecção de *primers* de acordo com a comunidade planctônica presente no meio do afogamento. Este estudo apresenta uma revisão das técnicas atuais utilizadas na área da investigação forense de afogamentos, bem como discussões de autores consagrados na área de biologia e genética forense sobre a validade e utilidade do teste de diatomáceas e da técnica de PCR para o diagnóstico de morte por afogamento.

Palavras-Chave: Fitoplâncton; DNA; Biologia Forense; Diagnóstico de Morte.

Abstract

Drowning is a common cause of death in countries such as Brazil, which have an extensive water sources. However, the diagnosis of death by drowning is considered one of the most difficult in forensic science, since the common signs used at autopsy may not be present or disappear quickly. Thus, the diagnosis through the plankton was developed to aid in the legal investigation of death by drowning. Planktonic organisms such as microalgae can be found in the internal organs of victims of drowning once they are inhaled with the water passing into the blood circulation through small lesions in the lung alveoli. The diatom test is a quantitative and qualitative analysis of diatom algae present in the internal tissues of the victims. The PCR technique aims to identify planktonic DNA in blood and tissues of victims by designing primers according to the plankton community present in the midst of drowning. This study presents a review of current techniques used in the field of forensic investigation of drowning, as well as discussions of established authors in the field of forensic biology and genetics on the validity and utility of the diatom test and PCR for the diagnosis of death by drowning.

Keywords: Phytoplankton; DNA; Forensic Biology; Diagnosis of Death.

1. INTRODUÇÃO

O campo da investigação forense faz uso de diversos métodos na tentativa de elucidar as prováveis causas da morte de pessoas vítimas de homicídio, suicídio ou acidentes. Os afogamentos fazem parte deste grupo, com uma estimativa de mais de 490.000 vítimas fatais por ano no mundo [1]. Em alguns países esta é uma das principais

causas de morte em crianças e adolescentes [2]. Quando o corpo é recuperado, pouco tempo após a morte é possível observar sinais característicos de afogamento, no entanto, estes sinais, em geral, são passageiros e encobertos pelos efeitos da decomposição. Além disso, em casos onde a vítima sofreu severas lesões antes de submersa, é obviamente importante determinar se a morte ocorreu devido a estes ferimentos ou devido ao afogamento [1],

[3]. Portanto, nestes casos onde as circunstâncias da morte não são claras é necessário recorrer a outros métodos para determinar a causa da morte.

O teste de diatomáceas consiste na detecção de algas microscópicas, presentes no plâncton marinho e dulcícola, e no organismo de vítimas fatais de afogamento. Este método se baseia no pressuposto de que, durante o afogamento, algas são inaladas juntamente com a água, desta forma, passam dos pulmões para a circulação sanguínea através de lesões nos alvéolos pulmonares, se alojando em vários órgãos internos e medula óssea [4]. A recuperação post-mortem das diatomáceas é possível devido estas serem constituídas por uma parede extracelular, conhecida como frústula, que é composta de sílica, componente resistente a vários agentes ácidos utilizados no processo de degradação de tecidos orgânicos em laboratório. Depois de destruídos os tecidos, as amostras são analisadas, em microscópio óptico, tanto qualitativamente, através da identificação taxonômica, quanto quantitativamente, através do número de espécies, possibilitando conclusões a respeito do afogamento [5-11].

Outras técnicas com uso de organismos planctônicos como indicadores de morte por afogamento, além da análise microscópica têm sido desenvolvidas. A técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) permite rapidez nos resultados e garantia na amplificação seletiva de quantidades diminutas de DNA planctônico. A especificidade deste método é dada pelos *primers* utilizados na reação, ou seja, sequências iniciadoras desenhadas a partir das comunidades planctônicas do corpo hídrico que se deseja investigar. Em conjunto com o PCR, métodos como DGGE (*Denatured Gradient Gel Electrophoresis*) que permitem a visualização de perfis moleculares ou “*molecular fingerprinting*” tem demonstrado grande potencial como aliado na elaboração de um correto diagnóstico médico-legal [12-19].

O estudo das algas e da genética tem mostrado grande potencial no esclarecimento de casos de afogamento, principalmente quando não há testemunhas e as circunstâncias não são claras. Aqui serão apresentadas as principais contribuições dos especialistas da área sobre as técnicas de diagnóstico de afogamento com a utilização do teste de diatomáceas e de PCR.

2. A MORTE POR AFOGAMENTO

O termo afogamento é definido como sendo um processo que resulta em insuficiência respiratória primária devido à submersão/imersão em qualquer meio líquido. Após este processo a vítima pode viver ou morrer, mas independentemente do resultado, ela esteve envolvida em um incidente de afogamento [2].

O processo fisiopatológico de afogamento possui um curso regular. Inicialmente a vítima ‘segura’ a respiração

até o ponto máximo, depois ocorre aspiração involuntária de água. A consciência é perdida cerca de três minutos após a submersão e a morte ocorre após aproximadamente dez minutos de submersão. Durante este tempo um grande volume de água é inalado e levado à circulação por lesões nos alvéolos pulmonares. Contudo, a morte ocorre devido à diminuição irreversível do oxigênio cerebral decorrente de um período prolongado de hipoxemia, isto é, insuficiência de oxigenação na corrente sanguínea. Porém, sob certas circunstâncias, o afogamento não segue este padrão, podendo ocorrer em cerca de 10% dos casos espasmos da laringe que provocam a liberação de um muco espesso, bloqueando as vias respiratórias, este fenômeno é chamado de afogamento seco. Outro modo de afogamento é decorrente da hiperventilação, provocando a aspiração de água prematura e morte mais rápida, diminuindo o volume de água aspirado [20].

Em casos de afogamento a perícia investiga todas as circunstâncias relevantes para se determinar a causa da morte, uma vez que existem várias possibilidades, como acidente, homicídio ou suicídio [21]. O local da morte é um importante ponto da investigação, pois por muitas vezes a vítima é encontrada em local distinto àquele em que realmente perdeu a vida, tanto por remoção intencional do corpo, quanto pela movimentação da correnteza, em um mesmo corpo hídrico. Todas estas hipóteses devem ser investigadas e esclarecidas. Para um correto diagnóstico de afogamento é necessário excluir a presença de lesões que possam por si só explicar a causa da morte, como traumatismos, ferimentos por projéteis ou objetos perfurantes, para então investigar a presença dos sinais de afogamento. Os sinais externos mais comuns são pele anserina, maceração epidérmica e cogumelo de espuma (espuma fina na boca e narinas). Dentre os sinais internos destacam-se a presença de líquido nas vias respiratórias e aparelho digestivo [22]. No entanto, estes sinais são geralmente passageiros e podem ser encobertos pelos efeitos da decomposição [3]. Como é o caso do cogumelo de espuma, que pode ser facilmente levado pela água antes do resgate do corpo [23]. Entretanto, durante o processo de afogamento também ocorrem pequenas lesões nas membranas alveolares e, como resultado, partículas presentes na água podem entrar na circulação sanguínea [4]. Uma vez na corrente sanguínea é possível a deposição de microrganismos nos órgãos e medula óssea, proporcionando material para testes mais aprofundados, o qual podem apresentar resultados específicos sobre as circunstâncias que envolveram o afogamento. Estes testes se mostram de grande importância nos casos em que os sinais mais comuns e de fácil detecção, os quais são revelados através da autópsia, não estão presentes ou desaparecem devido ao nível de decomposição do corpo [4-7, 9, 10].

3. TESTE DE DIATOMÁCEAS

Nas últimas décadas tem sido comum, principalmente na Europa, Ásia e América do Norte o estudo do teste de diatomáceas, visando solucionar casos de prováveis mortes por afogamento. Segundo Krstic *et al.* [21] estudos preliminares surgiram no início do século XX com o pesquisador alemão Revenstorff, o primeiro a analisar os pulmões de vítimas fatais de afogamento visando detectar o conteúdo de água inalado. Neste mesmo período cientistas observaram que elementos cristalinos suspensos na água poderiam ser encontrados nas cavidades esquerdas do coração de pessoas afogadas, todavia este tipo de análise caiu em desuso, até que algumas décadas depois a investigação de diatomáceas no sangue e órgãos foi desenvolvida [4]. O assunto passou a ser amplamente estudado a partir do trabalho de Incze (1942), que se baseou na presença de diatomáceas no sangue e tecidos periféricos [21].

O teste de diatomáceas consiste em analisar, em microscopia óptica, a presença de diatomáceas, em amostras coletadas de órgãos da vítima, após processos de degradação dos tecidos. Os métodos mais comuns utilizam ácido nítrico e peróxido de hidrogênio (digestão com ácidos forte); Proteinase K (digestão enzimática); ácido nítrico em *disorganization can* (método desenvolvido por Li *et al.* [24]) e Soluene-350 (solubilizante orgânico forte com base de tolueno) [8], [25]. Cada um destes métodos atua de forma distinta com relação ao tempo/capacidade de digestão dos tecidos e desgaste das diatomáceas. Estudos demonstram que as frústulas de diatomáceas marinhas e dulciaquícolas reagem de forma diferente ao tratamento com o Soluene-350. Este método é eficaz para casos de afogamento em água doce, entretanto é extremamente destrutivo para as diatomáceas marinhas, devido a sua frústula ser menos silicificada e, conseqüentemente, menos resistente em comparação às diatomáceas dulcícolas. Portanto, o tratamento utilizando a proteinase K é mais indicado nos casos de afogamento em água do mar [26]. Desta forma é recomendável que o método de degradação seja escolhido levando em consideração o local do afogamento e o tecido a ser degradado, evitando a destruição das frústulas presentes nas amostras, tanto do corpo, quanto no meio, aumentando assim a sensibilidade e confiabilidade do teste [8].

Vários fatores influenciam na distribuição quantitativa e qualitativa de diatomáceas no corpo de vítimas de afogamento. Por exemplo, a densidade de diatomáceas no meio de afogamento e a filtragem no que diz respeito ao tamanho, já que as diatomáceas passam dos pulmões para o sangue, portanto, a morfologia de uma valva, por exemplo, seu tamanho máximo, espessura e formato, são decisivos para a penetração no organismo [10, 11]. É esperado que grandes valvas alcancem apenas os

pulmões, estômago e duodeno, e que pequenas valvas (<40µm) entrem no sangue, fígado, rins mais facilmente. Para a análise quantitativa, a densidade de diatomáceas é calculada através do número de valvas por área, por volume ou por unidade de peso, sendo essencial incluir fragmentos de diatomáceas, porque a informação contida nestes é tão importante quanto a das valvas intactas. Estudos mostram que locais com alta densidade de diatomáceas, apresentam resultados positivos mais claros [11].

Com relação à quantidade de espécies encontradas o número costuma ser maior para o pulmão, de cinco a oito espécies [7], e menor para a medula óssea, não mais de três espécies [9]. Possivelmente este resultado ocorra devido à baixa quantidade de sangue circulante que a medula óssea recebe [9]. É recomendado que a identificação de cada valva ou fragmento de valva seja feita até o nível mais específico possível e que o material encontrado seja documentado por meio de imagem digital [11].

A variação sazonal das diatomáceas também é um fator importante a ser analisado, pois se refere à dinâmica das populações e é marcante na distribuição de diatomáceas de lagos, rios e açudes [7, 10, 27]. Os resultados positivos do teste podem estar ligados aos meses de floração, devido à época de alta concentração destas algas na água, o que é um fator chave para o resultado. Em países de clima frio como o Canadá, ocorre uma floração em massa de diatomáceas em água doce no início da primavera, seguido de um declínio na população viva, com altos níveis de diatomáceas mortas na água durante o verão. No outono, outra floração acontece e há um declínio no inverno, até a próxima primavera [9, 10]. Um estudo referente à variação sazonal do fitoplâncton na foz dos rios do delta do Jacuí, Rio Grande do Sul, demonstrou uma nítida variação da comunidade de diatomáceas durante as diferentes estações do ano, sendo que a comunidade apresentou maior representatividade no final do outono e inverno [28]. Tendo em vista esta variação sazonal, Pollanen *et al.* [10] sugerem que através do levantamento dos gêneros comuns em cada estação do ano, é possível deduzir a época do ano que a morte ocorreu, nos casos de corpos recuperados altamente decompostos. No entanto, é preciso cautela ao relacionar o diagnóstico do afogamento com estas variações sazonais, pois cada ambiente apresenta uma dinâmica particular, sendo necessário conhecimento histórico da variação sazonal da comunidade de algas do local para sustentar conclusões a respeito do afogamento.

A utilidade do teste de diatomáceas também é discutida nos casos de afogamentos em banheiras e piscinas, chamado afogamento doméstico. Esta é uma área pouco explorada de aplicação do teste, sendo um número muito baixo de afogamentos diagnosticados por este método. Embora a água proveniente do

abastecimento público contenha baixa ou nenhuma concentração de diatomáceas, o teste pode ser útil em casos onde o local tenha sido usado repetidamente e/ou não tenha sido devidamente limpo. É recomendado que nestes casos seja feita a comparação das frústulas encontradas nos quatro lóbulos pulmonares, de pelo menos quatro diferentes órgãos e do meio de afogamento, além da análise cuidadosa dos resultados da autópsia [29]. Ainda é possível o diagnóstico do afogamento doméstico se frústulas tenham sido adicionadas à água. Em experiências com tais casos, foi constatado que as frústulas presentes nos órgãos de afogados em banheiras são diferentes das diatomáceas típicas de água doce, devido estas terem origem em produtos de limpeza abrasivos que contém tipos fossilizados de diatomáceas [9].

O teste de diatomáceas além de auxiliar na determinação da causa da morte, é útil, em certos casos, para apontar o possível local do afogamento. Através da análise qualitativa é possível comparar as principais espécies encontradas nas amostras de tecidos com as amostras do provável meio de afogamento. Desta forma, pode-se confirmar ou não que o afogamento ocorreu em um determinado local [5-7, 9-11, 30].

Os oponentes ao teste de diatomáceas têm duas críticas principais: uma na qual defendem que as diatomáceas não podem ser recuperadas em todos os casos de afogamento e outra em que as diatomáceas podem ser recuperadas de órgãos de pessoas não afogadas [8-9]. Há pelo menos duas explicações para a falta de diatomáceas nos órgãos de pessoas realmente afogadas: ou a morte deu-se rapidamente, impedindo a penetração de diatomáceas na circulação e nos órgãos [31]; ou a morte ocorreu em águas com baixas concentrações de diatomáceas [9]. Nestes casos a busca por outros tipos de microalgas como as algas verdes pode ser uma alternativa, mas o cuidado na escolha do método de preparo do material deve ser redobrado, pois estas algas não possuem parede celular de sílica como as diatomáceas, sendo assim mais facilmente degradadas [32].

Por outro lado, a literatura sugere formas de entrada de diatomáceas no organismo de pessoas não afogadas, bem como de contaminação das amostras durante a preparação do material a ser analisado [31, 33]. A forma mais frequente de contaminação ocorre através de instrumentos laboratoriais não esterilizados, todavia, com medidas simples de controle laboratorial esta contaminação pode ser evitada [27]. Existe a possibilidade da entrada de diatomáceas no organismo através de absorção gastroentérica devido a ingestão de alimentos ou bebidas contendo estes organismos, ou por inalação de espécies aerófilas [33]. No entanto, a possibilidade mais questionada é da entrada de diatomáceas em corpos após a morte através da

transferência passiva de água do meio, por pressão hidrostática, para os pulmões e outros órgãos. Após um prolongado período de submersão ocorre o relaxamento dos músculos corporais e posterior decomposição do corpo, facilitando a entrada de diatomáceas após a morte [31]. Por este motivo os resultados provenientes da análise da medula óssea são considerados mais confiáveis que de outros órgãos. O osso representa um sistema fechado, necessitando da circulação sanguínea para levar as diatomáceas até a medula, o que só ocorrerá com a vítima ainda viva. Desta forma, apenas nos casos de afogamento verdadeiro, isto é, quanto ocorre aspiração de água pela vítima, é que existe a possibilidade da entrada de diatomáceas na medula óssea. Na grande maioria dos casos investigados, o teste de diatomáceas forneceu um resultado satisfatório na análise de amostras da medula femoral, demonstrando ser um importante auxiliar nas investigações de afogamentos [9, 10, 30, 34].

Um estudo recente, com o objetivo avaliar a possibilidade de resultados falso-positivos devido a exposição involuntária às diatomáceas, analisou amostras de 20 corpos recuperados da água e de 45 indivíduos com outras causas de morte que não o afogamento. Nas amostras de indivíduos não afogados não foram encontradas diatomáceas, mostrando uma diferença significativa entre os dois grupos analisados [35]. Estes resultados indicam que não deve haver um impedimento para a realização do teste, desde que sejam tomadas medidas de prevenção de contaminação e sejam utilizados protocolos padronizados [35-36].

4. O PLÂNCTON E O DNA

O termo “plâncton” se refere aos microrganismos que vivem livremente na coluna de água de ecossistemas aquáticos marinhos, estuarinos e continentais. Compreendem organismos tais como microalgas fotossintetizantes (fitoplâncton), microcrustáceos, protistas heterotróficos (zooplâncton), além de fungos, bactérias, entre outros. Apresentam diversas formas e tamanhos, podendo possuir de poucos micrômetros até alguns centímetros [37, 38].

A técnica de PCR permite a amplificação de moléculas de DNA de quaisquer organismos vivos, este método vem sendo usado com diversas finalidades, desde o diagnóstico de doenças, testes de paternidade, até a criação de organismos transgênicos. Na prática forense vem sendo muito utilizado nas últimas décadas em países como a China e Japão. A reação em cadeia da polimerase é baseada na amplificação exponencial seletiva de uma reduzida quantidade de DNA e a especificidade desta reação é dada pelos *primers* escolhidos, pois estes são desenhados de acordo com a região-alvo que se deseja amplificar. Pesquisadores desenvolveram métodos de PCR sensíveis e específicos para a amplificação do DNA

de microrganismos como algas encontrados em tecidos e órgãos humanos fazendo uso de *primers* confeccionados de acordo com a comunidade fitoplanctônica presente no meio do afogamento [12-18]. O avanço no desenvolvimento da biologia molecular tem proporcionado novas oportunidades de estudo da ecologia fitoplanctônica, e assim, diversas técnicas de amplificação estão sendo desenvolvidas utilizando-se genes relacionados à clorofila [14, 15] e genes ribossomais [19, 39-41].

Através da utilização da PCR, outros estudos foram realizados baseados em microrganismos (bactérias) de grande abundância no meio ambiente e corpo humano [42, 43]. Para Aoyagi *et al.* [42] e Suto *et al.* [43], a utilização de bactérias como base para a confecção dos *primers* pode ser vantajosa, pois estes organismos são extremamente pequenos e estão presentes em grande número no meio ambiente podendo entrar facilmente na circulação sanguínea e conseqüentemente atingir pulmões e outros órgãos. Além das bactérias presentes no meio líquido do afogamento, também as bactérias presentes na garganta e traqueia podem penetrar no sangue e órgãos através do trato respiratório podendo ser utilizadas como base para elaboração de iniciadores genéticos [43].

Técnicas de análise de DNA podem gerar perfis moleculares como o DGGE que consiste em uma separação eletroforética extremamente sensível capaz de distinguir mínimas diferenças no número de nucleotídeos discriminando um padrão de bandas com comprimentos semelhantes, que outras técnicas não são capazes de distinguir [18]. Muysen *et al.* [19] inovaram aplicando, pela primeira vez, a eletroforese DGGE como técnica para análise de comunidades bacterianas. Desde então o método tem sido amplamente utilizado para determinar perfis procarióticos e eucarióticos.

Para investigar a relação entre o perfil planctônico encontrado nos órgãos ou tecidos das vítimas e o perfil presente no suposto meio do afogamento, realiza-se a eletroforese DGGE que possibilita a análise de várias amostras simultaneamente e permite, através da comparação dos padrões de bandas, identificar o local do afogamento [18]. Para um efetivo diagnóstico de afogamento a separação das células planctônicas do sangue e tecidos humanos deve ser o mais eficaz possível. Estudos citam a utilização do Percoll® (Amersham Biosciences, Suécia) como um método de separação efetivo [14, 18]. Este produto é constituído de sílica recoberta por partículas coloidais possuindo características físicas ideais para utilização na separação de células, organelas, vírus e outras partículas subcelulares.

Em casos onde é necessária a identificação do local no qual ocorreu o afogamento, é possível fazer uma comparação entre amostras da água onde o corpo tenha sido encontrado, amostras da água dos corpos hídricos

suspeitos e amostras dos órgãos da vítima. Para isto a realização da eletroforese DGGE mostrou grande eficácia. Neste processo as bandas de DNA formadas pelas diferentes amostras são comparadas em busca de coincidências e exclusões. Assim este método de eletroforese pode auxiliar na identificação do local do afogamento, pois as grandes variações sazonais e regionais da comunidade fitoplanctônica tornam o resultado do DGGE ainda mais informativo e específico [18].

As amostras humanas mais utilizadas são sangue, pulmões, fígado, rins, medula óssea e cérebro [13-18]. Autores [15, 16, 18] comentam sobre a presença de plâncton nas amostras de pulmão de humanos não afogados. Assim como para o teste de diatomáceas, existe a possibilidade de contaminação laboratorial e transferência passiva de plâncton para órgãos internos, principalmente o pulmão, após a morte, podendo provocar resultado falso-positivo, desta forma a interpretação dos resultados deve ser feita de forma cautelosa. Caso existam indícios de contaminação laboratorial a questão poderá ser esclarecida com a comparação das amostras dos órgãos com a água coletada do local do afogamento. Contaminações mostrarão um padrão diferente e podem ser facilmente distinguidas, pois o elevado número de organismos planctônicos torna a equivalência das espécies provenientes de contaminação com as do meio natural algo improvável.

A utilização da PCR-DGGE nas investigações forenses tem grande potencial, mas, para que esta técnica seja definitivamente incorporada como complemento à autópsia, ainda são necessários esforços para a obtenção de maior conhecimento técnico - científico sobre este assunto.

5. CONCLUSÕES

Embora o valor do diagnóstico do teste de diatomáceas seja controverso entre muitos autores, a maior parte dos especialistas o considera um instrumento confiável e útil, especialmente quando utilizados protocolos padronizados e realizadas análises quantitativas e qualitativas. É imprescindível que seja escolhido um método de degradação apropriado a cada caso, considerando o local do afogamento e o tecido a ser degradado.

A utilização do PCR pode ser uma estratégia na investigação da causa mortis, além do teste de diatomáceas. No Brasil, a utilização do PCR como instrumento na investigação de mortes por afogamento ainda não é realizada apesar da disponibilidade de equipamentos, pois ainda faltam pesquisas mais aprofundadas que investiguem e testem a utilização de protocolos específicos para a identificação de organismos planctônicos em amostras humanas.

O teste de diatomáceas tornou-se um importante auxiliar na investigação médico-legal sobre homicídios em países da Europa, Ásia e América do Norte. Na América do Sul a aplicação do teste de diatomáceas é recente, sendo realizado apenas na Argentina [44] e Chile [45]. O Brasil não possui pesquisas relacionadas ao tema, porém, estudos existentes a respeito da composição e sazonalidade do fitoplâncton podem servir como base para utilização do teste de diatomáceas. As regiões sul e sudeste concentram a maior parte dos pesquisadores e, portanto grande parte dos estudos. Parcerias com estas instituições de pesquisa podem auxiliar em investigações futuras, permitindo a utilização do teste de diatomáceas e de PCR na investigação médico-legal no Brasil. O desenvolvimento de pesquisas que busquem aprimorar estas técnicas é de extrema importância nas ciências forenses, devido ao difícil diagnóstico da morte por afogamento.

AGRADECIMENTOS

Os autores gostariam de agradecer à coordenação do PPGBF da PUCRS, que oportunizou a participação e a publicação em tema tão fascinante.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] D. Szpilman. Afogamento. Retirado em 06/02/2008, de <http://www.fac.org.ar/scvc/llave/PDF/szpilmap.PDF>.
- [2] A.H. Idris; R.A. Berg; J. Bierens; L. Bossaert; C.M. Branche; A. Gabrielli; S.A. Graves; A.J. Handley; R. Hoelle; P.T. Morley; L. Papa; P.E. Pepe; L. Quan; D. Szpilman; J.G. Wigginton; J.H. Modell. Recommended Guidelines for Uniform Reporting of Data From Drowning: The "Utstein Style". *Circulation*. 108: 2565-2574 (2003).
- [3] A.J. Peabody. Forensic science and diatoms. In: J.P. Smol; E.F. Stoermer. *The diatoms: Applications for the environmental and earth sciences*. Cambridge University Press (1999).
- [4] M.H.A. Piette; E.A. De Letter. Drowning: still a difficult autopsy diagnosis. *Forensic Sci Int*. 163(1): 1-9 (2006).
- [5] B. Ludes; M. Coste. Diatomées et médecine légale: Applications de la recherche des diatomées au diagnostique de la submersion vitale. *Tec & Doc (Lavoisier): France* (1996).
- [6] B. Ludes; M. Coste; A. Tracqui; P. Mangin. Continuous river monitoring of the diatoms in the diagnosis of drowning. *J Forensic Sci*. 41(3): 425-428 (1996).
- [7] B. Ludes; M. Coste; N. North; S. Doray; A. Tracqui; P. Kintz. Diatom analysis in victim's tissues as an indicator of the site of drowning. *Int J Legal Med*. 112(3): 163-166 (1999).
- [8] M. Ming; X. Meng; E. Wang. Evaluation of four digestive methods for extracting diatom. *Forensic Sci Int*. 170(1): 29-34 (2007).
- [9] M.S. Pollanen; C. Cheung; D.A. Chiasson. The diagnostic value of the diatom test for drowning, I. Utility: A retrospective analysis of 771 cases of drowning in Ontario, Canada. *J Forensic Sci*. 42(2): 281-285 (1997).
- [10] M.S. Pollanen; C. Cheung; D.A. Chiasson. The diagnostic value of the diatom test for drowning, II. Validity: Analysis of diatom in bone marrow and drowning medium. *J Forensic Sci*. 42(2): 286-290 (1997).
- [11] J. Hürlimann; P. Feer; F. Elber; K. Niederberger; R. Dirnhofer; D. Wyler. Diatom detection in the diagnosis of death by drowning. *Int J Legal Med*. 114(1-2): 6-14 (2000).
- [12] M. Kane; T. Fukunaga; H. Maeda; K. Nishi. The detection of picoplankton 16S rDNA in case of drowning. *Int J Legal Med*. 108(6): 323-326 (1996).
- [13] M. Kane; Y. Yamamoto; I. Ushiyama; A. Nishimura; K. Nishi, K. Phylogenetic analysis of picoplankton in lake Biwa and application to legal medicine. *Electrophoresis*. 21(2): 351-354 (2000).
- [14] S. Abe; M. Suto; H. Nakamura; H. Gunji; K. Hiraiwa; T. Suzuki; T. Itoh; H. Kochi; G. Hoshiai. A novel PCR method for identifying in cases of death by drowning. *Med Sci Law*. 43(1): 23-30 (2003).
- [15] M. Suto; S. Abe, S; M. Nakamura; T. Suzuki; T. Itoh; H. Kochi; K. Hiraiwa. Detection of phytoplankton genes by PCR. *Res Pract Forens Med*. 44: 79-84 (2001).
- [16] M. Suto; S. Abe, S; M. Nakamura; T. Suzuki; T. Itoh; H. Kochi; K. Hiraiwa. Detection of phytoplankton genes by PCR from human tissue. *Res Pract Forens Med*. 45: 93-98 (2002).
- [17] M. Suto; S. Abe, S; M. Nakamura; T. Suzuki; T. Itoh; H. Kochi; K. Hiraiwa. Phytoplankton gene detection in drowned rabbits. *Legal Medicine*. 5: 142-144 (2003).
- [18] F. He; D. Huang; L. Liu; X. Shu; H. Yin; X. Li. A novel PCR-DGGE-based method for identifying plankton 16S rDNA for the diagnosis of drowning. *Forensic Sci Int*. 176(2-3): 152-156 (2008).
- [19] G. Muyzer; E.C. de Waal; A.G. Uitterlinden. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol*. 59(3): 695-700 (1993).
- [20] D. DiMaio; V.J.M. DiMaio. *Forensic pathology*. 2. ed. CRC Press, Boca Raton (2001).
- [21] S. Krstic; A. Duma; B. Janevska; Z. Levkov; K. Nikolova; M. Noveska. Diatoms in forensic expertise of drowning – a Macedonian experience. *Forensic Sci Int*. 127(3): 198-203 (2002).
- [22] D. Dolinak; E. Matshes; E.O. Lew. *Forensic Pathology: principles and practice*. 2. ed. Elsevier/Academic Press (2005).
- [23] S.A. Papadodima; S.A. Athanasis; E. Skliros; C.A. Spiliopoulou. Forensic investigation of submersion deaths. *Int J Clin Pract*. 64(1): 75-83 (2009).
- [24] Y. Li; C. Hu; C.X. Wang; X. Wang. Development of can for destruction of organic material in use for forensic diatom examination. *Forensic Sci. Int*. 101(3): 163-166 (1999).
- [25] B. Ludes; S. Quantin; M. Coste; P. Mangin. Application of a simple enzymatic digestion method for diatom detection in the diagnosis of drowning in putrefied corpses by diatom analysis. *Int J Legal Med*. 107(1): 37-41 (1994).

- [26] L. Sidari; N. Di Nunno; F. Constantinides. Diatom test with Solueno-350 to diagnose drowning in sea water. *Forensic Sci Int.* 103(1): 61-5 (1999).
- [27] A. Auer. Qualitative diatom analysis as a tool to diagnose drowning. *Am J Forensic Med Pathol.* 12(3): 213-218 (1991).
- [28] S.C. Rodrigues; L. Torgan; A. Schwarzbald. Composição e variação sazonal da riqueza do fitoplâncton na foz de rios do delta do Jacuí, RS, Brasil. *Acta Bot Bras.* 21(3): 707-721 (2007).
- [29] K. Ago; T. Hayashi; M. Ago; M. Ogata. The number of diatoms recovered from the lungs and other organs in drowning deaths in bathwater. *Legal Medicine.* 13:186-190 (2011).
- [30] M.S. Pollanen. Diatoms and homicide. *Forensic Sci Int.* 91(1): 29-34 (1998).
- [31] J.V. Pachar; J.M. Cameron. The diagnosis of drowning by the quantitative and qualitative analysis of diatoms. *Med Sci Law.* 33(4): 291-299 (1993).
- [32] M. Yoshimura; M. Yoshida; Y. Okii; T. Tokiyasu; T. Watabiki; A. Akane. Detection of green algae (Chlorophyceae) for the diagnosis of drowning. *Int J Legal Med.* 108(1): 39-42 (1995).
- [33] L.Y. Yen; P.T. Jayaprakash. Prevalence of diatom frustules in non-vegetarian foodstuffs and its implications in interpreting identification of diatom frustules in drowning cases. *Forensic Sci Int.* 170:1-7 (2007).
- [34] K.L. Gruspier; M.S. Pollanen. Limbs found in water: investigation using antropological analysis and the diatom test. *Forensic Sci Int.* 112(1): 1-9 (2000).
- [35] F. Bortolotti; G. Del Balzo; R. Calza; R. Valerio; F. Tagliaro. Testing the specificity of the diatom test: search for false-positives. *Med Sci Law.* 51(1): 7-10 (2011).
- [36] P. Lunetta; A. Miettinen; K. Spilling; A. Sajantila. False-positive diatom test: A real challenge? A post-mortem study using standardized protocols. *Legal Medicine.* 15: 229-234 (2013).
- [37] C. S. Reynolds. *Ecology of phytoplankton.* Cambridge University Press (2006).
- [38] I.M. Suthers; D. Rissik (Eds.). *Plankton: A guide to their ecology and monitoring for water quality.* Csiro Publishing: Australia (2009).
- [39] Q.Y. Yan; Y.H. Yu; W.S. Feng; W.N. Deng; X.H. Song. Genetic diversity of plankton community as depicted by PCR-DGGE fingerprinting and its relation to morphological composition and environmental factors in lake Donghu. *Microb Ecol.* 54(2): 290-297 (2007).
- [40] L. Wu; Y. Yuhe; T. Zhang; W. Feng; X. Zhang; W. Li. PCR-DGGE Fingerprinting analysis of plankton communities and its relationship to lake trophic status. *Internat Rev Hydrobiol.* 94(5): 528-541 (2009).
- [41] E.J. Van Hannen; M.P. Van Agterveld; H.J. Gons; H.J. Laanbroek. Revealing genetic diversity of eukaryotic microorganisms in aquatic environments by denaturing gradient gel electrophoresis. *J Phycol.* 34: 206-213 (1998).
- [42] M. Aoyagi; K. Iwadate; K. Fukui; S. Abe; K. Sakai; K. Maebashi; E. Ochiai; M. Nakamura. A novel method for the diagnosis of drowning by detection of *Aeromonas sobria* with PCR method. *Legal Medicine.* 11: 257-259 (2009).
- [43] M. Suto; N. Kato; S. Abe; M. Nakamura; R. Tsuchiya; K. Hiraiwa. PCR detection of bacterial genes provides evidence of death by drowning. *Legal Medicine.* 11: 354-356 (2009).
- [44] N.I. Maidana. El test de diatomeas en el diagnóstico de muerte por sumersión. *Acta Nova.* 6(1-2): 70-81 (2013).
- [45] P.A. Díaz-Palma; A. Alucema; G. Hayashida; N.I. Maidana. Development and standardization of a microalgae test for determining deaths by drowning. *Forensic Sci. Int.* 184: 37-41 (2009).