

RELACIÓN ENTRE LA CONCENTRACIÓN DE ETANOL EN HUMOR VÍTREO Y SANGRE EN AUTOPSIAS REALIZADAS EN LA CIUDAD DE RÍO GALLEGOS, ARGENTINA

RELATIONSHIP BETWEEN ETHANOL CONCENTRATION IN VITREOUS HUMOR AND BLOOD IN AUTOPSIES PERFORMED IN THE CITY OF RÍO GALLEGOS, ARGENTINA

Acuña A. J.
Doctor en Bioquímica.
Coordinador General del Laboratorio Regional de Investigación Forense, Poder
Judicial de la Provincia de Santa Cruz.
Profesor Adjunto de la Facultad Regional Santa Cruz, Universidad Tecnológica
Nacional.
Río Gallegos, Santa Cruz, Argentina

Correspondencia: adrianjacuna@yahoo.com.ar

Resumen: En toxicología forense la matriz más analizada es la sangre, y el etanol una de las sustancias más buscada. En ciertas ocasiones en que la sangre no puede ser estudiada, el humor vítreo suele representar una buena alternativa para la cuantificación de etanol, pudiendo estimarse el grado de alcoholemia a partir de esta determinación. El objetivo del presente trabajo fue determinar el cociente concentración de etanol en humor vítreo (CEHV) respecto de concentración de etanol en sangre (CES), en las autopsias realizadas durante los años 2014 a 2019 de la Morgue Judicial de la ciudad de Río Gallegos, Santa Cruz, Argentina. Con este fin se tomaron muestras de sangre y humor vítreo en 564 autopsias, en las cuales se determinó etanol por extracción con headspace y cuantificación por cromatografía gaseosa. Los datos obtenidos fueron sometidos a estudios estadísticos de regresión lineal y con ellos se calculó la relación entre CEHV y CES, sobre los que se realizó un estudio estadístico descriptivo. Los principales resultados obtenidos demostraron que la relación entre la CEHV y la CES es directa y lineal con un alto grado de correlación, situación que permitiría en un futuro estimar los valores de CES a partir de una determinación de CEHV utilizando para este fin el cociente CEHV/CES calculado. Para el caso de la ciudad de Río Gallegos, este cociente resultó ser de $1,28 \pm 0,09$. El humor vítreo representa una buena alternativa para esta práctica, ya que es una matriz poco expuesta a la contaminación y que tiene la capacidad de mantener su integridad por mayor tiempo comparado con otras muestras de importancia forense.

Palabras clave: etanol, sangre, humor vítreo, autopsia.

Abstract: In forensic toxicology the most used matrix is blood, and ethanol is one of the most sought after substances. On certain occasions when the blood cannot be studied, the vitreous humor tends to represent a good alternative for the quantification of ethanol, and the alcohol level can be estimated from this determination. The objective of this work was to determine the ratio of ethanol concentration in vitreous humor (CEHV) to ethanol concentration in blood (CES), in autopsies carried out during the years 2014 to 2019 at the Judicial Morgue of the city of Río Gallegos, Santa Cruz, Argentine. Samples of blood and vitreous humor were taken in 564 autopsies, in which ethanol was determined by extraction with headspace and quantification by gas chromatography. The data obtained were subjected to statistical linear regression studies and with them the relationship between CEHV and CES was calculated, on which a descriptive statistical study was carried out. The main results obtained showed that the relationship between CEHV and CES is direct and linear with a high degree of correlation, a situation that would allow in the future to estimate CES values from a CEHV determination using the calculated CEHV / CES ratio. In the case of the city of Río Gallegos, the ratio was 1.28 ± 0.09 . Vitreous humor represents a good alternative for this practice, since it is a matrix with little exposure to contamination and it has the ability to maintain its integrity for a longer time compared to other samples of forensic importance.

Keywords: ethanol, blood, vitreous humor, autopsy.

INTRODUCCIÓN

En toxicología forense, la sangre es la muestra más sometida a análisis y la sustancia más frecuentemente encontrada es el etanol (1). En la determinación de etanol en muestras sanguíneas provenientes de cadáveres, el forense deberá evaluar posibles alteraciones de la concentración de este compuesto luego de la muerte, recordando que estas pueden ser pérdidas de etanol por oxidación microbiana, ganancia por fermentación de la glucosa, falta de homogeneidad de la muestra, difusión de etanol a partir del contenido gástrico, putrefacción, calcinación, etc. (2, 3).

En estos casos, puede utilizarse una matriz alternativa para la determinación de etanol. Una de las matrices utilizadas con estos fines es el humor vítreo (1). Esta matriz tiene como ventaja el hecho de ser de naturaleza acuosa y relativamente limpia (4). Anatómicamente se ubica en la periferia del cuerpo, alejada del sistema digestivo, evitando posibles contaminaciones por difusión pasiva del etanol (5), siendo relativamente fácil de obtener.

Cuando el etanol ingresa a nuestro organismo, es sometido a una primera fase de absorción que suele durar de 30 a 60 minutos (6). Luego es sometido a una segunda fase de equilibrio en la que se produce el pico máximo de etanol en sangre, para finalmente ser sometido a una tercera fase de eliminación donde su concentración en sangre comienza a disminuir (7).

Durante la fase de equilibrio, al realizar la cuantificación de etanol en diferentes muestras biológicas, su concentración dependerá de la cantidad de agua de cada una, así como de la presencia de enzimas catalizadoras (8).

Obtener sangre para concretar esta determinación, no causa mayores problemas en personas vivas, pero tiene distinto grado de dificultad en muestras cadavéricas. Esto ocurre cuando el cuerpo se encuentra en estado de putrefacción, calcinado o con severos traumas (7). En estos casos es recomendable la utilización de una muestra alternativa a la sangre, como suele ser el humor vítreo (9).

Existe en la bibliografía disponible diversos trabajos que han establecido la relación del valor de etanol en humor vítreo con respecto al de etanol en sangre, siendo el más registrado el valor de 1,30 (10, 11), que permitiría establecer el valor de alcoholemia a partir de la determinación en humor vítreo (12) en aquellas situaciones en las que no sea posible coleccionar una muestra de sangre a partir del estudio de un cadáver.

El objetivo del presente trabajo fue determinar el cociente concentración de etanol en humor vítreo respecto de concentración de etanol en sangre, en las autopsias realizadas durante los años 2014 a 2019 de la Morgue Judicial de la ciudad de Río Gallegos, Santa Cruz, Argentina.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras

Se tomaron muestras de sangre y de humor vítreo en las 564 autopsias realizadas entre los años 2014 y 2019 en la Morgue Judicial de la ciudad de Río Gallegos, Santa Cruz, Argentina. El humor vítreo fue obtenido de un ojo, aproximadamente 1,5 mL, por punción perpendicular colocándolo en un tubo tipo eppendorff de igual volumen. La sangre fue tomada de la vena femoral, aproximadamente 1,5 mL, con la misma metodología usada para el humor vítreo y utilizando floruro de sodio al 0,1% como conservante (12). Todas las muestras recogidas fueron almacenadas a 4°C hasta el momento de su análisis y se evitó la presencia de cámara de aire dentro del tubo de colección.

Determinación de etanol

La determinación de etanol fue realizada por extracción de tipo headspace acoplada a cromatografía de gases con detección FID (13). Un volumen de 0,5 mL de sangre entera o de humor vítreo fue colocado en un vial de 10 mL al que previamente se le incorporó 100 mg de sulfato de sodio. Como patrón interno de cuantificación se colocaron 0,5 mL de una solución de 1 g/L de n-propanol. El vial se precintó herméticamente con tapón de polipropileno y se agitó vigorosamente por 5 segundos. Los viales fueron incubados por 15 minutos a una temperatura de 60°C y con agitación. La temperatura del loop se mantuvo a 70°C y la de la línea de transferencia a 80°C. Transcurrido el tiempo de incubación, el vial se presurizó con gas nitrógeno a 14 psi. El volumen del loop utilizado fue de 1 mL y fue llenado durante 0,15 minutos para finalmente inyectar 1 mL en 0,5 minutos. Durante la realización de la corrida cromatográfica se utilizó la columna capilar ALC1 (30m x 320µm x 1,8µm) con gas nitrógeno como carrier a un flujo de 5,55 mL/min. El modo de inyección fue split con una relación 10:1, con una temperatura del inlets de 250°C. La temperatura del horno se mantuvo

constante a 35°C durante los 3,5 minutos que duró la corrida cromatográfica. La temperatura del detector fue de 300°C con un flujo de hidrógeno de 30 mL/min y de aire de 400 mL/min y un flujo de gas makeup (nitrógeno) de 25 mL/min.

Análisis estadísticos

Los datos de concentración de etanol en sangre (CES) y concentración de etanol en humor vítreo (CEHV) se estudiaron mediante un análisis de regresión lineal simple para establecer la relación entre ellos. Con estos datos se calculó el índice concentración de etanol en humor vítreo respecto de concentración de etanol en sangre (CEHV/CES) y estos fueron estudiados mediante un análisis estadístico descriptivo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las muestras obtenidas de 6 autopsias fueron descartadas ya que no pudo ser realizada la cuantificación de etanol en ambas muestras de interés. Esto fue debido a la putrefacción de las muestras de sangre o a su coagulación, o a la escasa cantidad de humor vítreo obtenido. Por otro lado, los resultados obtenidos de 18 autopsias fueron descartados porque el cociente CEHV/CES fue indicativo de que la muerte ocurrió en momentos de absorción de etanol, es decir fue menor de 1,05.

En 422 autopsias no se detectó etanol en ambas muestras estudiadas (75%). Solo en tres casos se observó un resultado positivo en una de las muestras y negativo en la otra, siendo el valor obtenido en la muestra positiva muy cercano al límite de cuantificación de la técnica (0,1 g/L).

En 118 autopsias (21%) se pudo cuantificar etanol en ambas matrices de estudio. Estas muestras fueron incluidas en los estudios estadísticos para el cálculo del índice CEHV/CES. Este porcentaje de positividad de etanol en las muestras colectadas en la ciudad de Río Gallegos, fue inferior a lo reportado por Almeida- González *et al.* en 2019 (14) para España, los cuales reportaron un porcentaje de positividad de esta sustancia de aproximadamente un 32% a partir del estudio de 277 autopsias.

En la Tabla 1 se muestran los resultados estadísticos realizados entre las dos variables de estudio, CES y CEHV. El coeficiente de correlación múltiple encontrado (0,992) indicó que existe una fuerte correlación lineal directa entre ambas variables de estudio, observándose que el ajuste de la ecuación de regresión explica aproximadamente el 98% (R^2 0,984) de los valores presentados, demostrando que la diferencia de los valores de CES observados y los calculados a partir de la recta de regresión es pequeña. Por otro lado, el análisis de la varianza presentado en la Tabla 1 indicó que el modelo lineal encontrado entre ambas variables de estudio proporciona un buen ajuste para los datos ($p < 0,005$). Thelander *et al.* en 2020 (15) estudiaron la relación entre estas matrices respecto de la concentración de etanol, estableciendo que la misma fue muy alta con un R^2 de 0,97 a partir de 134 autopsias realizadas.

Estadística de regresión		Análisis de la varianza	
Coef. de correlación múltiple	0,992	Estadístico F	6893,31
Coef. de determinación R^2	0,984	Probabilidad	2,29E-100
R^2 ajustado	0,984	$F_{(1 \text{ y } n-2)}$ tabla	4,45
Error típico	0,109		
Ecuación general de regresión lineal			
Pendiente	0,826	Ordenada al origen	-0,067
Estadístico t	83,03	Límite inferior 95%	-0,112
Probabilidad	2,29E-100	Límite superior 95%	0,082
$t_{,99 (n-2)}$ tabla	2,57		
Límite inferior 95%	0,806		
Límite superior 95%	0,845		

Tabla 1. Parámetros de regresión obtenidos a partir de correlacionar los valores de concentración de etanol en humor vítreo y sangre de muestras obtenidas de 118 autopsias.

En la Tabla 1 se presentan los datos obtenidos de la ecuación general de regresión lineal encontrada para las dos variables, que se presenta gráficamente en el Figura 1A, y que queda conformada de la siguiente forma:

$$\text{CES}(g/L) = 0,829 \text{ CEHV}(g/L) - 0,067$$

El valor de la pendiente encontrada fue positiva (0,829) lo que indicó que la relación entre CEHV y CES es de tipo lineal y directa, observándose que el intervalo de confianza para este valor fue entre 0,806 y 0,845 demostrando este análisis que la pendiente de la recta de regresión verdadera es diferente de cero con una probabilidad menor de 0,005. Finalmente, la ordenada al origen encontrada (-0,067) nos ayuda a interpretar si existe error sistemático, descartándose esta situación ya que el intervalo en el que se encontró su valor está comprendido entre -0,112 y 0,082, demostrando que el valor cero se encuentra comprendido en el mismo. Por otro lado, la Figura 1B muestra que los residuos encontrados se distribuyeron de forma aleatoria, evidenciando que no se muestra ningún tipo de tendencia. Savini *et al.* en 2020 (12) desarrollaron un estudio similar al aquí presentado, demostrando a partir del cálculo del coeficiente de correlación y de la ecuación de la recta correspondiente, que ambas variables se ajustan a un modelo de regresión lineal positiva con un R^2 de 0,92. Este análisis estadístico realizado por los autores, mostró una fuerte correlación entre CES y CEHV, estando esto de acuerdo con los datos obtenidos en las autopsias estudiadas en el presente trabajo.

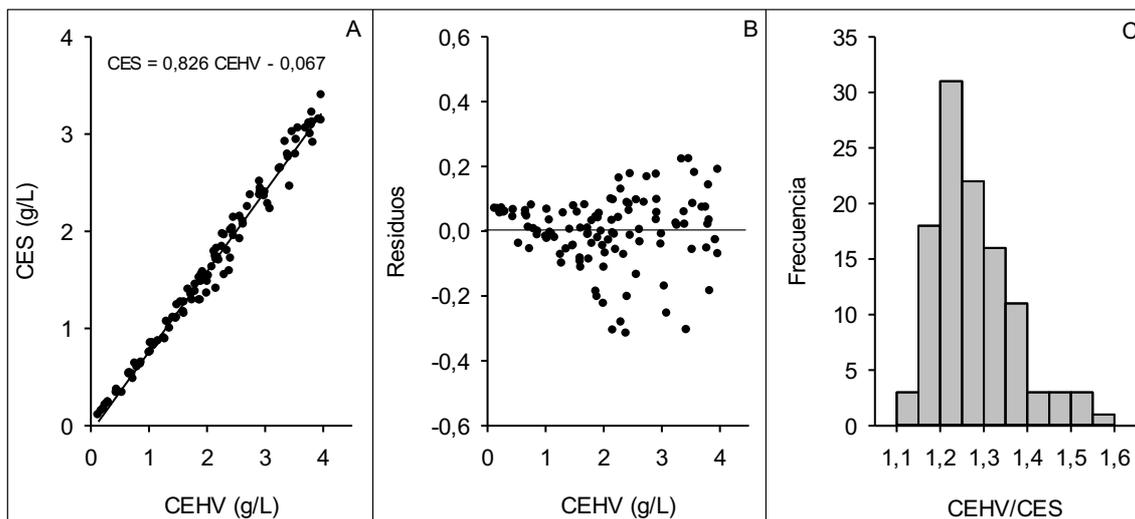


Figura 1. Diferentes cálculos estadísticos realizados con los resultados obtenidos de concentración de etanol en humor vítreo (CEHV) y sangre (CES). La figura A representa la ecuación de regresión obtenida entre ambas variables, la figura B la distribución de los residuos y la figura C la distribución de la frecuencia de cada valor de CEHV/CES calculados.

En la Tabla 2 se presentan los valores encontrados de estadística descriptiva luego de someter a los resultados del coeficiente CEHV/CES de las 118 autopsias estudiadas. Se pudo determinar que el valor promedio de este coeficiente fue de $1,28 \pm 0,09$ con un valor central del conjunto de datos evaluados de 1,26 y un valor de mayor frecuencia de 1,25. Este valor de CEHV/CES es concordante con lo observado por otros autores, que encontraron en estudios similares valores de este índice de 1,17 (16), 1,19 (17) y 1,28 (12). La curtosis calculada demostró ser mayor de cero, lo cual indicó un elevado grado de concentración de los valores adquiridos por el coeficiente CEHV/CES alrededor de los valores centrales de la variable. El coeficiente de asimetría de Fisher encontrado también fue mayor de cero, indicando una distribución asimétrica positiva de los valores del coeficiente calculado, existiendo de esta manera una mayor concentración de valores a la izquierda de la media que a su derecha (Fig. 1C).

Parámetro	Valor
Media	1,28
Mediana	1,26
Moda	1,25

Desviación estándar	0,09
Curtosis	1,05
Coef. de asimetría (Fisher)	1,08

Tabla 2. Parámetros de estadística descriptiva obtenidos a partir del análisis de los valores de CEHV/CES obtenidos.

Debido a su solubilidad y bajo peso molecular, el etanol se absorbe y distribuye rápidamente en todos los tejidos y líquidos corporales de acuerdo con el contenido de agua de los diferentes compartimentos (6). El humor vítreo tiene un contenido de agua de 98,7% frente al 80,0% observado en la sangre (5). Por esta razón, la CEHV suele ser un 10-20% más alta que la CES, situación que se vio refleja en el índice CEHV/CES calculado que fue mayor de uno. Sin embargo, diferentes razones podrían influir en la CES, principalmente se debe considerar la producción post-mortem de etanol. Esta producción post-mortem depende de diferentes factores como la temperatura, el intervalo post-mortem, la especie de microorganismos contaminantes y el trauma al haya sido sometido el cuerpo (18). La CEHV no se ve influenciada por la formación de alcohol durante el proceso de putrefacción y permanece estable después de la muerte durante un período de tiempo más prolongado. Generalmente, el cuerpo humano, y en particular el humor vítreo, es un entorno estéril (19). Después de la muerte, las bacterias del tracto gastrointestinal, pulmón, cavidad oral, áreas infectadas del cuerpo o del medio ambiente pueden invadir los tejidos y los fluidos circulantes y esta difusión se acentúa por la putrefacción. En algunas áreas, como la que contiene el humor vítreo, la descomposición ocurre más lentamente, por lo que las muestras de este sitio mantienen su integridad por más tiempo (18, 20). Un estudio previo realizado por Harper en 1989 (21), demostró que las muestras de humor vítreo rara vez contienen una gran cantidad de bacterias u hongos, lo que hace que esta muestra sea menos susceptible a los cambios en la concentración de este tipo de compuestos, proponiendo que esto ocurre debido a la baja vascularización del humor vítreo que dificulta la colonización microbiana del ojo. Esto hace que en toxicología forense, el humor vítreo sea una matriz alternativa útil porque está relativamente aislada de otros compartimentos/fluidos corporales debido a esta vascularización limitada, estando así el humor vítreo protegido de la contaminación bacteriana por la barrera hemato-retiniana ya que esta limita la secreción, difusión y filtración de materiales en esta cavidad (4, 22). Después de la muerte, estos procesos activos a través de la barrera hemato-retiniana disminuyen gradualmente hasta cesar; sin embargo, la composición del humor vítreo se conserva durante más tiempo que otros fluidos corporales de importancia forense (sangre, orina, tejido, etc.) (19) y, por esta razón, la recolección y análisis de este fluido es particularmente útil y de aceptación para la determinación de etanol.

De todo lo expuesto, se puede concluir que la relación entre la CEHV y la CES es directa y lineal con un alto grado de correlación, situación que permitiría en un futuro estimar los valores de CES a partir de una determinación de CEHV utilizando para este fin el cociente calculado CEHV/CES. Para el caso de la ciudad de Río Gallegos, este cociente resultó ser de $1,28 \pm 0,09$, valor que debería ser calculado en los diferentes laboratorio destinados a la cuantificación de etanol en matrices biológicas, ya que el mismo puede verse influenciado por diferentes factores inherentes a la determinación analítica, como ser la forma de recolección y conservación de las muestras y la metodología de análisis empleada (23). El humor vítreo representa una buena alternativa para esta práctica, ya que es una matriz poco expuesta a la contaminación y que tiene la capacidad de mantener su integridad por mayor tiempo comparado con otras muestras de importancia forense.

BIBLIOGRAFÍA

1. Ioan BG, Jitaru V, Damian R, Damian SI. Study on the relationship between the concentration of ethanol in the blood, urine and the vitreous humour. Romanian Journal of Legal Medicine. 2015; 23: 211-216.

2. Vezzoli S, Bernini M, De Ferrari F. Ethyl glucuronide in vitreous humor and blood postmortem specimens: Analysis by liquid chromatography electrospray tandem mass spectrometry and interpreting results of neo-formation of ethanol. *Annali dell'Istituto Superiore di Sanità*. 2015; 51: 19-27.
3. Kugelberg FC, Jones AW. Interpreting results of ethanol analysis in postmortem specimens: A review of the literature. *Forensic Science International*. 2007; 165: 10-29.
4. Bévalot F, Cartiser N, Bottinelli C, Fanton L, Guitton J. Vitreous humor analysis for the detection of xenobiotics in forensic toxicology: a review. *Forensic Toxicology*. 2016; 34: 12-40.
5. Metushi IG, Fitzgerald RL, McIntyre IM. Assessment and comparison of vitreous humor as an alternative matrix for forensic toxicology screening by GC-MS. *Journal of Analytical Toxicology*. 2016; 40: 243-247.
6. Holford NHG. Clinical pharmacokinetics of ethanol. *Clinical Pharmacokinetics*. 1987; 13: 273-292.
7. Ferrari L. Análisis toxicológico de etanol y su interpretación forense. Cálculos retrospectivos, pérdida o generación en tejidos humanos e indicadores biológicos de ingesta. Breve revisión. *Ciencia Forense Latinoamericana*. 2008; 2: 20-35.
8. Jones AW, Hahn RG, Stalberg HP. Distribution of ethanol and water between plasma and whole blood; inter- and intra-individual variations after administration of ethanol by intravenous infusion. *Scandinavian Journal of Clinical & Laboratory Investigation*. 1990; 50: 775-780.
9. Costilla García EL, Mejía Sutti AM. Determinación por cromatografía de gases, el valor del cociente: etanol en humor vitreo/sangre en cadáveres necropsiados de la Morgue del Cusco. *Horizonte Médico*. 2014; 14: 34-38.
10. Szeremeta M, Mironiuk E, Janica M, Drobuliakova P, Lomperta K, Szczypek M, Niemcunowicz-Janica A. Vitreous humour as an alternative material for the determination of alcohol concentration in human corpses. *Archiwum medycyny sądowej i kryminologii*. 2018; 68: 108-118.
11. Honey D, Caylor C, Luthi R, Kerrigan S. Comparative alcohol concentrations in blood and vitreous fluid with illustrative case studies. *Journal of Analytical Toxicology*. 2005; 29: 365-369.
12. Savini F, Tartaglia A, Coccia L, Palestini D, D'Ovidio C, de Grazia U, Merone GM, Bassotti E, Locatelli M. Ethanol determination in post-mortem samples: correlation between blood and vitreous humor concentration. *Molecules*. 2020; 25: 2724.
13. Watts MT, McDonald OL. The effect of biologic specimen type on the gas chromatographic headspace analysis of ethanol and other volatile compounds. *American Journal of Clinical Pathology*. 1987; 87: 79-85.
14. Almeida-González M, Luzardo OP, Boada LD, Zaragoza E, Meilán MJ, Zumbado M, Henríquez-Hernández LA. Ethanol levels in legally autopsied subjects (2016–2017): Update of data and epidemiological implications in relation to violent deaths in Canary Islands (Spain). *Journal of Forensic and Legal Medicine*. 2019; 68: 101868.
15. Thelander G, Kugelberg FC, Jones AW. High correlation between ethanol concentrations in post-mortem femoral blood and in alternative biological specimens, but large uncertainty when the linear regression model was used for prediction in individual cases. *Journal of Analytical Toxicology*. 2020; 44: 415-421.
16. Kintz P, Tracqui A, Mangin P. Toxicological investigations on unusual materials (hair and vitreous humor): interest and limitations. *Archives of toxicology. Supplement*. 1992; 15: 282-285.
17. Jones AW, Holmgren P. Uncertainty in estimating blood ethanol concentrations by analysis of vitreous humour. *Journal of Clinical Pathology*. 2001; 54: 699-702.
18. Butzbach DM. The influence of putrefaction and sample storage on post-mortem toxicology results. *Forensic Science, Medicine and Pathology*. 2010; 6: 35-45.
19. Pigaiani N, Bertaso A, De Palo EF, Bortolotti F, Tagliaro F. Vitreous humor endogenous compounds analysis for post-mortem forensic investigation. *Forensic Science International*. 2020; 310: 110235.
20. Belsey SL, Flanagan RJ. Postmortem biochemistry: current applications. *Journal of Forensic and Legal Medicine*. 2016; 41: 49-57.
21. Harper DR. A comparative study of the microbiological contamination of postmortem blood and vitreous humour samples taken for ethanol determination. *Forensic Science International*. 1989; 43: 37-44.

22. Goel M, Picciani RG, Lee RK, Bhattacharya SK. Aqueous humor dynamics: a review. *Open Ophthalmology Journal*. 2010; 4: 52-59.
23. Jones AW. Are changes in blood-ethanol concentration during storage analytically significant? Importance of method imprecision. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. 2007; 45: 1299-1304.