



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

**Utilidad Forense del Humor Vítreo Post Mortem en
la Determinación de Alcohol Etílico**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

P R E S E N T A :

JOSÉ LUIS OSORIO DÍAZ

DIRECTOR:

M en C. RODOLFO CARREÓN SÁNCHEZ

ASESOR:

Dr. NICOLÁS NORIEGA RAMOS



México, D.F.

2004



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS

A DIOS, tú que en silencio me has acompañado a lo largo de mi vida, y sin pedirme nada a cambio hoy me regalas la alegría de ver realizado uno más de mis sueños.

A MIS PADRES, infinitamente agradezco a ustedes que siempre velaron por mí desde niño y que me impulsaron a seguir siempre adelante aún cuando hubo algunas dudas y tropiezos. Hoy también gracias a ustedes me lleno de orgullo al dedicarles esta realidad tan hermosa que me han permitido alcanzar: "mi formación profesional".

A MIS HERMANOS, que han compartido conmigo tristezas y alegrías, fracasos y triunfos, y que en cada momento han sido una fuente inagotable de apoyo, cariño, cuidado y comprensión.

A LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO, y en particular a la FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA, fuente de conocimiento invaluable, origen de hombres comprometidos en ciencia, conciencia humana y científica. Institución de la que me siento orgulloso de pertenecer, y a quien debo mi formación profesional.

A MIS MAESTROS, a quienes agradezco la formación profesional que tuvieron a bien brindarme, y en particular al M en C. Rodolfo Carreón Sánchez, que fue un apoyo indiscutible para llevar a término el presente trabajo.

AL HONORABLE JURADO: Q. Ma. Teresa Mendoza Mata, Dr. Nicolás Noriega Ramos, M en C. Rodolfo Carreón Sánchez, Q.F.I. Ma. del Carmen Niño de Rivera Oyarzabal y a la Q.F.B. Carina Gutiérrez Iglesias, a quien agradezco las atenciones otorgadas.

AL SERVICIO MÉDICO FORENSE, y en particular a sus titulares Dr. Felipe Edmundo Takajashi Medina, Dr. Susano Macario Pompeyo y al Dr. Armando Luna Rosas, quienes representan a la Institución que me ha visto crecer en el aspecto laboral y profesional, a quienes debo ante todo el respaldo y la motivación brindados a lo largo del tiempo, misma que me ha permitido favorablemente llevar a término mi formación profesional, y a quienes espero nunca defraudar.

Asimismo, a la Dra. Maria Elena Piña Flores, quien posee una calidad humana y profesional extraordinaria, que ha sido fuente de conocimiento inagotable y en quien he tomado el ejemplo de profesionalismo y apoyo mutuo, a quien agradezco profundamente la orientación y la motivación que en los momentos difíciles me ha brindado y a quien le reitero el compromiso de seguir siempre adelante.

No en menor medida agradezco al Dr. Jaime Olicón Hernández, Dr. José Paz Osornio Rivera, Dr. Edgar Arenas Castillo, Dr. Fernando Vázquez Resendiz, Dra. Fabiola Gutiérrez Sánchez, perito en dactiloscopia Jorge Cuevas Vega, Antropólogo Forense Daniel Trejo López, y a los Licenciados; Roberto Quezada Lira y Patricia Ortega Moscoso, el apoyo y la confianza que en mí han depositado siempre.

A LOS PERITOS EN QUÍMICA FORENSE, Adrián Waldo Capetillo, Emilio González Saucedo y Ernesto Bernal, a quienes agradezco su amistad y la colaboración, la paciencia y el apoyo brindado en el desarrollo del presente trabajo.

A MIS AMIGOS Y AMIGAS, que siempre han estado ahí, acompañándome y brindándome siempre su amistad, contribuyendo enormemente a mi formación profesional, y en especial a Larrid, Julio, Arturo, Daniel, Joven, Antonio, Sergio, César, Alberto, Guillermo, Eduardo, Gabriel, Alejandro, Rigoberto, Salvador, Jorge, Javier, Fabián, Carlos, Manuel, Laura, Iris Esmeralda, Jenny, Rosa, Alva, Jessica, Claudia, Valentina, Esmeralda, Mónica, Haydee, Adriana, Violeta, Marisol, Sandra, Natalia, Leticia, Miriam, Gabriela, Ana, Donashii, Roxana, Martha, Denisse, Elizabeth, Sayeli, Sofia, Raquel, Maribel, Erika, Rocío, Lilitiana e Hilida.

Í N D I C E

1.-	Resumen.....	3
2.-	Introducción.....	4
3.-	Marco Teórico.....	
	3.1 Historia del Humor Vítreo.....	5
	3.2 Estructura del ojo.....	12
	3.3 Constitución del Humor Vítreo.....	13
	3.3 Obtención de la Muestra.....	18
	3.4 Manejo de la Muestra.....	18
	3.5 Precauciones.....	19
	3.6 Métodos Analíticos.....	20
4.-	Objetivos.....	27
5.-	Importancia del Estudio.....	28
6.-	Análisis de Resultados.....	30
7.-	Conclusiones.....	58
8.-	Referencias Bibliográficas.....	60

1.- Resumen

El humor vítreo es una parte anatómica del ojo en estado líquido, de aspecto cristalino, hialino; se encuentra detrás del cristalino, en la cámara posterior del ojo; es fácil de obtener para su análisis, se obtiene por aspiración directa de cada uno de los ojos con jeringa.

Por su importancia ha sido objeto de múltiples estudios de interés forense, como: a) determinar el tiempo de evolución postmortem, el cual es denominado intervalo postmortem (IPM); y b) se ha empleado para determinar las concentraciones de alcohol a través de las técnicas; reducción del dicromato de potasio (Microdifusión), con la enzima alcohol deshidrogenasa (ADH), cromatografía de gases (CG), cromatografía de gases con el sistema de espacio de cabeza (CG-Head-Space), Micro extracción en fase sólida (MEFS) y con tira de alcoscán.

En 1966, se hace por primera vez la cuantificación de alcohol etílico en humor vítreo y sangre, posteriormente se llevaron a cabo diversas publicaciones sobre este tema y en el año 2002 aparece uno de los últimos estudios desde el punto de vista forense, en donde determinan concentraciones de etanol postmortem en humor vítreo y sangre.

En virtud de lo expuesto en el presente trabajo se hace una revisión bibliográfica retrospectiva del año de 1966 al 2002.

2.- Introducción

La sangre es el espécimen que puede ser analizado para determinar la concentración de etanol. Sin embargo, a veces es necesario acudir a otros fluidos del cuerpo si la muestra de sangre no es adecuada.

En este aspecto, existen varias muestras que ayudan a determinar la concentración de dicha sustancia, entre las que se destaca, el humor vítreo. La palabra humor se deriva del latín *humor, humoris*, que quiere decir humedad y vítreo se deriva del latín *vitreus* que quiere decir vidrio o parecido al vidrio.

La ventaja de usar el humor vítreo en la determinación de la concentración de alcohol etílico, es la facilidad con la cual se obtiene y por no estar contaminado, en contraste con la sangre contaminada por lesiones traumáticas ocasionadas por la ruptura de órganos.

El humor vítreo, por lo tanto, juega un papel importante en la resolución de muchos problemas postmortem, por tal motivo, se debe obtener en todos los casos que sean susceptibles.

En este trabajo, se demostrará si el humor vítreo es útil y confiable en la determinación de la concentración de etanol, para propósitos forenses, a través de los trabajos que se han publicado a nivel internacional, con el objeto de tener un panorama más amplio sobre este tema.

El objeto de este trabajo es proporcionar una información confiable sobre el empleo del humor vítreo para el estudio de las concentraciones de etanol y observar si éste se puede utilizar con fines forenses en el futuro en nuestro país.

3.- Marco Teórico

3.1 Historia del Humor Vítreo.

Los estudios sobre humor vítreo se iniciaron con las investigaciones de las propiedades físico-químicas del humor vítreo, de Duke-Elder en 1929.

Davson¹ en 1955, observó en 21 animales la penetración simultánea al humor vítreo de alcohol etílico y de otras sustancias no electrolíticas; además contempló, con la fórmula $(C_{Aq}/C_{Pl}) \times 100$ (Concentración de agua en el fluido / Concentración de agua en plasma), que el alcohol es la sustancia que pasa más rápidamente al ojo, cuando se encuentra ya en equilibrio alrededor de los 30 minutos después de haberse ingerido.

Naumann² en 1959, realizó estudios de interés forense con la investigación química postmortem del humor vítreo.

Sturner y Coumbis³ en 1966, estudiaron humor vítreo de uno o ambos ojos y de sangre, de 70 casos de autopsia para comparar los niveles de alcohol etílico en estos dos tipos de especímenes.

Leahy y col.,⁴ en 1968, llevaron a cabo en 20 de 40 casos, la cuantificación postmortem de alcohol etílico en humor vítreo y sangre.

Felby y Olsen⁵ en 1969, realizaron un estudio comparativo postmortem de alcohol etílico en músculo, sangre y humor vítreo de 31 cadáveres.

Coe y Sherman⁶ en 1970, efectuaron un estudio comparativo postmortem, para determinar la concentración de alcohol etílico en humor vítreo y sangre.

Olsen⁷ en 1971, estudió un conejo albino, para conocer la velocidad de penetración del alcohol etílico al humor vítreo.

Norheim⁸ en 1972, elaboró un estudio para realizar una determinación simultánea de alcohol en humor vítreo y sangre, de 73 cuerpos con un contenido de alcohol en sangre por arriba de 200 mg/100 mL.

Coe⁹ en 1976, observó el efecto del embalsamamiento de un cadáver, sobre el humor vítreo de 35 cuerpos humanos postmortem; en principio, el autor antes de embalsamar el cuerpo tomó muestras de humor vítreo del ojo derecho; posteriormente, mucho tiempo después de haber embalsamado el cadáver obtuvo muestras de humor vítreo del ojo izquierdo, con el fin de comparar las concentraciones de electrolitos, glucosa y etanol.

Winek y Esposito¹⁰ en 1981, para comparar las concentraciones de etanol en humor vítreo, sangre, médula ósea, bilis y orina, emplearon el análisis por cromatografía de gases.

Clark y Jones¹¹ en 1982, estudiaron humor vítreo y sangre de 26 cadáveres intactos, de cuatro horas de fallecidos y en refrigeración, para ver si era posible la síntesis de etanol, por acción de las bacterias sobre la glucosa de la sangre de estos cadáveres, a lo cual observaron que, el alcohol no se detecta en el humor vítreo ni en la sangre; ningún caso mostró un valor de etanol en humor vítreo o sangre mayor de 10 mg/dL^a y los valores de etanol fueron de menos de 10 mg/dL en 13 casos con resultados de cultivo negativo. Estos datos sugirieron a los autores, que los cuerpos intactos no producen etanol por el metabolismo microbiano, la detección de etanol bajo tales condiciones indicó a los autores, que se consumió en vida poco antes del fallecimiento.

Zumwalt y Bost¹² en 1982, realizaron un estudio de humor vítreo, líquido cerebroespinal, bilis y orina de 130 cuerpos putrefactos, para establecer si el alcohol encontrado en estos especímenes se originaba de manera exógena o endógena.

Budd¹³ en 1982, hizo un estudio para determinar la existencia de variaciones que pudieran presentarse en la relación alcohol sangre / fluido.

Caughlin¹⁴ en 1983, elaboró un análisis por duplicado de muestras de humor vítreo y sangre de 43 cadáveres autopsiados, para determinar la relación y distribución del alcohol en el humor vítreo.

^a Cuando se indique mg/dL ó g/dL equivaldrá a mg/100 mL ó g/100 mL.

Stone y Rooney¹⁵ en 1984, concluyeron en un periodo de dos años, un estudio postmortem sobre la concentración de alcohol en muestras de humor vítreo, sangre, bilis y orina, no contaminadas ni putrefactas, cuidadosamente obtenidas y almacenadas a 4 °C.

Jollymore y col.,¹⁶ en 1984, produjeron un estudio con muestras de humor vítreo y sangre, obtenidas de 43 autopsias de casos médico-legales, llevadas a cabo dentro de las 72 horas del fallecimiento, para determinar la relación de alcohol sangre / humor vítreo, en base a un caso disponible y reproducir los datos del trabajo de Caughlin de 1983, prestando apoyo a su evidencia a través de una distribución bimodal de relaciones, ya sea en fase de absorción o de eliminación.

Neil y col.,¹⁷ en 1985, prepararon un estudio, para: 1) examinar sus propios datos, 2) determinar la distribución de las relaciones alcohol sangre / fluidos, y 3) valorar si estos datos estaban de acuerdo con los patrones fisiológicos explicables. Para su estudio revisaron 128 casos de autopsia, de los cuales obtuvieron muestras de humor vítreo, sangre y orina.

Watts y Mc Donald¹⁸ en 1987, examinaron diferentes tipos de especímenes, como, humor vítreo, sangre, plasma, suero y orina; observando que, producían moldes obstructivos en el head-space (sistema de espacio de cabeza) del cromatógrafo de gases cuando analizaban etanol y otros compuestos volátiles, por lo que para evitar esta complicación introdujeron agua.

Harper¹⁹ en 1989, hizo estudios microbiológicos con especímenes de 51 cadáveres, de uno a cinco días de fallecidos y encontró que ninguna de las muestras de humor vítreo tuvo números grandes de bacterias, y solo una desarrolló hongos.

Yip y Shum²⁰ en 1990, elaboraron un estudio sobre la correlación entre los niveles de alcohol en humor vítreo y sangre, en fase de absorción tardía y en fase de eliminación; seleccionaron los casos de acuerdo a los siguientes criterios: 1) muestras con mínimos cambios de descomposición, 2) niveles de alcohol en sangre por encima de 30 mg/dL, 3) muestras adecuadas de humor vítreo y sangre, 4) casos con presencia de otras drogas fueron excluidos.

Penttila y col.,²¹ en 1990, estudiaron 52 muestras de humor vítreo y 41 especímenes de orina procedentes de casos de autopsia de tipo forense, además examinaron muestras de saliva de 1 a 2 mL de individuos conductores de automóviles con sospecha de ebriedad. El estudio lo hicieron con la prueba de la tira de alcoscán.

Caplan y Levine²² en 1990, emplearon para su estudio un total de 347 casos, con etanol positivo en sangre y se propusieron tres objetivos específicos: 1) determinar la consistencia de las relaciones reportadas, etanol sangre / humor vítreo, 2) determinar el porcentaje de casos, en los cuales, las relaciones de etanol sangre / humor vítreo caen fuera de la variación esperada, 3) determinar la magnitud del etanol que pueda estar asociado con etanol negativo en humor vítreo (menos de 0,01 g/dL). Estos autores elaboraron un resumen de estudios previos e hicieron una comparación de las concentraciones de etanol en sangre con las concentraciones de etanol en humor vítreo.

Marraccini y col.,²³ en 1990, en su estudio de concentraciones de etanol postmortem, midieron las diferencias existentes en las diversas muestras biológicas, entre ellas humor vítreo. Las muestras las obtuvieron de 307 casos de autopsia.

Garriott²⁴ en 1991, comparó en 27 casos de autopsia, las concentraciones de alcohol de humor vítreo, músculo y sangre.

Briglia y col.,²⁵ en 1992, estudiaron muestras de humor vítreo y sangre de diferentes sitios, de 61 casos de autopsia, por cromatografía de gases, para determinar las diferencias existentes entre estos dos tipos de especímenes. Dichos autores para su estudio, establecieron ciertos criterios para la selección de los casos, como la presencia de etanol en sangre de 0,05% (50 mg/dL) ó más, ausencia de traumas en el cuerpo, y ausencia de cambios importantes de descomposición.

Levine y Caplan²⁶ en 1993, obtuvieron sangre, humor vítreo y orina en 381 casos de autopsia, para interpretar las bajas concentraciones de etanol en sangre postmortem, y estudiaron por un periodo de dos años todos los especímenes de sangre con una concentración de alcohol en sangre entre 0,01 y 0,04 g/dL.

Canfield y col.,²⁷ en 1993, determinaron la presencia o ausencia de etanol postmortem en 975 víctimas de accidentes aéreos. Tomaron muestras de sangre, humor vítreo, orina y las enviaron al laboratorio toxicológico; la determinación de etanol y otras sustancias volátiles la hicieron con un cromatógrafo de gases con head-space. Todos los casos con una concentración de etanol en sangre igual o mayor a 0,04% (40 mg/dL) los consideraron positivos.

Pounder y Kuroda²⁸ en 1994, emprendieron un análisis retrospectivo de 349 casos y compararon sus resultados con publicaciones previas, para poner en claro, si el valor pronóstico de la concentración de alcohol en humor vítreo funcionaba para calcular la concentración de alcohol en sangre.

Yip²⁹ en 1995, en carta al editor, hizo un comentario con respecto al trabajo experimental de Pounder y Kuroda,²⁸ sobre la relación de los niveles de alcohol en humor vítreo y sangre, en la cual expresó que: Ellos acordaron que los niveles de alcohol en humor vítreo son de valor limitado en la mayoría de las circunstancias y que los niveles de alcohol en humor vítreo son útiles en casos dónde la sangre está contaminada o no está disponible.

Kraut³⁰ en 1995, con su experiencia de más de 350 casos, la primera propuesta que hizo en un caso típico, fue la de una relación de CAHV / CAS (concentración de alcohol en humor vítreo / concentración de alcohol en sangre) de 1,1 : 1,5 que empleaba para calcular una concentración de alcohol en sangre a partir de una muestra de humor vítreo aceptable. Esta propuesta la realizó bajo dos suposiciones básicas: 1) que no haya bebidas alcohólicas en cantidades importantes dentro de los 30 minutos del suceso, 2) que el fallecimiento haya ocurrido dentro de los 30 minutos de la ingesta de bebidas alcohólicas. Bajo estos lineamientos, Kraut hizo un análisis basado en la comparación visual con el trabajo de Pounder y Kuroda.²⁸

Pounder y Kuroda³¹ en 1995 aclararon las observaciones hechas por Yip²⁹ y Kraut³⁰ sobre su trabajo, para lo cual intentarían mejorar la predicción de la CAS (concentración de alcohol en sangre) a partir de una CAHV (concentración de alcohol en humor vítreo).

Singer y Jones³² en 1997, realizaron un estudio de un hombre de 48 años de edad con amplio historial de alcoholismo, encontrado muerto en su casa, para determinar las concentraciones de etanol, isopropanol, acetona y acetato en muestras de sangre de vena femoral y de corazón, de especímenes de humor vítreo, orina, bilis, hígado y contenido gástrico.

Lima y Midio³³ en 1999, estudiaron la manera de utilizar el humor vítreo como fluido biológico, para determinar con seguridad el origen de etanol en cuerpos descompuestos. El alcohol fué determinado en humor vítreo, sangre y orina de 27 cuerpos en diferentes estados de putrefacción: 9 casos estaban ligeramente descompuestos, 9 en estado moderado de descomposición y 9 severamente descompuestos.

Engelhart y Jenkins³⁴, en el año 2001 hicieron un estudio para precisar la utilidad del QED (dispositivo detector de alcohol), para determinar los niveles de etanol postmortem en humor vítreo y saliva y en casos dónde se necesita un resultado rápido. El estudio con el dispositivo QED se llevó a cabo en 165 de 171 casos. Los resultados del estudio con el dispositivo QED, se compararon con los resultados del estudio de las mismas muestras llevado a cabo con cromatógrafo de gases con head-space.

Hardin³⁵ en el año 2002 estudió el caso de un masculino de 20 años de edad, encontrado muerto en el lado de pasajeros de un automóvil pequeño, después de un choque con un camión semitrailer. El tiempo que transcurrió entre el fallecimiento y la autopsia fue de 17 horas, 43 minutos. El autor observó en su trabajo que la concentración del etanol en humor vítreo es importante y confiable en casos de toxicología postmortem. Así mismo se puede poner en duda la concentración de etanol en sangre debida al tiempo del fallecimiento, en virtud de que una concentración de alcohol en sangre postmortem se puede afectar por varios factores como son: calidad y sitio de la toma de la muestra, trauma corporal, el tiempo entre fallecimiento y autopsia, la presencia de microorganismos en el cuerpo, difusión de bebidas alcohólicas presentes en el estómago hacia el líquido pericárdico y la difusión de etanol de vómito aspirado hacia la sangre cardiaca. Estos factores pueden causar cambios postmortem sitio-dependientes en la

concentración de alcohol en sangre, haciendo cálculos más difíciles de las concentraciones de etanol en sangre al tiempo del fallecimiento.

Spinosa y Cinira³⁶ en el año 2002, publicaron su trabajo sobre el empleo de la técnica de micro extracción en fase sólida (MEFS) ó SPME (solid phase micro extraction) acoplado al sistema automatizado head-space (HS-SPME) con el empleo de la cromatografía de gases capilar, para la cuantificación de etanol en especímenes postmortem. Esta metodología inicialmente se desarrolló con el empleo de soluciones estándar de acetaldehído, acetona, metanol y etanol. Los autores emplearon el isobutanol como estándar interno, y obtuvieron muestras postmortem de autopsias médico legales, de sangre, orina y humor vítreo; consideraron que, es el primer trabajo publicado con respecto al análisis de alcohol en muestras de humor vítreo con el empleo de la técnica de micro extracción en fase sólida con el sistema automatizado head-space.

3.2 Estructura del ojo.

El cuerpo ó humor vítreo (figura 1) es una parte anatómica del ojo que se extiende de la retina sensorial al cristalino; está unido firmemente a la retina, así como a la ora serrata y al disco óptico; está ocupado por un material geloso (debido a una malla de numerosas fibrillas de *colágena* orientadas al azar) compuesto de *agua* (98-99,7%), *proteínas*, *ácido hialurónico* (glucosaminglucano), concentraciones muy bajas de glucosa (28-89 mg/L, que disminuye de manera imperceptible, después de la muerte), *ácido ascórbico*, *aniones* y *cationes* como sodio (128-158 mEq/L), cloruro (108-142 mEq/L), y potasio (el que se incrementa después de la muerte), *pH* 7-7,8 y de una pequeña población de células denominadas hialocitos que son macrófagos que sintetizan colágena.^{2,37,38,60}

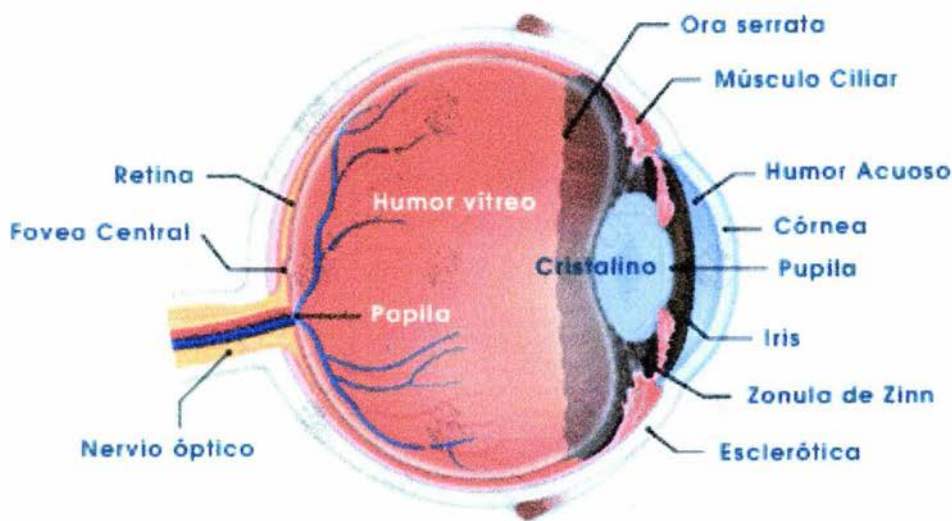


Figura 1. Estructura del ojo humano

3.3 Constitución del Humor Vítreo

El análisis de los cambios químicos del fluido intraocular lo introdujo Naumann² en 1959, quien demostró los rangos de varios componentes en el humor vítreo, entre los que destacan: potasio, sodio y cloruro.

Leahy y Farber³⁷ en 1967, estudiaron la química postmortem del humor vítreo humano y observaron en sus resultados, que la concentración de nitrógeno ureico en humor vítreo (NUV) es estable y no hay una diferencia significativa entre la muestra ante y postmortem (de 5 a 29 mg/100 mL); también contemplaron que la creatinina demostró buena estabilidad en ambas muestras a las 24 horas después de haber fallecido (0,31-1,05 mg/100 mL); así mismo mostraron buena estabilidad de la glucosa a las 29 horas y no encontraron diferencia significativa (28-89 mg/100 mL).

La estabilidad postmortem de la concentración de sodio (128-158 mEq/L) y cloruro (108-142 mEq/L) en humor vítreo notada por Naumann² es reafirmada por Leahy y Farber,³⁷ además observaron que el potasio se eleva conforme pasa el tiempo posterior al fallecimiento.

Cooper y col.,³⁸ encontraron que la concentración de proteínas totales en humor vítreo fue de 40-80 mg% (40-80 mg/100 mL).

Coe^{39,40,41} en 1969, 1972 y 1974, observó en sus investigaciones, para la determinación química de humor vítreo humano que sodio, cloruro, calcio y nitrógeno ureico permanecen totalmente estables por largos períodos después de la muerte (Tabla 1); el nitrógeno muestra en 90% de los casos una variación de menos de 3 mg/dL y solo muestra una ligera disminución en cuerpos refrigerados por encima de 100 h. El potasio en vítreo mostró un incremento importante de modo aritmético a través del tiempo, al menos en las primeras 100 h postmortem. La concentración de glucosa en el humor vítreo de individuos normales tiende a caer después de la muerte.

Tabla 1. Química postmortem del humor vítreo

Intervalo postmortem en horas	1-2,5	3-10	10,5-29
Número de especímenes	60	50	35
<i>Sodio (mEq /L)</i>	143 ± 0,52	143 ± 0,67	141 ± 0,76
<i>Rango</i>	135-151	131-151	131-150
<i>Potasio (mEq /L)</i>	5,6 ± 0,09	6,8 ± 0,15	8,7 ± 0,19
<i>Rango</i>	4,2-7,2	5,1-8,9	6,9-11,5
<i>Cloruro (mEq /L)</i>	121 ± 0,76	119 ± 0,86	118 ± 1,16
<i>Rango</i>	108-132	105-132	104-130
<i>Calcio (mg/100 mL)</i>	6,7 ± 0,05	6,8 ± 0,05	7,0 ± 0,09
<i>Rango</i>	6,0-8,0	6,1-8,0	6,1-8,4
<i>Nitrógeno ureico (mg/100 mL)</i>	17 ± 0,99	17 ± 0,89	18 ± 1,23
<i>Rango</i>	6-40	4-33	3-30
<i>Glucosa (mg/100 mL)</i>	84 ± 5,21	66 ± 5,13	51 ± 4,7
<i>Rango</i>	37-180	27-180	18-106

Coe⁴¹ observó, después de 20 horas del fallecimiento, aumento de la concentración de ácido láctico, de un valor inicial de 80-160 mg/dL a 210-260 mg/dL. Después de 10 horas de la defunción se observó descenso rápido de la concentración de ácido pirúvico de 2-3 mg/dL a 0,1-0,2 mg/dL. Dicho autor observó también que el humor vítreo es el que tiene la más alta concentración de ácido ascórbico en el cuerpo y que disminuye lentamente dentro de las primeras 20 horas del fallecimiento. Contempló que la creatinina y ácido úrico en humor vítreo postmortem, permanecen en niveles normales; así mismo apreció que, la concentración de proteína soluble en humor vítreo es de 40-80 mg/dL en el hombre.

Cooper³⁸ demostró por análisis inmunoquímico del humor vítreo, la presencia de un número considerable de proteínas del suero, encontrando también una proteína en la fracción alfa globulina, en concentraciones tan altas, como en el mismo suero.

Coe⁴¹ observó en humor vítreo humano antígenos no compartidos con el suero; y encontró que, Erdei y Vass⁴² determinaron la presencia de aminoácidos libres en el vítreo por cromatografía de papel, idénticos a los aminoácidos liberados del vítreo por la acción enzimática de la elastasa y observaron la penetración de pequeñas cantidades de bilirrubina en el vítreo.

Coe⁴¹ en su revisión de la literatura observó en 43 individuos ictericos una concentración promedio de bilirrubina en suero de 8,6 mg/L, mientras en el humor vítreo encontró valores de bilirrubina de 0–0,048 mg/dL, con un promedio de 0,04 mg/dL; en cuanto a electrolitos observó que, el sodio fue de 135-151 mEq/L, de cloruro 108 a 142 mEq/L dentro de las 18 horas postmortem, el calcio fue de 6,0-8,4 mg/dL en 9 horas postmortem, el magnesio de 1,5-2,5 mEq/L, el fósforo de 0,1-3,3 mEq/L, el yodo de 5,1-5,9 µg/100 g, es decir no mostraron cambios significativos después de la muerte; en cuanto a la osmolaridad observó que, Sturner⁴³ la determinó en el vítreo de 45 casos en cantidades de 280-350 mOsm/Kg, y notó que se incrementa proporcionalmente a la concentración de alcohol etílico presente en la sangre. En casos negativos de alcohol el rango fue de 288-323 mOsm/Kg.

De todos los constituyentes químicos del humor vítreo, el que más ha interesado a las ciencias forenses, es el ion potasio.

Leahy y Farber³⁷ en 1967, observaron que las concentraciones de potasio se elevan después del fallecimiento, y son de gran valor para la determinación del intervalo postmortem (IPM) en casos de muerte súbita. Se ha observado que este electrolito se difunde lentamente por todo el humor vítreo a través del tiempo postmortem, tiempo denominado "intervalo postmortem", durante el cual los cambios del potasio en el humor vítreo se emplean como una medida de tiempo postmortem.

Posteriormente, Lie⁴⁴ en 1967 encontró que, los valores de la concentración del ion potasio en humor vítreo son comparables, con los valores calculados con la fórmula de Sturner⁴³ la cual es: Tiempo de fallecimiento (horas) = (7,14 X concentración de K⁺) – 39,1; y observó, que la concentración de potasio en el humor vítreo aumenta en relación lineal aritmética, aun después de las 100 horas del fallecimiento.

Muñoz y col.,⁴⁵ en el año 2001, se propusieron como objetivo hacer una nueva fórmula, para calcular el intervalo postmortem (IPM) y ver cual es la influencia de los niveles de urea y creatinina en la relación entre [K⁺] e intervalo postmortem. Estos autores observaron que para calcular el intervalo postmortem había numerosas fórmulas de regresión lineal, pero con muchos errores, para correlacionar la relación que existe entre el aumento de la concentración de potasio [K⁺] y el intervalo postmortem en el humor vítreo; propusieron una nueva ecuación de mayor precisión en la cual [K⁺] es la variable independiente y el (IPM) es la variable dependiente. Concluyeron que su nueva ecuación, daba los mejores resultados en los fallecimientos no hospitalizados: IPM = 3,92 [K⁺] – 19,4; no daba origen a ninguna diferencia importante a partir del nivel de alcohol, ni causaba diferencias importantes entre ambos ojos.

Blumenfeld y col.,⁴⁶ en 1979, midieron las concentraciones en humor vítreo postmortem de Na⁺, K⁺, Cl⁻, Ca⁺⁺, Mg⁺⁺, nitrógeno ureico, creatinina y proteínas totales de 127 niños fallecidos de síndrome de muerte súbita infantil y de otras causas conocidas y observaron que las concentraciones del humor vítreo postmortem reflejan los valores químicos del suero antemortem, y que los valores de las concentraciones postmortem de los constituyentes del humor vítreo pueden ayudar a descubrir las anomalías químicas del suero no sospechadas antemortem.

Devgun y Dunbar⁴⁷ en 1986, hicieron una investigación bioquímica del humor vítreo, cuyos resultados tendrían aplicaciones en medicina forense, especialmente en relación con el abuso crónico del alcohol y encontraron los siguientes elementos y compuestos químicos con sus concentraciones medias respectivas, como se observa en la Tabla 2. En algunos casos observaron, un incremento

notable en la osmolaridad, el cual es útil principalmente en aquellos casos que fueron de pacientes sospechosos de tener problemas relacionados con el alcohol. Esto sugirió a los autores el tener que calcular en humor vítreo los valores de sodio, potasio, urea y la osmolaridad, lo cual indicaría el ingreso de alcohol al humor vítreo, la investigación advirtió que el abuso crónico de alcohol se puede valorar midiendo la gamma glutamil transferasa y las transaminasas. Este estudio de Devgun y Dunbar de 1986 aportó el conocimiento de cuales son los constituyentes químicos del humor vítreo.

Tabla 2. Constituyentes químicos del humor vítreo

Análito	Media	Rango	Unidades	Número de casos
Sodio	146	141-156	Mmol/L	7
Potasio	13,6	9 –18,8	Mmol/L	7
Urea	7.8	5,5-9,9	Mmol/L	5
Creatinina	87	77-103	μmol/L	5
Lactato deshidrogenasa	1268	157-4236	UI/L	6
Aspartato transaminasa	111	30-314	UI/L	6
Alanino transaminasa	13	3-53	UI/L	6
Bilirrubina	-	-	μmol/L	6
Fosfatasa alcalina	6	0-13	UI/L	6
Calcio	1,73	1,50-2,22	Mmol/L	6
Fosfato	1,54	0,93-2,91	Mmol/L	6
Proteínas totales	2,3	1-5	g/L	6
Albúmina	2	1-4	g/L	6
Cloruro	127	109-145	Mmol/L	26
Bicarbonato	8	0-37	Mmol/L	25
Glucosa	0,8	0,3-1,7	Mmol/L	6
pH	8,3	7,3-9,1		13
Osmolaridad	347	303-395	mmol/Kg H ₂ O	16
Gamma glutamil transferasa	6	0-16	UI/L	15
Zinc	0,88	0,07-3,4	μmol/L	12
Cobre	0,51	0-1,25	μmol/L	15
Magnesio	0,93	0,77-1,25	μmol/L	11
Ácido úrico	98	10-190	μmol/L	11

3.4 Obtención de la muestra de Humor Vítreo

Los especímenes de humor vítreo se obtienen por aspiración directa de cada uno de los ojos, utilizando una jeringa de 5 a 10 mL con aguja del calibre del número 20. La aguja se debe introducir al ojo hasta su extremo, por la comisura externa de los párpados y hasta el centro del globo ocular.

Posteriormente, se aspira el humor vítreo del globo ocular con una succión suave y delicada. Para prevenir la contaminación del espécimen con fragmentos de retina y otros tejidos, se deben evitar los tubos al vacío y la succión fuerte. Con la técnica correcta se pueden extraer de cada uno de los ojos del adulto de 2 a 3 mL de líquido y de cada ojo de un recién nacido alrededor de 1 mL de humor vítreo. Finalmente, tan pronto como se haya extraído la muestra de cada uno de los ojos, es conveniente para reponer el humor vítreo extraído, inyectar un volumen similar de solución salina ó glicerina a cada uno de los ojos para devolverles el aspecto natural.

3.5 Manejo de la muestra

El humor vítreo, tan pronto como se haya obtenido, se debe depositar en un tubo de ensayo estéril sin aditivos y mientras se lleva a cabo el estudio se conservará en refrigeración a una temperatura de 4 °C; si se estudia después de 24 horas o más, deberá congelarse hasta que se pueda hacer su análisis. Se recomienda centrifugarse y emplear el sobrenadante para el análisis, principalmente en aquellos estudios donde el espécimen se ponga directamente al aparato analizador y deba fluir a través de una tubería de calibre muy pequeño.

3.5 Precauciones

Cuando se trabajen muestras de humor vítreo, se debe tener la precaución de saber si la muestra es de un individuo con o sin infección. El síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), hepatitis viral y la tuberculosis son algunas de las enfermedades infecciosas que pueden adquirirse por una exposición inadecuada a una muestra con dichas infecciones.

Klatt y Noguchi,⁴⁸ han resumido apropiadamente la necesidad de usar las precauciones universales de rutina.

Numerosas publicaciones han demostrado que tanto el antígeno como el anticuerpo del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), se pueden detectar en muestras de humor vítreo.

Klatt,⁴⁸ encontró en especímenes postmortem de humor vítreo de 34 horas de tomados, positividad para anticuerpos en contra del VIH; sin embargo algunos especímenes de humor vítreo dieron resultados "falsos-negativos" en muestras con más de 34 horas después de la muerte.

Karhunen,⁴⁹ Informó que los anticuerpos de VIH pueden ser detectados en muestras de suero, sangre entera, humor vítreo y bilis conservadas por meses a temperatura ambiente.

3.6 Métodos Analíticos.

Las concentraciones de etanol en humor vítreo han sido determinadas por diversos métodos los cuales han venido evolucionando en los últimos cincuenta años. Procedimientos enzimáticos para la determinación de etanol han sido reconocidos por ser más específicos, facilidad de ejecutar en el laboratorio y ventajoso, porque estos pueden con facilidad ser aplicados para cantidades de etanol muy pequeñas.

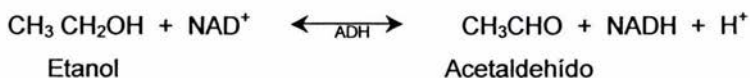
Leahy y col.,⁴ en 1968, estudiaron al humor vítreo y sangre para la cuantificación de alcohol etílico postmortem, por el método de reducción del dicromato de potasio y con el método enzimático de la alcohol deshidrogenasa.

Felby y Olsen⁵ en 1969, investigaron al humor vítreo simultáneamente con muestras de músculo y sangre, para determinar la concentración de alcohol etílico, con el método de la alcohol deshidrogenasa y con el método de reducción del dicromato de potasio.

Coe y Sherman⁶ en 1970, determinaron las concentraciones de alcohol en sangre y humor vítreo al mismo tiempo, con el método de reducción del dicromato.

Método enzimático de la alcohol deshidrogenasa (ADH).

En presencia de ADH y NAD⁺ (llevada a cabo a pH = 9) el alcohol etílico es oxidado a acetaldehído y NADH. El presente método se basa sobre la determinación espectrofotométrica de NADH al completarse la reacción.

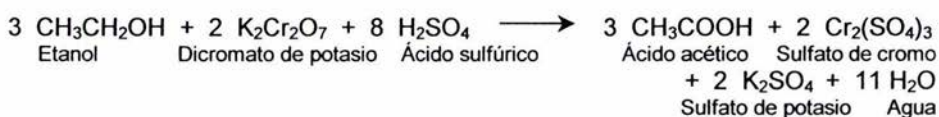


NAD = nicotín-adenil-dinucleótido

Microdifusión ó reducción del dicromato de potasio.

Se realiza en cámaras de Conway que poseen en el compartimiento externo la muestra y el agente liberador carbonato de potasio (K₂CO₃) y en el interno el agente atrapante dicromato de potasio (K₂Cr₂O₇) con ácido sulfúrico 0,01N (H₂SO₄). En este caso, se produce la captación y oxidación del etanol hacia ácido acético, forzándose la remoción completa del primer compuesto al cabo de un

tiempo y temperatura previamente determinados (2 horas a 60 °C). Una vez cumplido dicho tiempo, se procede a la microtitulación directamente en el compartimiento interno. Para ello, se agregan 0,5 ml de la solución de ioduro de potasio 3 N, se titula rápidamente con la solución valorada de tiosulfato de sodio, 0,1 N colocada en una microbureta. Al observarse el comienzo de la aparición del color celeste verdoso por el Cr^{+3} (cromo III) se adiciona una gota de la solución de almidón, continuándose ahora gota a gota la titulación hasta la desaparición del color azul del iodo. En la técnica colorimétrica se utiliza una disolución ácida de dicromato potásico como indicador. El paso de etanol a ácido acético (oxidación), producirá la reducción de dicromato (naranja) a Cr^{+3} , (de color verde intenso). Así, el viraje de naranja a verde pondrá de manifiesto la presencia de etanol.



Cromatografía de gases.

Sturner y Coumbis³ en 1966, estudiaron al humor vítreo y a la sangre con el cromatógrafo de gases, para determinar los niveles de alcohol etílico, este método que sirve para separar los componentes individuales de una mezcla compleja de sustancias químicas, se estableció claramente desde 1941 y campo abierto a partir del año de 1952, cuando ya con la simple instrumentación necesaria, se separó y analizó una mezcla de ácidos grasos.

Un cromatógrafo de gases está constituido normalmente por los siguientes componentes (Figura 2.):

- Un suministro y una entrada de gas portador.
- Puerto de inyección.
- Columna normalmente localizada en el interior de una cámara termostaticada (horno).
- Detector.
- Sistema computarizado para analizar, registrar e imprimir el cromatograma (grabadora).

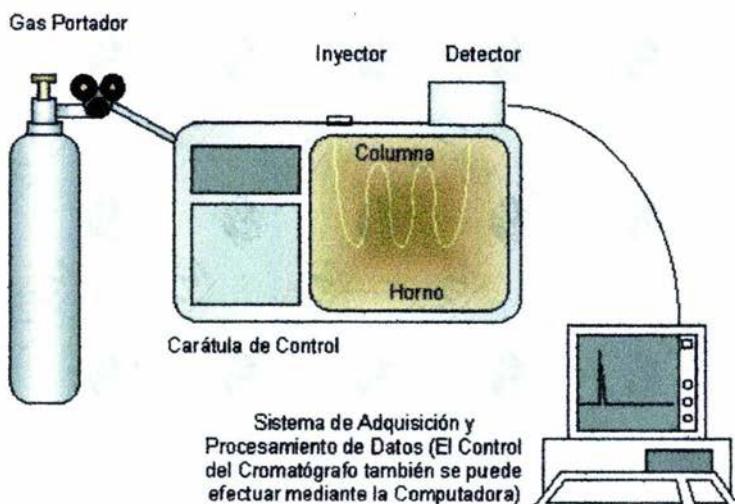


Figura 2. Componentes del Cromatógrafo de Gases.

La cromatografía de gases es, esencialmente, un método físico de separación, en el cual los componentes a separar se distribuyen en dos fases, la fase estacionaria (que cubre interiormente a la columna tubular), de gran área superficial y la fase móvil (regularmente un gas inerte) que se hace pasar a lo largo de la fase estacionaria. Los procesos cromatográficos tienen lugar como resultado de repetidas adsorciones y desorciones durante el movimiento de los componentes de la muestra a lo largo de la fase estacionaria (Figura 3), alcanzándose la separación gracias a las diferencias en los coeficientes de distribución de los distintos componentes de la muestra.

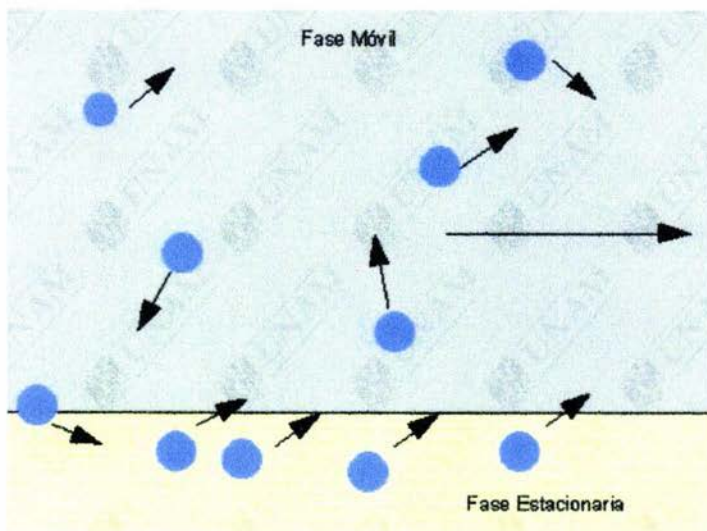


Figura 3. Esquema del proceso cromatográfico

La grabadora registra gráficamente una curva para cada uno de los compuestos en estado gaseoso, los cuales son separados en la columna cromatográfica, a un tiempo específico o de retención.

La cromatografía como técnica analítica instrumental es capaz de proporcionar información tanto cualitativa como cuantitativa acerca de la composición de la mezcla. Además, las especies separadas se pueden caracterizar empleando los detectores apropiados. Así, se pueden separar por esta técnica muestras volátiles.

Desde entonces, los cromatógrafos de gases para estudiar al humor vítreo han sido de diversas marcas y modelos (Tabla 3).

Tabla 3. Equipos utilizados en la determinación de alcohol etílico

AÑO	EQUIPO	TIPO DE COLUMNA	CONDICIONES	Estándar interno
1966	Cromatógrafo de Gases Warner-Chilcott serie 600. Equipado con detector de ionización de llama (FID).	Columna de acero inoxidable, longitud 3,048 m (10-ft), 1/8" diámetro externo y 0,23622 cm (0,093 in) diámetro interno. Cubierta con cera de castor al 40% en peso sobre una malla 60/80 Chromo W AW.	Temperatura inyector: 180 °C Temperatura columna: 120 °C Gas portador: Nitrógeno Velocidad de flujo: 14 mL/minuto	Metil-etil-cetona
1980	Cromatógrafo de Gases Perkin-Elmer Modelo 3920. Equipado con detector de ionización de llama (FID).	Columna de vidrio de 1,8 m (6-ft). Empacada con 0,2% Carbowax 1500 sobre Carbowax C.	Temperatura horno: 100 °C Puerto de inyección: 150 °C Temperatura detector: 150 °C Gas portador: Nitrógeno Velocidad de flujo: 20 mL/minuto	Ter-butanol
1981	Cromatógrafo de Gases	10% Carbowax 20M on 80/100 Chromosorb W AW (Remoción por lavado con ácido).		
1982	Cromatógrafo de Gases Hewlett-Packard Modelo 5750	Columna de acero inoxidable de 1,8 m (6-ft). Empacada con Poropak Q	Operado a 191 °C.	Ter-butanol
1983	Cromatógrafo de Gases Hewlett-Packard Modelo 5380 A. Equipado con detector de ionización de llama (FID).	Columna de vidrio de 3,048 m (10-ft) y 1/4" de diámetro externo. Empacada con 20% SP-2100 / 0.1% Carbowax 1500 sobre 100/120 Supcoport.	Temperatura horno: 80 °C Puerto de inyección: 175 °C Temperatura detector: 275 °C Gas portador: Nitrógeno Velocidad de flujo: 30 mL/minuto	Ter-butanol
1984	Cromatógrafo de Gases Varian Modelo 1200. Equipado con detector de ionización de llama (FID).	Columna de acero inoxidable de 1,8 m (6-ft). Empacada con 60/80 Carbowax B/5% Carbowax 20M.	Temperatura horno: 110 °C Temperatura inyector: 150 °C Temperatura detector: 150 °C Gas portador: Nitrógeno	Metil-etil-cetona
1984	Cromatógrafo de Gases con HS(analizador head space). Carle Basis Modelo 9500.	Empacada con 3,8% Halcoimid M18 0,5% Carbowax 600 sobre un soporte de teflón.		Acetonitrilo
1985	Cromatógrafo de Gases Varian Modelo 2100	Columna consistente de 50% Poropak Q y 50% Poropak R.	Operado a 145 °C.	n-propanol
1990	Cromatógrafo de Gases Perkin-Elmer Modelo 8500 con HS-101 (analizador head space). Equipado con detector de ionización de llama (FID).	Columna de acero inoxidable de 3,048 m (10-ft) y de 1/8" de diámetro externo. Empacada con 0,2% Carbowax 1500 sobre 80/100 Carbowax C.	Calentamiento de vial: 80 °C Aguja: 90°C Horno: 120 °C Detector: 250 °C; Presurización: 0,5 minutos Inyección: 0,8 minutos Gas portador: Nitrógeno Velocidad de flujo: 30 mL/minuto	n-propanol
1990	Cromatógrafo de Gases Hewlett-Packard Modelo 5830. Equipado con detector de ionización de llama (FID).	Empacada con GP 60/80 Carbowax B/5% Carbowax 20 M.	Puerto de inyección: 200 °C Temperatura detector: 200 °C Temperatura horno: 85 °C Gas portador: Helio Velocidad de flujo: 30 mL/minuto	Solución al 0,15% de n-propanol
1991	Cromatógrafo de Gases	Columna de 1,3 m (4-ft), 0,2 mm de diámetro interno. Empacada con 0,2% Carbowax, 1500 sobre 60/80.		
1992	Cromatógrafo de Gases Equipado con detector de ionización de llama (FID).	Columna de 1,8 m (6-ft) y 2 mm de diámetro interno. Empacada con Carbowax B cubierta con 5% Carbowax 20 M	Temperatura horno: 85 °C Temperatura detector: 200 °C Temperatura inyector: 200 °C Gas portador: Helio Velocidad de flujo: 30 mL/minuto	Solución al 0,02% de n-propanol
1993	Cromatógrafo de Gases Perkin-Elmer Modelo 8500. HS-101 (analizador head space).	Empacada con 0,2% Carbowax 1500 sobre 80/100 Carbowax C.	Aguja: 90 °C, Horno: 120 °C, Detector: 250 °C. Presurización: 0,5 minutos Inyección: 0,08 minutos Gas portador: Nitrógeno Velocidad de flujo: 30 mL/minuto	n-propanol 2-butanona
1994	Cromatógrafo de Gases Perkin-Elmer Modelo 8500 con HS-101 (analizador head space). Equipado con detector de ionización de llama (FID).	Columna de acero inoxidable de 1,8 m (6-ft) y 1/8" de diámetro externo. Empacada con 0,2% Carbowax 1500 sobre Graphpac GC.	Calentamiento de vial: 70 °C Aguja: 100 °C, Horno: 75 °C Inyector: 150 °C Detector: 250 °C. Gas portador: Nitrógeno Velocidad de flujo: 20 mL/minuto	

Prueba con tira de Alcoscan.

Pentilla y col.,²¹ en 1990, emplearon la tira de alcoscan para determinar la concentración de alcohol en muestras de humor vítreo postmortem, esta tira contiene alcohol oxidasa. La alcohol oxidasa en presencia de oxígeno reacciona con el alcohol etílico de las muestras, para formar un aldehído y peróxido de hidrógeno. El aldehído reacciona con el sistema de tinción, que es el ácido metil-benzotiazolinona hidrocloreto / 3-dimetil aminobenzoico, que en la presencia de peroxidasa, forma una tinción del tipo de la indamina, lo que da color azul, que se cuantifica visualmente comparándolo con una representación gráfica de colores.

Cromatografía capilar electrocinética micelar (CEM).

Ferslew y col.,⁵⁷ en 1995, emplearon para su estudio la CEM, que es una forma de electroforesis de zona capilar en la cuál, la adición de un surfactante produce micelas en un buffer acuoso / orgánico. La separación de los analitos resulta de las diferencias en su movilidad electroforética dentro del capilar, debido a su velocidad electroforética y al flujo electro-osmótico del buffer en su campo eléctrico dado; el orden de la migración es determinada por la división o separación diferencial de las drogas entre la micelas y la fase acuosa / orgánica. En este tipo de cromatografía capilar, los analitos son inyectados al capilar por muestreo hidrostático; la migración y cuantificación es determinada por su absorción ultravioleta dentro del capilar.

Dispositivo detector de alcohol (QED).

Engelhart y Jenkins³⁴ en 2001, para determinar los niveles de alcohol en muestras de humor vítreo emplearon el dispositivo QED, el cual se fundamenta principalmente, en una oxidación enzimática de etanol por la alcohol deshidrogenasa.

Técnica de micro-extracción en fase sólida (MEFS).

Spinosa y Cinira³⁶ en el 2002, emplearon la MEFS en uno de los últimos trabajos publicados con respecto a la determinación de etanol en muestras de humor vítreo. Es una técnica recientemente introducida, que fue desarrollada y patentada después por Pawliszyn y col., en los años ochentas. Esta técnica permite muestreo simultáneo, extracción, preconcentración, e introducción de analitos desde una muestra matriz en un solo procedimiento.

La MEFS, es a menudo la técnica de elección si los analitos son apreciablemente volátiles ó pueden ser hechos volátiles con calentamiento moderado de la muestra. Consiste en poner en contacto la muestra con una fibra de sílice fundida recubierta con un material adsorbente; la muestra se coloca en un vial cerrado, se perfora el septum, se expone el material adsorbente a la muestra (en agitación) durante un período de tiempo que oscila entre 15 y 30 minutos, se retira el material adsorbente, se saca la jeringa del vial, se perfora con la jeringa el inyector de un cromatógrafo gaseoso, se expone a la temperatura el material adsorbente y los analitos se desorben dentro del inyector. La desorción es total y la fibra es re-usable, con una vida útil de más de 50 inyecciones.

4.- Objetivos

- Demostrar las propiedades del humor vítreo como muestra biológica.
- De acuerdo a la literatura universal, analizar la utilidad del humor vítreo como fluido biológico para calcular la concentración de etanol.
- Presentar las ventajas y desventajas del uso de humor vítreo en la determinación de etanol, con fines forenses en nuestro país.

5.- Importancia del Estudio

La determinación de etanol postmortem, es la prueba frecuentemente realizada en un laboratorio de toxicología forense. Ha sido clásico el análisis postmortem a partir de la sangre del ventrículo derecho, pero la sangre en general y la del ventrículo derecho en particular, plantean graves problemas para el análisis bioquímico, debido a la hemólisis y otros derivados, que resultan a causa de la anatomía del órgano. Al ventrículo derecho llegan contaminantes que se generan durante la agonía, así como productos que resultan de la autólisis que se lleva a cabo en el páncreas y de la difusión del contenido gástrico, a través de la aurícula derecha, a la cual llega sangre de venas cavas, venas suprahepáticas, hígado, vena porta, venas mesentérica superior e inferior y de la vena esplénica.

Es bien conocido, que la concentración de glucosa en el ventrículo derecho es mayor que la de la sangre periférica, lo mismo ocurre con la insulina y otros elementos. Durante la agonía se produce una liberación de adrenalina y noradrenalina secundaria a la hipoxia, lo que modifica el metabolismo de los hidratos de carbono y de los fosfolípidos. Estos graves inconvenientes de la sangre del ventrículo derecho, ha hecho que las investigaciones se hayan dirigido hacia otros fluidos corporales, como son aquellos que se encuentran en lugares cerrados y, por tanto, hurtados a la circulación general y a la contaminación. Los medios biológicos investigados han sido: líquido cefalorraquídeo, humor vítreo, líquido sinovial, líquido pericárdico y líquido perilinfático.

De todos los líquidos señalados, el humor vítreo es el que ofrece más ventajas indudables: su posición anatómicamente aislada lo protege de la putrefacción, carbonización y del trauma; puede obtenerse sin una autopsia completa; su acceso es sumamente fácil; entre los dos ojos se pueden obtener de 4 a 5 mL de líquido, suficientes para la mayoría de las investigaciones y fácil de trabajar analíticamente; el humor vítreo es un espécimen claro, seroso, tiene escasas células por lo que los procesos derivados de la citólisis no son tan intensos; no está muy influenciado por los procesos agónicos y postmortem.

No suele haber diferencias entre un ojo y el otro, salvo que haya procesos patológicos en uno de ellos o se emplee una mala técnica.

Los errores pueden derivarse de no extraer todo el humor o de hacer un vacío excesivamente brusco que libere parte de la retina, caso en que se obtendrán resultados diferentes.

Por consiguiente, en la ausencia de sangre confiable, el humor vítreo permite una interpretación toxicológica confiable, para determinar etanol.

6.- Análisis de Resultados

Los diferentes estudios sobre humor vítreo y etanol, han observado, que el humor vítreo por su situación anatómica aislada, está protegido del trauma, de la carbonización, contaminación y putrefacción. Leahy y Farber³⁷ en 1967 mencionaron, que debido a su posición anatómicamente aislada y al contacto relativamente ligero con células que sufren autólisis después de la muerte, el humor vítreo parece estar menos sujeto a los cambios químicos postmortem y es además, fácilmente obtenible para el análisis químico. También, estos estudios han advertido que las muestras de humor vítreo en su momento se presentan ante el toxicólogo y químico forense, como una nueva fuente de muestras para la determinación de alcohol etílico; son fáciles de obtener en la mayoría de los casos de autopsia; son serosas, claras; analíticamente, son fáciles de trabajar, tienen buena estabilidad química, permiten la interpretación toxicológica requerida en ausencia de una muestra de sangre digna de confianza.^{3,22,41} El humor vítreo tiene buena estabilidad en las concentraciones de alcohol, debido a la escasa probabilidad de que se desarrolle una microflora que dé origen a la formación de alcohol postmortem.⁵ Aunque el humor vítreo contiene glucosa, la infiltración bacteriana no se presenta, ésta se desarrolla en el periodo tardío de putrefacción; así, si se encuentra etanol en humor vítreo éste será de origen exógeno.¹² La producción de etanol de novo por el metabolismo microbiano en humor vítreo no se presenta en cuerpos intactos, lo que indica que el etanol se consumió en vida poco antes al fallecimiento.¹¹ En un estudio comparativo sobre la contaminación microbiológica en sangre y humor vítreo postmortem se observó que, en ninguna de las muestras de humor vítreo se detectaron números grandes de bacterias u hongos, sin embargo si se descubrieron muchos microorganismos en 32 de las muestras de sangre.^{19,50} En años recientes, algunos autores concluyeron de acuerdo con sus resultados, que la determinación del alcohol en humor vítreo es fundamental para determinar el origen de etanol detectado en la sangre de la cavidad torácica de cuerpos descompuestos.³³ El humor vítreo no requiere de preparación especial para su análisis ya sea por el método de Microdifusión o por

el enzimático.⁴ El humor vítreo postmortem es un medio satisfactorio para la cuantificación de alcohol etílico por métodos analíticos obtenibles en laboratorios químicos.

Estudios previos han mostrado cambios muy intensos y rápidos en la concentración de alcohol en sangre y en varios tejidos del cuerpo después de la muerte. Para obtener una concentración de alcohol en sangre válida y fiable, equivalente a la que circula a través del cuerpo en el momento de la muerte, se necesita analizar un tejido o fluido que esté físicamente aislado del resto del cuerpo y que sea menos sujeto a los cambios químicos postmortem. Las mejores muestras son humor vítreo y fluido cerebroespinal. Si el equilibrio ha sido alcanzado antes de la muerte (esencialmente la absorción se había completado), esto producirá estimaciones muy confiables de la concentración de alcohol en el momento de la muerte, incluso en los cuerpos quemados (asumiendo que el humor vítreo y la columna vertebral no fueron violados y fueron preservados). Si la absorción todavía estuviera llevándose a cabo en el momento de la muerte, el alcohol contenido de esos fluidos tendría que estar retrasándose en el resto del cuerpo y se desestimaría la concentración de alcohol en sangre al momento de la muerte.

Alcohol en Humor Vítreo.

La primera publicación sobre un análisis de humor vítreo, con objetivo toxicológico, fue el análisis de etanol en 1966, cuando dos autores Sturner y Coumbis,³ se propusieron a comparar los niveles de alcohol etílico en sangre y humor vítreo. Dichos autores analizaron y observaron las concentraciones de alcohol etílico en sangre, humor vítreo y sus respectivas desviaciones estándar. Contemplaron que el promedio de la desviación estándar es de 0,011 y consideraron que hay una variación mayor en los casos con niveles elevados de alcohol etílico. En dos casos, hallaron niveles bajos de alcohol etílico en humor vítreo, uno de 0,037 y otro de 0,029 mg por 100 mL y no encontraron alcohol etílico en sangre. Reflexionaron, que: hay una íntima correlación entre los niveles de alcohol etílico en sangre y el humor vítreo; existe una serie más amplia de

variaciones entre los dos especímenes con los valores más elevados; el caso con hallazgo positivo en sangre, fue confirmado por el humor vítreo.

Leahy⁴ en 1968, con la reducción del dicromato de potasio, observó en 20 casos, buena concordancia entre las concentraciones de alcohol etílico en sangre y humor vítreo, principalmente cuando la concentración en sangre es menor a los 0,20 g/100 mL; con el aumento de las concentraciones de alcohol etílico en sangre, aumentan las concentraciones de etanol en humor vítreo. Con la alcohol deshidrogenasa observó en 10 casos, concentraciones positivas de etanol en sangre y humor vítreo; buena correlación entre los valores de sangre y humor vítreo; buena correlación de los resultados con los procedimientos del dicromato y enzimático; concentraciones elevadas en sangre y concentraciones más elevadas en humor vítreo.

Posteriormente, Olsen⁷ en 1971, en un estudio y con una nueva técnica *in vivo*, sobre la relación de la penetración de alcohol al humor vítreo del ojo, de un conejo albino, y referente a las concentraciones de alcohol en sangre y humor vítreo en relación con el tiempo; observó desde el punto de vista gráfico, que la concentración de alcohol en sangre mostró una caída casi lineal, mientras que la concentración de alcohol en humor vítreo registró un ascenso lineal hasta lograr un equilibrio después de 210 minutos (relación $_{ALC} = 0,79$); después de este tiempo, ambas concentraciones tuvieron una caída paralela, Relación $_{ALC} = \text{alcohol sangre} / \text{alcohol humor vítreo}$.

Coe⁴⁰ en 1972, comentó la utilidad toxicológica del humor vítreo para la determinación de alcohol etílico.

Norheim⁸, observó en 1972, que la determinación de alcohol postmortem es una parte importante en la práctica de la química forense; que, además de la sangre se deben estudiar otros líquidos más convenientes; en algunos casos puede ser de gran interés conocer algo acerca del intervalo de tiempo a partir del consumo de alcohol al momento del fallecimiento; varios autores también ya habían hecho determinaciones simultáneas de alcohol en sangre y en humor vítreo, por lo que Norheim elaboró su estudio, para determinar simultáneamente la concentración de alcohol en sangre y en humor vítreo de 73 cuerpos, con el

método de la alcohol deshidrogenasa. En sus resultados observó que el contenido de alcohol en las diferentes muestras de sangre varió de 0,21-4,66% (21-466 mg/100 mL) y la relación de alcohol sangre / alcohol vítreo (coeficiente calculado F) varió de 0,53 a 1,11; lo máximo de la curva que es el valor más probable de la relación alcohol sangre / alcohol vítreo (coeficiente F) quedó entre 0,81 y 0,85; la relación entre el contenido de alcohol en sangre y en humor vítreo puede ser en algunos casos de valor para calcular el tiempo entre el consumo de alcohol y el fallecimiento.

Coe⁹ en 1976, observó en 10 casos positivos para etanol, como resultado del embalsamamiento, un factor de dilución. En ocho de estos diez casos la diferencia de la concentración entre el ojo derecho pre-embalsamado y el ojo izquierdo post-embalsamado fue insignificante. Las concentraciones de alcohol en el ojo derecho variaron de 0,05 a 0,26% (50 a 260 mg/100 mL), de éstas en cuatro fueron de 0,21 a 0,26% (210 a 260 mg/100 mL); las concentraciones de alcohol en el ojo izquierdo variaron de 0,02 a 0,21% (20 a 210 mg/100 mL), de éstos en dos casos fue de 0,21% (210 mg/100 mL).

Caughlin¹⁴ en 1983, concluyó en su estudio de sangre obtenida de corazón intacto o de vena femoral y de especímenes de humor vítreo, obtenidos de 61 cadáveres que, el problema, es que no se conoce que esté bien establecida una relación de distribución exacta, que pueda ser empleada para convertir una concentración de alcohol de humor vítreo a una concentración de alcohol en sangre, en cualquier momento. Estudios previos habían demostrado relaciones de distribución que variaban con un promedio que generalmente era mayor al que se esperaba teóricamente, con todo, estos estudios previos debían ser considerados a la luz de varios factores, como: error del método analítico, una predisposición inadvertida a partir del número de especímenes estudiados, la naturaleza postmortem de los especímenes de sangre y de humor vítreo y la fase de la curva de alcohol en sangre al tiempo del fallecimiento; factores que pueden llevar a cabo la relación de distribución sangre / humor vítreo. Cuando estos factores son eliminados o controlados en razón de datos a partir de la fase de eliminación de la curva de alcohol en sangre, entonces la relación de distribución se aproximará a

0,81, como se predijo a partir de consideraciones teóricas. Caughlin hizo énfasis que, si el analizador tenía muestras de sangre y de humor vítreo, era esencial establecer la integridad de la concentración de alcohol de cada uno de los especímenes, principalmente de la sangre, antes de hacer cualquier conclusión, en cuanto a la fase de la curva de alcohol en sangre al tiempo del fallecimiento. Para este autor, en su trabajo, fue conveniente emplear una relación de distribución teórica de 0,81 para acercarse a una concentración de alcohol en sangre, de una persona quien hubiese fallecido en la fase de eliminación de su curva de alcohol en sangre. Este procedimiento subcalcularía la concentración de alcohol en sangre de una persona que haya fallecido en su fase de absorción. Generalmente esto es considerado, salvo desde un punto de vista forense. En una u otra situación, se debe buscar otra evidencia para corroborar, apoyar o negar cualquier suposición que se haya llevado a cabo. Para un investigador o para un tribunal de justicia, debe ser claro que este tipo de interpretaciones son de ayuda, pero que tienen varias limitaciones sobre su confiabilidad que dependen de la situación del caso.

Jollymore y col.,¹⁶ en 1984 elaboraron un estudio, en el cual, se propusieron un doble objetivo. En primer lugar, determinar la relación de alcohol sangre / humor vítreo con base a un caso disponible. En segundo lugar, se esperó que este estudio reprodujera los datos del trabajo de Caughlin¹⁴ de 1983, aun prestando apoyo a su evidencia a través de una distribución bimodal de relaciones ya sea en fase de absorción o de eliminación. Estos autores a través de su estudio demostraron una relación media de alcohol sangre / humor vítreo de 0,80, con una desviación estándar de 0,4 y una variación de 0,57-1,75. Estos datos para Jollymore y colaboradores representaron un acuerdo muy cercano con las relaciones medias esperadas de 0,79 ó de 0,81. Caughlin un año antes, en 1983, había publicado una hipótesis para explicar los resultados de su trabajo en base a una distribución bimodal. Empero, Jollymore y colaboradores con su estudio no pudieron apoyar la hipótesis de Caughlin; para ellos fue evidente que el factor de conversión de 0,81 lleva a un nivel de alcohol en sangre calculado, el cual, es mayor al nivel de alcohol en sangre observado en el 66% de los casos, es decir en

27 de 41 casos. Esto, para dichos autores, tiene situaciones importantes, debido a que si el nivel, de alcohol en sangre que se basa en el nivel de alcohol en humor vítreo, puede ser aceptado como evidencia en un tribunal de justicia. Por lo tanto, para que haya más confiabilidad en un nivel determinado de alcohol en sangre a partir de un nivel de alcohol en vítreo, se debe usar la relación más baja de sangre / humor vítreo. El valor en este estudio de Jollymore y colaboradores fue de 0,57. Empleando tal valor y una concentración de alcohol en sangre de 80 mg/dL, el nivel de alcohol en humor vítreo sería de 140 mg/dL. Así, cuando el nivel de alcohol en humor vítreo es de 140 mg/dL ó mayor, el nivel de alcohol en sangre correspondería a 80 mg/dL ó mayor. Esto no significa una media, sin embargo, la relación teórica de alcohol sangre / humor vítreo de 0,79 ó de 0,81 es errónea. En principio, después de una ingesta de alcohol, aumenta más rápidamente la concentración de alcohol en sangre, que la concentración de alcohol en humor vítreo. Por lo tanto, la relación de alcohol sangre / vítreo, sería elevada. Como el equilibrio se va alcanzando, la relación de alcohol sangre / humor vítreo tiende a disminuir y se va acercando al valor teórico de 0,81. En equilibrio la distribución es de 0,81. Hentsch y Muller,⁵¹ sugirieron que el equilibrio se alcanza a las dos ó tres horas después de la ingesta de alcohol. Felby y Olsen⁵ en 1969, sugirieron que una relación de alcohol sangre / humor vítreo mayor de uno indica que el fallecimiento se presentó antes de que la fase de equilibrio se haya alcanzado. En dos casos del estudio de Jollymore y col., la relación de alcohol sangre / humor vítreo fue mayor de 1,0 (1,30 y de 1,75); los autores investigaron la historia de cada uno de los casos; en uno fue por suicidio violento y la relación fue de 1,75, es posible que el alcohol lo haya ingerido por la fuerza y poco antes del suicidio; la manera del fallecimiento del segundo caso fue accidental, por ahogamiento, dónde otra vez, es factible que el alcohol lo haya ingerido poco antes del accidente, y es concebible que sea un factor mayor de contribución. En el estudio de Jollymore y col., no se presentó ninguna reproducción de los datos del trabajo de Caughlin¹⁴; fue evidente que la relación promedio y teórica de sangre / humor vítreo no era conveniente para ser empleada en un contexto médico-legal. Dado que se puede presentar en un tribunal de justicia, un nivel de alcohol en sangre, fundamentado

en una concentración de alcohol en humor vítreo, es importante que no se presente un sobre cálculo del nivel de alcohol en sangre. Por eso es razonable emplear la relación más baja de alcohol sangre / humor vítreo con dichas relaciones. En el estudio de estos autores, la relación de distribución más baja fue de 0,57. Esto media que, un nivel de alcohol en humor vítreo de 140 mg/dL corresponderá a una concentración de alcohol en sangre de 80 mg/dL. Cualquier nivel de alcohol en humor vítreo por debajo de 140 mg/dL puede ser importante, sin embargo, como esto indica en si mismo una ingesta de alcohol, puede representar cierto grado de deterioro.

Yip²⁹ observó en 1995 que, a Pounder y Kuroda²⁸ les fue inadvertido el artículo de Chao⁵² de 1993 sobre la relación entre los niveles de etanol en humor vítreo y sangre. Chao y col., reprodujeron la distribución bimodal y obtuvieron resultados similares, empleando el método de Yip y Shum²⁰ sobre la correlación de los niveles de alcohol en humor vítreo y sangre en la fase de absorción tardía y en la de eliminación. Yip y Shum²⁰ emplean con seguridad las ecuaciones de regresión derivadas de los datos indicados por los niveles de alcohol en orina / sangre, para tener que calcular, a partir de casos post-equilibrio el nivel mínimo de alcohol en sangre con el nivel de alcohol en humor vítreo, en casos dónde la sangre está contaminada ó no está disponible. Además, Chao menciona en su artículo que la interpretación de alcohol en especímenes postmortem es complicada por la presencia de alcohol producido por fermentación microbiana, y aclara que, este problema es minimizado por el análisis de humor vítreo, el líquido que llena el globo ocular, porque este líquido esta razonablemente protegido de la actividad microbiana y permanece relativamente constante después de la muerte, por consiguiente la concentración de alcohol en humor vítreo es usada comúnmente para confirmar la determinación de una concentración de alcohol en sangre postmortem.⁵² En un caso donde la orina no esta disponible la relación de alcohol en sangre / humor vítreo también puede ser empleada con seguridad para deducir si el individuo murió durante la fase de absorción o no. Para Yip y Shum²⁰ los niveles de alcohol en humor vítreo son de valor limitado en la mayoría de las circunstancias.

Kraut³⁰ también observó en 1995 a través de cartas al editor que, Pounder y Kuroda²⁸ concluyeron en su trabajo que, el cálculo de una concentración de alcohol en sangre a partir de una concentración de alcohol en humor vítreo fue de poco valor práctico debido a la inseguridad asociada con el cálculo. Kraut reflexionó que, estaría buscando la manera de hacer un cálculo para una concentración de alcohol en sangre a partir de una concentración de alcohol en humor vítreo de más valor para el investigador que, la publicada por Pounder y Kuroda⁵⁰ en 1994; estos autores determinaron la inseguridad del cálculo en la sangre por el empleo de un intervalo de predicción que se basa en una distribución tomada como normal para cada concentración de humor vítreo; que los resultados analíticos fueron mucho más cercanos a la línea de regresión que, a la línea de predicción del 95%, particularmente con los datos en la variación de 0-200 mg% (0-200 mg/100 mL). Kraut con su experiencia de más de 350 casos la primera propuesta que hace en un caso típico, es una relación de CAHV / CAS de 1,1-1,5, y es lo que emplea para calcular una concentración de alcohol en sangre a partir de una muestra de humor vítreo aceptable, haciendo dos suposiciones básicas: (1) que no haya bebidas alcohólicas importantes dentro de los 30 minutos del suceso; (2) que el fallecimiento haya ocurrido dentro de los 30 minutos de la ingesta de bebidas alcohólicas.

Para Kraut³⁰, Pounder y Kuroda²⁸ no propusieron una variación para una relación que pudiera ser empleada para valorar si una concentración de alcohol en humor vítreo corrobora una concentración de alcohol en sangre. Si la variación es equivalente a su intervalo de predicción, luego una concentración de alcohol en humor vítreo dada corroborará una variación amplia de la concentración de alcohol en sangre. Además se deben considerar otros factores, principalmente si la relación CAHV / CAS no cae dentro de la variación 1,1-1,5 y tales factores serían: condición de la muestra, fuente de la muestra, condición del cuerpo, evidencia de putrefacción, intervalo de tiempo entre el incidente y el fallecimiento, tiempo entre el último trago y el incidente, enfermedad, tratamiento hospitalario y volúmenes de líquidos administrados.

Pounder y Kuroda³¹ en 1995, contestaron a Yip y Shum²⁰ y a Kraut³⁰, que ellos se dirigieron al problema de predecir la concentración del alcohol de la sangre (CAS) a partir de la concentración de alcohol de humor vítreo (CAHV) en un caso individual en el cual eran desconocidas las circunstancias asociadas al consumo del alcohol y muerte y ninguna de éstas de hecho era asumida. Los datos de referencia que los autores usaron eran los apropiados para este problema. Sin embargo, Kraut³⁰ estaba en lo correcto al señalar que si la información de las circunstancias eran disponibles ó si las tomas se hicieron entonces puede ser posible estrechar el rango del CAS predicho. Desgraciadamente, para muchos casos esta información, es incompleta, y esto fue así en 47 de los 117 casos estudiados por Kraut³⁰. Aunque Pounder y Kuroda³¹ no se encerraron en su publicación, ellos observaron la posibilidad de mejorar la predicción de la CAS desarrollando las ecuaciones de regresión para los diferentes rangos de CAHV, pero ninguna mejora importante se llevó a cabo. Ellos pensaron que cualquier cálculo de la concentración de alcohol en sangre basado sobre CAHV en un caso individual de fatalidad debe por necesidad, proporcionar en ambas concentraciones un rango de predicción y un grado de certeza con los cuales el verdadero valor caerá dentro de este rango. Kraut³⁰ usó un rango de CAHV / CAS de proporciones de 1,1-1,5 y no estuvo claro en sus publicaciones^{53,54} por qué estos puntos de reducción ó eliminación específica fueron tomados. Sin embargo, usando este acercamiento, una CAHV de 90 mg% (90 mg/100 mL) predice una CAS de 60-82 mg/100 mL (grado de certeza desconocido). La fórmula de Pounder y Kuroda³¹ predeciría una CAS de 29-131 mg/100 mL (con 95% de certeza). En un caso forense en particular, trabajar el intervalo de predicción para un caso en especial sería necesario un intervalo de predicción más amplio para la media de la población en conjunto. En otras palabras, si la relación media de la CAHV / CAS para la población en general es de $1,3 \pm 0,1$, entonces ese no es el rango verdadero de la relación CAHV / CAS de 1,1 – 1,5 que pueda ser aplicado a un caso individual de fatalidad para predecir la CAS con 95% certeza. Pounder y Kuroda³¹ observaron que sus colegas de Hong Kong y Singapur también usaban las relaciones en lugar de las ecuaciones de

regresión con los intervalos de confianza, para calcular la CAS a partir de una CAHV; también estos colegas dividían los casos, en una categoría de absorción temprana ó en una categoría en fase absorción tardía / eliminación sobre las bases a la relación de la CAO / CAS (concentración de alcohol de orina / concentración del alcohol de sangre); no obstante, estos últimos autores reconocen que no existe una real verdad entre los dos grupos. Para la categoría en fase de absorción tardía / eliminación la CAS es calculada por la fórmula $CAS = 0,89 CAHV$. Sin embargo, 0,89 sólo es la relación media y el rango para esta relación en esa categoría fue de 0,32-1,28, desviación estándar 0,19. Por consiguiente Pounder y Kuroda³¹ no pudieron estar de acuerdo en el uso seguro de esta aproximación, Sin embargo, reconocen o están de acuerdo con Kraut³⁰ y Yip²⁰ que, en casos individuales un informe adicional puede permitir el rango de predicción para ser aún más estrecho. Pounder y Kuroda³¹ concluyeron finalmente que, los tribunales requieren de un perito experto y de un testimonio con cierto grado de certeza, calculando la CAS a partir de una CAHV los tribunales de justicia serán mejor advertidos ante una opinión que se basa en el análisis de la regresión proporcionando así un intervalo de predicción del 95% ; sin embargo, reconocen, como Kraut³⁰ y Yip²⁰ señalaron, que una información adicional puede permitir estrechar el rango predicho en casos individuales.

O'Neal y Poklis⁵⁰ en 1996, observaron en los resultados de su estudio que la calidad y lugar de la muestra colectada, traumas en cuerpo, duración entre el tiempo de muerte y la autopsia, presencia de microorganismos en el cuerpo, difusión de bebidas alcohólicas presentes en el estómago dentro del fluido pericárdico, y difusión de etanol en vómito aspirado dentro de la sangre cardiaca, son factores que influyen en la interpretación de la concentración de etanol en especímenes postmortem, entre ellos el humor vítreo.

Hardin³⁵ en el año 2002, reportó un caso en el cual, la concentración de etanol en sangre tomada de cavidad torácica fue de 0,32 g/dL; el juez, sin más explicación determinó que esta concentración era excesiva: la concentración de etanol en humor vítreo fue de 0,09 g/dL y la relación de CAHV / CAS fue de 0,28. Él reportó que la concentración de etanol en sangre puede estar elevada en

relación con la concentración de etanol en humor vítreo por: a) la difusión de etanol a partir de estómago intacto, hacia la sangre de la cavidad torácica durante el intervalo que hay entre el fallecimiento y la autopsia, b) la ingestión de una gran cantidad de etanol poco antes del fallecimiento, y c) contaminación de la cavidad torácica por sangre durante la extracción del corazón y partes óseas.

La concentración de etanol en sangre por si misma habría sugerido que el fallecimiento fue por intoxicación aguda al tiempo del fallecimiento. Este reporte demuestra la importancia de obtener y analizar simultáneamente, muestras de sangre y de humor vítreo al fallecimiento, principalmente en fallecimientos traumáticos. La importancia de la concentración de etanol en humor vítreo es que, 1) puede ser más confiable en casos de toxicología postmortem y, 2) que puede poner en duda la concentración de etanol en sangre al tiempo del fallecimiento.

Alcohol en Humor vítreo y otros fluidos.

Winek y Esposito¹⁰ en 1981, en su trabajo comparativo de niveles de etanol en sangre, humor vítreo, bilis, y orina, encontraron que la relación promedio de alcohol en sangre / humor vítreo fue de 0,81, la cual está de acuerdo con la relación de agua contenida en esos dos fluidos, además de un amplio rango que fue de 0,55-1,38. Estos autores reportaron además, que el humor vítreo es un espécimen conveniente para el cálculo antemortem de la concentración de alcohol en sangre.

Budd¹³ en 1982 encontró 500 casos, con concentraciones positivas para alcohol en sangre. En los mismos 500 casos determinó las concentraciones de alcohol en bilis, orina, humor vítreo y líquido cerebroespinal, fluidos que tomó durante el estudio de autopsia. Las relaciones de las concentraciones de alcohol en los fluidos mencionados los tabuló y los correlacionó para determinar si en general había una correlación lo suficientemente buena entre las concentraciones de alcohol de los diferentes líquidos corporales de una víctima, para que la concentración de alcohol de uno de los líquidos del cuerpo pudiera ser empleado para predecir con exactitud la concentración de alcohol en sangre, luego esta correlación, sería muy útil en los casos donde la sangre no se pudiera obtener

durante el estudio de la autopsia, puesto que la concentración de alcohol en sangre es importante en las determinaciones de causa de muerte. El autor concluyó en su trabajo, que los niveles de alcohol en los diversos fluidos biológicos se pueden emplear con cierto grado de precisión para determinar el nivel de alcohol en sangre, como sucedió en 15 de los 500 casos dónde la relación humor vítreo / sangre, tuvo una relación promedio de 1,3; una desviación estándar de $\pm 0,6$; rango de una desviación estándar de 0,7 a 1,9 y coeficiente de correlación de 0,88.

Stone y Rooney¹⁵ en 1984, dividieron sus resultados en tres grupos: Grupo I. concentración de alcohol de 0,02 a 0,49% (20 a 490 mg/100 mL); Grupo II. concentración de alcohol > 0,10% (mayor de 100 mg/100 mL) y Grupo III. concentración de alcohol < 0,10% (menor de 100 mg/100 mL).

Tabla 4. Resultados de alcohol en muestras post-mortem

Sangre / bilis				
	<i>N</i>	<i>X</i>	<i>S</i>	<i>V %</i>
Grupo I	78	0,92	+0,22	24
Grupo II	62	0,92	+0,13	4
Grupo III	19	0,92	+0,34	37
Sangre / humor vítreo				
	<i>N</i>	<i>X</i>	<i>S</i>	<i>V %</i>
Grupo I	46	0,76	+0,23	30
Grupo II	44	0,77	+0,17	22
Grupo III	13	0,63	+0,16	25
Sangre / orina				
	<i>N</i>	<i>X</i>	<i>S</i>	<i>V %</i>
Grupo I	42	0,79	+0,20	25
Grupo II	33	0,77	+0,14	18
Grupo III	13	0,75	+0,31	41

Donde: *N* = número de muestras, *X* = media, *S* = desviación estándar, *V* = coeficiente de variación.

Estos autores observaron que, si la concentración de alcohol de la bilis es de 0,20% (200 mg/100 mL), entonces la concentración de alcohol en sangre será del 0,18% (180 mg/100 mL) \pm 0,02 con una confiabilidad del 68% ó 0,18% (180 mg/100 mL) \pm 0,04 con una confiabilidad del 95%; encontraron diferencias considerables (0,63 a 0,77) entre la relación media de, sangre / humor vítreo, con respecto a los tres grupos (Tabla 4); consideraron que, esto posiblemente se debió al bajo número de muestras utilizadas en el grupo III ó a la falta de equilibrio en la distribución de alcohol en el cuerpo; contemplaron que usando la media de 0,77 \pm 0,17, para calcular la concentración de alcohol en sangre, con una concentración de alcohol en vítreo de 0,23% (230 mg/100 mL), entonces la concentración de alcohol en sangre sería de 0,18% (180 mg/100 mL) \pm 0,06 con un nivel de confianza del 95%. Los autores usando los ejemplos anteriores de las muestras, si la orina fue de 0,23% (230 mg/100 mL), entonces el alcohol en sangre podría ser 0,18% (180 mg/100 mL) \pm 0,03 con una confiabilidad del 68% y 0,18% (180 mg/100 mL) \pm 0,06 con una confiabilidad del 95%. Estos autores concluyeron que bilis, orina, y humor vítreo pueden ser usados para determinar el alcohol en sangre; la media y las desviaciones estándar para la relación sangre / fluidos (bilis, humor vítreo, y orina) han sido calculados para casos actuales postmortem, sin embargo, en este estudio, el fluido que mejores resultados brindó fue la bilis.

Neil y col.,¹⁷ en 1985, observaron que las concentraciones de alcohol en orina aunque estén disponibles, no son lo suficientemente confiables como para calcular, a partir de estas las concentraciones de alcohol en sangre. De los 128 casos estudiados, 93 fueron positivos a etanol en sangre y positivos para etanol en humor vítreo. En 18 de los 93 casos, el alcohol en sangre fue menor de 10,8% mmol / L (50 mg% ó 50 mg/100 mL); estos 18 casos fueron eliminados debido a observaciones reportadas en otros estudios de que discretos errores analíticos, conducen a errores microscópicos en los cálculos de las relaciones de distribución. En los 75 casos restantes, hubo 65 orinas positivas para etanol; además en esos mismos 75 casos se calcularon las relaciones de alcohol sangre / humor vítreo. La relación media fue de 0,81 con una variación amplia de 0,55 a 1,38. La distribución fue unimodal con una moda de 0,73-0,74 y con un sesgo

hacia las relaciones más elevadas. Esto esta de acuerdo con lo que se conoce sobre la fase de absorción y de eliminación de alcohol. El cálculo de los niveles de alcohol en sangre a partir de los niveles de alcohol en humor vítreo, empleando como factor de conversión 0,81 (relación media), muestra una amplia distribución, con sólo 35% que cae dentro de $\pm 10\%$ de los valores de alcohol en sangre medidos. Si se quiere extrapolar valores de alcohol en sangre a partir de los valores de alcohol en humor vítreo da a lo más, sólo un cálculo aproximado y no confiable, y por lo tanto, no se puede emplear en un tribunal de justicia. En situación similar y solo por un cálculo aproximado no confiable, se pueden obtener a partir de las concentraciones de alcohol en orina, las concentraciones de alcohol en sangre.

Marraccini y col.,²³ en 1990, observaron que, las concentraciones de etanol en sangre, después de la muerte, son diferentes en cada una de las muestras de sangre tomadas de los diferentes sitios cardiovasculares, observaron que la relación de etanol de aorta ascendente / humor vítreo en todos los casos varió de 0,773 a 1,76, vieron que el etanol en humor vítreo en equilibrio sería igual a un nivel de etanol en sangre de 0,19% p / v (190 mg/100 mL), y advirtieron que las concentraciones de etanol en humor vítreo variaron de 0,110% p / v a 0,221% p / v (110 a 221 mg/100 mL), mayores a las concentraciones de etanol en sangre tomadas de los diferentes sitios cardiovasculares. Dichos autores también observaron que, las diferencias en las concentraciones medias de etanol están asociadas con la aspiración de vómito con contenido de alcohol del líquido gástrico, durante el estado de agonía del individuo; el vómito puede tener una gran cantidad de etanol, en una concentración hasta de 0,80% p / v (800 mg/100 mL), y llegar a las cavidades alveolares del pulmón, dónde el alcohol es absorbido a través de la pared del capilar alveolar y entrar a la luz de éste, de aquí el alcohol sigue hacia las vénulas y venas pulmonares y así llegar a la aurícula izquierda del corazón, luego pasar al ventrículo izquierdo y salir hacia aorta ascendente. Esta trayectoria del alcohol sería la causa de la elevación de la concentración de etanol en sangre de aorta ascendente.

Algunos autores han observado que, las concentraciones de etanol varían en muestras de sangre tomadas de diferentes sitios del corazón, así como de otros sitios vasculares y que además las concentraciones de etanol en humor vítreo son mayores a las concentraciones de etanol en sangre de muestras tomadas de otros sitios cardiovasculares.

Garriott²⁴ en 1991, observó dos grupos: El primero, en dónde las concentraciones de alcohol en sangre pueden ser de más de 0,10 g/dL; concentración de alcohol elevado en humor vítreo en comparación a la concentración de alcohol en sangre en ambos grupos en una relación promedio de vítreo / sangre de $1,26 \pm 0,12$; concentración de alcohol en músculo con un promedio en todos los casos de $0,94 \pm 0,086$; además, la relación promedio humor vítreo / sangre de $1,26 \pm 0,12$ la cual es virtualmente la misma a la de la relación teórica de 1,27, calculada por el agua contenida en esos dos especímenes. El segundo grupo tiene concentración de alcohol en sangre de menos de 0,10 g/dL; relaciones más altas de músculo / sangre, con un promedio de $1,48 \pm 0,13$, la cual es 57% más alta que la relación correspondiente en el primer grupo. En este segundo grupo, las relaciones fueron uniformemente elevadas a 1,00, cuando la relación promedio correspondiente de humor vítreo / sangre es de $1,47 \pm 0,36$, relación casi idéntica a músculo / sangre. En ambos grupos, la concentración de alcohol en músculo fue muy cerrada a los valores correspondientes de sangre. Así, Garriot observó, que los del primer grupo están en general, en ó cerca de la concentración máxima en sangre, lo que indica que pudieron haber estado bebiendo alcohol al tiempo de morir; mientras los casos del segundo grupo con bajas concentraciones de alcohol en sangre están generalmente más allá de la fase de absorción, lo que indica que existe una distribución completa dentro de los tejidos, aumentando así la concentración de alcohol en estos últimos, sin embargo, si alguien ha estado bebiendo, se puede observar que la distribución no será completa dentro de los tejidos, y entonces se obtendrán relaciones bajas en vítreo y en músculo ya sea que la concentración de alcohol en sangre sea más grande ó menor que 0,10 g/dL. La relación teórica de alcohol músculo / sangre es 0,86, basada en el contenido de agua de ambos especímenes. Garriott concluyó

que, las observaciones de su trabajo son consistentes con otros estudios de distribución de alcohol dentro de los compartimentos del cuerpo; en general, cuando la relación humor vítreo / sangre es más grande que 1,27, la distribución teórica se basa en la relación de agua contenida de los dos especímenes, entonces la absorción gastrointestinal y la distribución en el cuerpo es completa y el individuo está en la fase postabsortiva de la distribución de alcohol. Cuando la relación del vítreo es menor de este valor, la distribución de alcohol no es completa, y el individuo todavía puede haber estado ingiriendo el alcohol dentro de 1 a 3 horas antes de su muerte y no hubiese alcanzado una concentración máxima del alcohol en la sangre. El tiempo requerido para completar la absorción (ó concentración máxima de alcohol) puede ser desde 0,5 a 6 horas, pero por término medio 0,75 a 2 horas, dependiendo principalmente del consumo de comida.

Briglia y col.,²⁵ en 1992, observaron que, las concentraciones de etanol en humor vítreo son mayores a las concentraciones de etanol en sangre de vena femoral, a las de etanol en sangre de aurícula derecha y a las concentraciones de etanol en sangre de aorta ascendente; también observaron que las concentraciones de etanol en líquido pericárdico son mayores a las concentraciones de etanol en humor vítreo y a todas las anteriores en el 30,2%; estos autores además, vieron que en veinte ó 33,3% de sesenta casos, las concentraciones de etanol variaron ampliamente entre las diversas muestras de sangre tomadas de un mismo caso y concluyeron que, sus resultados están de acuerdo con el hecho bien establecido que, el alcohol se diluye con el agua del cuerpo. Briglia y col., también concluyeron que no hay diferencia significativa en las concentraciones de etanol entre los especímenes tomados de los diferentes sitios postmortem, sin embargo, es evidente que los toxicólogos forenses deben de proceder con extrema precaución en la interpretación de los resultados de alcohol postmortem.

Singer y Jones³² en 1997, estudiaron las concentraciones de etanol, acetona, isopropanol y acetato en un caso forense y observaron, en cuanto a la distribución de etanol, que ésta estuvo muy fuera de lo común observando concentraciones en mg/100 mL en: sangre femoral, 257 y 273 (dos muestras); sangre de corazón, 643; humor vítreo, 763; orina, 84; bilis, 616; hígado, 250; y contenido gástrico, 4660 (2470 mg/53 g). Consideraron que las elevadas concentraciones de etanol en humor vítreo se pueden explicar debido a que el etanol se pudo difundir a través del ojo durante la fase de agonía o postmortem por aspiración de contenido gástrico con concentraciones muy elevadas de etanol. Estos autores concluyeron en su estudio que, la causa de la muerte fue atribuida a la combinación tóxica de etanol, acetona, e isopropanol; éste caso demostró la dificultad de usar un solo espécimen postmortem para calcular la probable concentración de alcohol en sangre inmediatamente antes de la muerte.

Fórmulas para obtener la concentración de alcohol en sangre (CAS), a partir de la concentración de alcohol en humor vítreo (CAHV).

Felby y Olsen⁵ en 1969 determinaron en 27 casos, las concentraciones de alcohol, por el método de reducción del dicromato de potasio y por el método de la alcohol deshidrogenasa, en sangre tomada de vena femoral y corazón, humor vítreo de ambos ojos y de músculos; las concentraciones del alcohol en sangre se compararon con las del humor vítreo de ambos ojos, y con las de los músculos. Los valores de humor vítreo se dieron como valores medios de ambos ojos. Se observó que, con ambos métodos, los valores encontrados representan las concentraciones de alcohol al tiempo del fallecimiento y buena correlación entre los valores encontrados. En 25 de los 27 casos, los valores de humor vítreo fueron más elevados que los valores de la sangre, debido probablemente al contenido más bajo de sustancia seca en éste órgano, el cual es de 1,3%; la relación de las concentraciones de alcohol en sangre a humor vítreo promediaron de 0,7 a 0,8 y está de acuerdo con la relación de los contenidos de agua de la sangre y de humor vítreo la cual es de aproximadamente de 0,8 y con la suposición que el alcohol se distribuye por difusión de una manera equitativa por todos los líquidos

del cuerpo. Observaron que, cuando se ha alcanzado el equilibrio de difusión del alcohol en los líquidos del cuerpo, se debe aplicar la siguiente ecuación:

$$\frac{[\text{] alcohol en sangre} }{[\text{] alcohol en vítreo} } = \frac{\text{Contenido de agua en sangre}}{\text{Contenido de agua en vítreo}} = \frac{78}{99} = 0,79$$

Felby y Olsen también observaron que, cuando el fallecimiento se presenta, y cuando el equilibrio de difusión ha tenido el tiempo para haber sido alcanzado, entonces:

$$\text{CAS} = 0,73 \times \text{Concentración de alcohol en humor vítreo.}$$

El valor medio de 0,73 es más bajo que el calculado de 0,79, probablemente a que el promedio de sustancia seca en sangre postmortem es superior al 22% debido a la hemoconcentración. Además observaron que, las concentraciones de alcohol en humor vítreo son mucho más elevadas que, en sangre de vena femoral, sangre de corazón, y que en músculos de extremidades superiores e inferiores.

Felby y Olsen, concluyeron en su trabajo que la concentración de alcohol en sangre, dentro de los límites de seguridad, puede ser calculada a partir de las concentraciones de alcohol en humor vítreo, empleando la ecuación de concentración alcohol en sangre: $\text{CAS} = 0,73 \times \text{CAHV}$.

Coe y Sherman⁶ en 1970, en un estudio de 460 casos, se llevaron a cabo las determinaciones simultáneas de alcohol en sangre y humor vítreo; de éstos, 174 tuvieron alcohol demostrable en sangre, humor vítreo o en ambos especímenes. Por el análisis estadístico de los datos de los 174 casos y por el cálculo del factor de conversión más adecuado, para convertir la concentración del alcohol de humor vítreo a concentración de alcohol en sangre con el 95% de confiabilidad, se obtuvo el factor de $0,89 \pm 0,023$, que es para determinar la concentración de alcohol en sangre a partir de un valor medido en humor vítreo. El mejor cálculo para obtener la concentración de alcohol en sangre es $= 0,89 (\pm 0,023) \times [\text{]}$ de alcohol en humor vítreo.

Los autores revisaron los resultados de tres series previamente publicadas y los trataron con el método del cálculo del factor de conversión (Tabla 5) y observaron que la relación en estas tres series varió de 0,75 a 1,01, probablemente, por: (1) variaciones en las lecturas del hematocrito, (2) diferencias en la especificidad del método analítico empleado, (3) errores de laboratorio, y (4) prejuicios inadvertidos a partir del número de casos en cualquiera de las dos fases, de absorción o eliminación del alcohol en el cuerpo, en particular en una serie pequeña de casos.

Tabla 5. Factor de conversión encontrado por diversos autores

<i>Autor</i>	<i>Año</i>	<i>No. casos</i>	<i>Factor de conversión*</i>
Sturner y Coumbis	1966	40	0,01 (± 0,04)
Leahy et al	1968	20	0,92 (± 0,03)
Felby y Olsen	1969	27	0,75 (± 0,05)
Coe y Sherman	1970	174	0,89 (± 0,02)

* El paréntesis contiene el 95%, el límite de confiabilidad del cálculo.

Las variaciones anteriores están de acuerdo con los trabajos de investigación básica, que han reportado que el etanol puede pasar rápidamente al ojo. Se ha observado que, en la penetración simultánea al humor vítreo, de 21 animales, de alcohol etílico y de otras sustancias no electrolíticas como etil urea, metil urea, tiourea y creatinina, el alcohol etílico es el que pasa con mayor celeridad al humor vítreo, y su máxima concentración en equilibrio se encuentra en menos de treinta minutos.¹

Backer y Pisano⁶³ en 1980, encontraron que, cualquier cálculo sobre la concentración de alcohol en sangre, fluido fisiológico ó tejido, sólo se puede expresar dentro de un rango amplio de concentración (Tabla 6).

Tabla 6. Rangos de concentración para alcohol en diversos fluidos

	<i>casos</i>	<i>Rango de alcohol en sangre g/100 mL</i>	<i>Proporción media</i>	<i>Rango</i>
Vítreo / sangre	110	0,046-0,697	1,05	0,48-1,72
Cerebro / sangre	33	0,072-0,388	0,86	0,64-1,20
Bilis / sangre	89	0,046-0,697	0,99	0,48-2,04
Fluido espinal / sangre	54	0,046-0,697	1,14	0,79-1,64
Orina / sangre	92	0,046-0,697	1,16	0,53-2,17

Tabla 7. Predicciones de la CAS en diversos fluidos para etanol

	<i>casos</i>	<i>correlación</i>	<i>m</i>	<i>b</i>	<i>Estimación de error estándar</i>
Vítreo / sangre	110	0,92	0,96	0,029	± 0,051
Cerebro / sangre	33	0,91	0,86	0,000	± 0,035
Bilis / sangre	89	0,92	0,99	0,005	± 0,048
Fluido espinal / sangre	54	0,96	1,03	0,028	± 0,041
Orina / sangre	92	0,88	0,91	0,029	± 0,063

Backer y Pisano también expusieron que la fórmula para calcular la concentración de alcohol en sangre, es a partir de la concentración de alcohol en otro fluido ó tejido y que es : $a = b / m$, dónde: a = concentración medida, m = pendiente de la línea de regresión lineal, y b = a la intercepción de la línea de regresión lineal. Estos autores observaron que, durante el cálculo se puede presentar dos veces el error estándar, el cuál se puede agregar ó substraer de la concentración de alcohol en sangre (CAS) calculada, para así lograr un nivel de confianza del 95%. Así, un cálculo de la muestra usando los datos de la Tabla 7 y una concentración de alcohol dada en humor vítreo de 0,20 g/100 mL sería:

$$\frac{0,20 - 0,029}{0,96} = 0,17 \quad 2 \times 0,05 = 0,10 \quad \text{CAS} = 0,17 \pm 0,10$$

Los autores observaron que, pocos estómagos exceden niveles de alcohol de 5000 mg/100 mL en contenido gástrico. Este hecho les indicó que, la absorción de alcohol en estómago es muy rápida y eso dio apoyo a la teoría de que la fase de absorción de alcohol puede predecirse en los niveles de alcohol en estómago. En su estudio, los niveles de alcohol de 0,5 g/100 mL fueron escogidos arbitrariamente como la media entre la fase de absorción y post-absorción. Los casos con concentraciones de alcohol menores a 0,5 g/100 mL de contenido gástrico fueron considerados a estar en la fase de post-absorción y los otros fueron considerados a estar en fase de absorción. Los datos también revelaron que la distribución teórica de los valores de alcohol en muchos casos, eran muy cercanos al valor real cuando la concentración de alcohol en el estómago fue menor a 0,5 g/100 mL. Recalculando la concentración de alcohol en sangre y de la concentración de alcohol en cerebro, humor vítreo, fluido espinal, y orina se mejoró significativamente el error estándar del calculado para casos en los cuales la concentración de alcohol en estómago fue menor a 0,5 g/100 mL. Ya Felby y Olsen⁵ en 1969 habían excluido esos casos, en los cuales el valor de alcohol en humor vítreo era menor al valor de alcohol en sangre, por consiguiente limitando sus casos a esos que eran más probablemente post absorbidos.

Backer y Pisano,⁶³ concluyeron, que en la ausencia de sangre para análisis cuando la concentración de alcohol en el estómago es menor a 0,5 g/100 mL, entonces el cerebro, fluido espinal ó humor vítreo se pueden emplear para calcular la concentración de alcohol en sangre.

Por lo tanto, el humor vítreo puede ser un espécimen muy confiable para calcular la concentración de alcohol en sangre, en los casos en los cuales, la concentración de alcohol en el estómago sea menor de 0,5 g/100 mL y cuando la concentración de alcohol en el estómago no se obtenga ó sea mayor a 0,5 g/100 mL, el uso de bilis podría ser el más recomendado para calcular la concentración de alcohol en sangre, esto fue porque la bilis tuvo el error más pequeño, cuando la concentración de alcohol en estómago fue mayor de 0,5 g/100 mL.

Yip y Shum²⁰ en 1990, con los resultados de su trabajo concluyeron que, si es permitido un margen de error adecuado, entonces se podrá usar con toda seguridad la ecuación $S = 0,76 V + 4,7$ para calcular el nivel mínimo de alcohol en sangre en casos donde la sangre no es la adecuada o no está disponible para hacer el cálculo de alcohol. Esto podría subestimar el nivel de alcohol en casos de muerte ocurrida en la fase de absorción, pero en una situación médico-legal sería más conveniente para un patólogo forense basar sus opiniones sobre niveles mínimos en los cuales el pueda estar seguro en casos donde la orina no se pueda obtener, la relación sangre / humor vítreo puede ser usada para inferir la fase en la cual la muerte ocurrió: una relación de sangre / humor vítreo más grande que 0.95 indica muerte en la fase de absorción. Debe notarse que la proposición inversa no es válida.

Pounder y Kuroda²⁸ en 1994, midieron las concentraciones de etanol en humor vítreo y sangre de 345 casos, a través de una ecuación de regresión lineal simple, la cual describe una relación entre la concentración de etanol en humor vítreo y la concentración de etanol en sangre en la fase absorbente postmortem. La ecuación de regresión ($n = 345$) con intervalo de predicción de 95% fue para la concentración de alcohol en sangre = $3,03 + 0,852 \text{ CAHV} \pm 0,019 \sqrt{[7157272 + (\text{CAHV} - 189,7)^2]}$ y con el intervalo de predicción del 99% que fue para la CAS = $3,03 + 0,852 \text{ CAHV} \pm 0,025 \sqrt{[7157272 + (\text{CAHV} - 189,7)^2]}$. La desviación estándar residual de la CAHV fue de 26 mg%, el error estándar del declive 0,0098 y el intervalo de confianza del 95% para el declive 0,833-0,871. El error estándar de la ordenada fue de 2,34 y el intervalo de confianza de 95% para la ordenada -1,57 a 7,63 no siendo significativamente diferente de cero. Aunque el análisis de regresión, permite el desarrollo de un modelo para predecir la concentración de alcohol en sangre dando un valor específico a la concentración de alcohol en humor vítreo, este análisis da origen a un intervalo de predicción muy amplio, como para ser de uso práctico real, a partir de una perspectiva cuantitativa. Sin embargo, las medidas de alcohol en humor vítreo son un medio muy preciado para corroborar el valor de alcohol en sangre ya conocido. El reanálisis de los datos proporcionados en estudios previos confirma este punto de vista. El intervalo de

predicción no puede ser perfeccionado ó mejorado apreciablemente por el desarrollo de series de casos más grandes. Sin embargo, las medidas de alcohol en humor vítreo permanecen o están como un medio valioso para corroborar un valor de alcohol en sangre ya conocido.

Formación endógena de alcohol postmortem.

Caplan y Levine²² en 1990, elaboraron un estudio de 347 casos con etanol positivo en sangre y observaron que la relación media de las concentraciones de etanol en sangre a etanol en humor vítreo es de 1,7, la cual es consistente con las consideraciones teóricas y con los datos previamente reportados. El estudio lo dividieron en tres grupos: el primer grupo, consistió de 41 casos que tuvieron un etanol positivo en sangre mayor de 0,01 g/dL y un etanol en humor vítreo menor de 0,01 g/dL; esto sugirió a los autores, que el etanol detectado en la sangre con una concentración mayor de 0,01 g/dL asociado a una concentración de etanol negativa en humor vítreo, que resulta de la formación endógena de etanol por fermentación postmortem más bien que del consumo antemortem de etanol. El segundo grupo de 101 casos, 67 tuvieron etanol en sangre en una concentración de menos de 0,10 g/dL y etanol en humor vítreo dentro de 0,02 g/dL. El tercer grupo de 205 casos con etanol positivo en sangre en una concentración igual a / ó mayor a 0,10 g/dL; para estos casos, el etanol en humor vítreo en relación con el etanol en sangre se tuvo que calcular. Caplan y Levine²² concluyeron en base a sus grupos, que una concentración de etanol en sangre de 0,05 g/dL tiene la oportunidad del 87% de estar asociado a una concentración positiva de etanol en humor vítreo; así mismo que una concentración de etanol en sangre mayor a 0,05 g/dL, tiene la posibilidad del 99% de estar asociada a una concentración positiva de etanol en humor vítreo. Las concentraciones de etanol en sangre de menos de 0,03 g/dL frecuentemente están asociadas con concentraciones negativas de etanol en humor vítreo, lo que implica que pudo haber ocurrido fermentación postmortem.

Levine y Caplan²⁶ en 1993, observaron que la concentración de etanol en sangre postmortem especialmente de aquella de menos de 0,05 g/dL, puede ser dudosa debido a que puede ser el resultado de una formación de etanol postmortem. Los autores observaron que para eliminar esta incertidumbre existe un método usado por los toxicólogos que es el análisis de múltiples especímenes para etanol. Dos de los especímenes más usados por dicho método es el análisis de humor vítreo y orina, porque son los menos susceptibles al proceso de putrefacción. En los casos con una concentración de alcohol en sangre de 0,01 g/dL el 54% se asocia a una concentración positiva de etanol en humor vítreo y orina, este porcentaje se incrementa al 63% cuando la concentración de alcohol en sangre es igual a 0,02 g/dL. 73 y 92% de los casos tuvieron un espécimen alterno positivo si la concentración de alcohol en sangre fue de 0,03 g/dL y 0,04 g/dL, respectivamente. Esto sugirió a los autores que en la ausencia de información adicional, una concentración de alcohol en sangre de 0,04 g/dL o más alto probablemente resulta de un consumo de etanol. Levine y Caplan,²⁶ concluyeron que, una suposición en la interpretación de los datos, es que un CAHV y / o CAO positivo indica consumo antemortem y no formación de etanol postmortem. Aunque la glucosa esté presente en el humor vítreo, la contaminación del fluido por microorganismos es limitada durante etapas tempranas del proceso de descomposición.

Clark y Jones¹¹ en 1982, estudiaron el humor vítreo y la sangre de 26 cadáveres intactos de 4 horas de fallecimiento y en refrigeración, para ver si era posible la síntesis de etanol, por acción de las bacterias sobre la glucosa de la sangre de estos cadáveres. Observaron que, el alcohol no se detectó en el humor vítreo ni en la sangre; en ningún caso hubo un valor de etanol en humor vítreo o en sangre mayor de 10 mg/dL; los valores de etanol fueron de menos de 10 mg/dL en 13 casos con resultados de cultivo negativo; estos datos sugirieron que la producción de etanol de novo por el metabolismo microbiano no se presenta en cuerpos intactos; la detección de etanol bajo tales condiciones indica que el etanol se consumió en vida poco antes al fallecimiento.

Zumwalt y Bost¹² en 1982, estudiaron 130 cuerpos humanos en descomposición para valorar el grado de putrefacción y para cuantificar las concentraciones de etanol en sangre, orina y humor vítreo de estos cuerpos en descomposición. Los autores observaron en sus resultados, síntesis endógena de etanol en sangre en 23 de los 130 cuerpos en descomposición. En 19 de los 23 casos los niveles fueron de 70 mg/dL o menos; en los otros cuatro casos fueron de 110, 120, 130, y 220 mg/dL. La síntesis de etanol endógeno en humor vítreo fue negativa. En el estudio bacteriano del humor vítreo, observaron que, tres no desarrollaron bacterias, tres desarrollaron escasas colonias bacterianas y en uno se desarrollaron media docena de bacterias Gram positivas, es decir, observaron desarrollo de muy pocas bacterias; aun en cultivos de cuerpos en descomposición moderada, la producción endógena de etanol por bacterias en humor vítreo es insignificante. Aunque el humor vítreo contiene glucosa, la infiltración bacteriana no se presentó, ésta se desarrolla en el período tardío del proceso de putrefacción. Así, si se encuentra etanol en humor vítreo éste será de origen exógeno. Estos autores concluyeron que, el humor vítreo tiene preferencia sobre la orina como una muestra fiable en la determinación de alcohol endógeno ó exógeno; además, el humor vítreo por su gran calidad y disponibilidad debe ser empleado con más frecuencia.

Gilliland y Bost⁵⁵ en 1993, hicieron un estudio retrospectivo de los resultados de 286 cuerpos en descomposición de los cuales: 64 se encontraron levemente descompuestos (22,4%), 42 presentaron de leve a moderada descomposición (14,7%), 90 mostraron descomposición moderada (31,5%), y 90 estuvieron marcadamente descompuestos (31,5%); y observaron que, la formación postmortem ó endógena de alcohol ocurrió en 55 (19,2%) del total de 286 casos descompuestos, similar al 18,7% encontrado en el estudio original de Zumwalt y Bost¹². En este estudio se observó producción endógena de alcohol, cuyas concentraciones de alcohol se encontraron elevadas en sangre, y en la bilis mientras que las concentraciones de alcohol en vítreo y orina fueron negativas o tanto más bajas como para dar una relación atípica de vítreo / sangre, u orina / sangre. La contaminación bacteriana se presenta en sangre antes que en el

líquido de vítreo. La concentración de alcohol en sangre más elevada por producción endógena fue de 0,07% (70 mg/100 mL), en los casos con otros líquidos negativos. La concentración media de alcohol en sangre fue de 0,06% (60 mg/100 mL) y varió de tan elevado como 0,16% (160 mg/100 mL) en casos que tienen relaciones atípicas. Los autores concluyeron que la mayoría de los casos con producción endógena de alcohol en sangre alcanzan una concentración de alcohol en sangre tan elevada como del 0,15% (150 mg/100 mL).

Lima y Midio³³ en 1999, estudiaron las muestras de sangre de cavidad torácica, orina, y humor vítreo de 27 cuerpos con ligera, moderada y severa descomposición, para determinar las concentraciones de alcohol en sangre desde un punto de vista médico legal y para demostrar la utilidad del humor vítreo como líquido biológico para una determinación indiscutible del origen del etanol en cuerpos descompuestos para propósitos forenses. Los autores concluyeron de acuerdo con sus resultados que, la determinación del alcohol en humor vítreo es fundamental para determinar el origen del etanol detectado en la sangre de la cavidad torácica de los cuerpos descompuestos.

Enzimas indicadoras del abuso crónico de alcohol.

Devgun y Dunbar⁵⁶ en 1985, estudiaron por primera vez los niveles de gamma-glutamyl transferasa (GGT) en humor vítreo, de 14 individuos que habían fallecido súbitamente o debido a una enfermedad crónica; consideraron que los niveles de gamma-glutamyl transferasa en humor vítreo pudieran ser un buen indicador del abuso crónico de alcohol en individuos que hubiesen fallecido en un accidente automovilístico en carretera. De los 14 casos, solamente en tres muestras de humor vítreo fue presente la gamma-glutamyl transferasa, uno de estos fue por intoxicación aguda de alcohol.

Sadler y Pounder⁵⁸ en 1996, emplearon, el valor diagnóstico postmortem de gamma-glutamyl transferasa (GGT) y transferrina deficiente en carbohidrato (TDC), como marcadores de alcoholismo crónico. La enzima gamma-glutamyl transferasa en suero (GGT) es una de los marcadores clínicos más frecuentes y tiene una sensibilidad reportada de 39-87% pero una especificidad de 11-50%. Esta pobre

especificidad se debe principalmente a las interferencias que producen las enfermedades hepáticas y la terapia con drogas aunque puede ser espontáneamente elevada por difusión. La transferrina deficiente en carbohidrato (TDC) ha tomado gran interés como marcador clínico del alcoholismo, ofreciendo 83-90% de sensibilidad y 99% de especificidad, pero la fuerza de este valor en el uso postmortem es aún desconocido.

Osuna y col.,⁵⁹ en el año 2000, observaron que, los niveles más elevados en humor vítreo de transferrina deficiente en carbohidrato y de alanina-aminotransferasa (ALAT), se obtuvieron en el grupo de casos con diagnóstico previo de alcoholismo; 24 de 38 casos (63,15%) mostraron valores, de transferrina deficiente en carbohidrato, mucho más elevados a las 7 UI/L, las cuales, son el valor medio de la transferrina deficiente en carbohidrato en el grupo de no alcohólicos; los niveles de la transferrina deficiente en carbohidrato en el humor vítreo, entre los alcohólicos, varió de 4,7 a 24,5 UI/L. Estos autores sugirieron que los niveles de transferrina deficiente en carbohidrato en humor vítreo son útiles en los casos dónde el diagnóstico postmortem de alcoholismo se hace difícil por lo inespecífico de los datos disponibles.

Pruebas y técnicas recientes para detección de alcohol en humor vítreo.

Pentilla y col.,²¹ en 1990, realizaron un estudio con la prueba de tira de alcscan, para hacer la depuración de alcohol en 52 muestras de humor vítreo y en 41 especímenes de orina de casos de autopsia de tipo forense y de 112 muestras de saliva, de conductores de automóviles con sospecha de ebriedad. La prueba sugiere validez para la depuración cualitativa de alcohol en muestras biológicas, además da información semicuantitativa al instante y confiable; observó que el etanol fue el único hallazgo positivo en todas las muestras analizadas químicamente; esta prueba se comparó con las determinaciones de alcohol en sangre, humor vítreo y orina llevadas a cabo con cromatógrafo de gases con head-space estándar y se observó que hace una buena correlación, con las concentraciones de alcohol en sangre. Este estudio observó finalmente, que la concentración de etanol en humor vítreo con el cromatógrafo de gases con

head-space, tiene un coeficiente de correlación de 0,63; y un valor de medida promedio con 1 g/L y con 2 g/L de alcohol acuoso estándar de 172 ± 19 (DS.,n =13) y de 274 ± 30 (DS.,n =12) respectivamente. El método no da falsos positivos ni falsos negativos. Además, el método da información al instante y es confiable desde el punto de vista semicuantitativo sobre la presencia de alcohol y los resultados sugieren el valor de la prueba en la detección preeliminar de alcohol en muestras de autopsia de tipo forense.

Ferslew y col.,⁵⁷ en 1995, estudiaron humor vítreo entre otros especímenes con la cromatografía capilar electrocinética micelar (CCEM), con esta ofrecen una nueva técnica analítica para barbitúricos, que es aplicable al análisis forense para líquidos biológicos entre ellos el etanol.

Engelhart y Jenkins³⁴ en el año 2001, hicieron un estudio para precisar si el dispositivo QED es un aparato útil para determinar los niveles de etanol postmortem en saliva y humor vítreo, en casos donde se necesita un resultado rápido. El estudio con el dispositivo QED se llevó a cabo en 165 de 171 casos y demostró que el humor vítreo es la muestra de elección, así mismo el estudio se elaboró hasta con un mínimo de 0,25 mL de humor vítreo, proporcionó resultados exactos empleando una relación promedio de etanol vítreo / sangre de 1,2 para concentraciones mayores de $> 0,04$ g/dL. Los resultados del estudio con el dispositivo QED se compararon con los resultados del estudio de las mismas muestras (saliva y humor vítreo) hechas con cromatografía de gases con head-space, observándose un coeficiente de correlación de 0,9931.

Spinosa y Cinira³⁶ en el 2002 demostraron que, en la micro extracción en fase sólida usando una fibra polar de 85 μm de poliacrilato y cromatografía de gas capilar, es una selectiva y conveniente metodología para la determinación de etanol y otros componentes volátiles en sangre, orina, y humor vítreo. El procedimiento presentado fue simple, sensible, reproducible y permite una excelente cuantificación.

7.- Conclusiones

Propiedades.

El humor vítreo, por su situación anatómica aislada, está protegido del trauma, de la carbonización, contaminación y putrefacción; está menos sujeto a los cambios químicos postmortem, además de ser una muestra serosa y clara; tiene escasas células, por lo tanto, los procesos derivados de la histólisis no son tan intensos; no está influenciado por los procesos agónicos y postmortem; tiene buena estabilidad química, aunque contiene glucosa la infiltración bacteriana no se presenta.

Ventajas.

El humor vítreo se puede obtener sin una autopsia completa, es de fácil acceso, se puede obtener una buena cantidad para su estudio y no requiere de preparación especial para su análisis, es fácil de trabajar analíticamente; por lo que es un medio satisfactorio para la cuantificación de alcohol etílico. El humor vítreo en ausencia de una muestra de sangre no confiable, permite una interpretación toxicológica confiable como una segunda alternativa para determinar la concentración de etanol.

Utilidad del humor vítreo como fluido biológico para calcular la concentración de etanol.

El humor vítreo es de utilidad por los siguientes puntos:

A partir de las concentraciones de alcohol en humor vítreo se puede calcular la concentración de alcohol en sangre, con la ecuación $CAS = 0,73 \times CAHV$.

La concentración de alcohol en humor vítreo se puede convertir, por medio del cálculo del factor de conversión, a concentración de alcohol en sangre con una confiabilidad del 95% con la siguiente fórmula:

$$CAS = 0,89 (\pm 0,023) \times [] \text{ de alcohol en humor vítreo.}$$

La relación de alcohol sangre / alcohol vítreo, es de gran valor para calcular el tiempo entre el consumo de alcohol y el fallecimiento.

El humor vítreo es un espécimen muy confiable para calcular la concentración de alcohol en sangre, en aquellos casos dónde la concentración de alcohol en estómago sea menor de 0,5 g/100 mL y cuando la concentración de alcohol en el estómago no se obtenga o sea mayor a 0,5 g/100 mL.

El humor vítreo se puede emplear con toda seguridad, para calcular el nivel mínimo de alcohol en sangre, en los casos dónde la sangre no es la adecuada ó no está disponible para hacer el cálculo de alcohol, con la ecuación:

$$S = 0,76 V + 4,7.$$

El humor vítreo funciona en la relación sangre / humor vítreo, para inferir la fase en la cual ha ocurrido la muerte: una relación sangre / humor vítreo mayor a 0,95, indica muerte en la fase de absorción.

Cuando la relación humor vítreo / sangre es mayor a 1,27, entonces la absorción gastrointestinal y la distribución de alcohol en el cuerpo es completa, de lo que se deduce que el individuo está en la fase post absorbente de la distribución de alcohol.

El humor vítreo también es útil, cuando la relación humor vítreo / sangre es menor a 1,27 entonces se observa que la distribución de alcohol aún no es completa, por lo tanto el individuo pudo haber estado ingiriendo alcohol de 1 a 3 horas antes de su muerte, el cual no alcanzó una concentración máxima en sangre.

La importancia de la concentración de etanol en humor vítreo es que puede ser muy confiable en casos de toxicología postmortem y puede poner en duda la concentración de etanol en sangre al tiempo del fallecimiento.

8.- Referencias Bibliográficas

- 1) Davson H. A comparative study of the aqueous humour and cerebrospinal fluid in the rabbit. *J Physiol* **1955**; 111-133.
- 2) Naumann H N. Postmortem Chemistry of vitreous body in man. *Arch. Ophthal* **1959**;62: 356-363.
- 3) Sturner W Q, Coumbis R J. The quantitation of ethyl alcohol, in vitreous humor and blood by gas chromatography. *Am J Clin Pathol* **1966**;46: 349-351.
- 4) Leahy M S, Farber E R. Quantitation of ethyl alcohol in the postmortem vitreous humor. *J Forensic Sci* **1968**;13: 498-502.
- 5) Felby S, Olsen J. Comparative studies of postmortem ethyl alcohol in vitreous humor, blood, and muscle. *J Forensic Sci* **1969**;14: 93-101.
- 6) Coe J I, Sherman R E. Comparative study of postmortem vitreous humor and blood alcohol. *J Forensic Sci* **1970**;15: 185-190.
- 7) Olsen J E. Penetration rate of alcohol into the vitreous humor studied with a new in vivo technique. *Acta ophthalmologica* **1971**;49: 585-588.
- 8) Norheim G. Postmortem alcohol in vitreous humor. *Blutalkohol* **1972**;9: 187-191.
- 9) Coe M D. Comparative postmortem chemistries of vitreous humor before and after embalming. *J Forensic Sci* **1976**;21: 583-586.
- 10) Winek C L, Esposito F.M. Comparative study of ethanol levels in blood versus, bone marrow, vitreous humor, bile and urine. *Forensic Sci Int* **1981**;17: 27-36.
- 11) Clark M A, Jones J W. Studies on putrefactive ethanol production. I: lack of spontaneous ethanol production intact human bodies. *J Forensic Sci* **1982**;27: 366-371.
- 12) Zumwalt R E, Bost R O. Evaluation of ethanol concentrations in decomposed bodies. *J Forensic Sci* **1982**;27: 549-554.
- 13) Robert D B. Ethanol levels in postmortem body fluids. *J of Chromatography* **1982**;252: 315-318.

- 14) Caughlin J D. Correlation of postmortem blood and vitreous humor alcohol concentrations. *Can Soc For Sci J* **1983**;16: 61-68.
- 15) Stone B E, Rooney P A. A study using body fluids to determine blood alcohol. *J Anal Toxicol* **1984**;8: 95-96.
- 16) Jollymore B D, Fraser A D. Comparative study of ethyl alcohol in blood and vitreous humor. *Can Soc For Sci J* **1984**;17: 50-54.
- 17) Neil P, Mills A J. Evaluation of vitreous humor and urine alcohol levels as indices of blood alcohol levels in 75 autopsy cases. *Can Soc For Sci J* **1985**;18: 97-104.
- 18) Watts M T, Mc Donald O L. The effect of biologic specimen type on the gas chromatographic headspace analysis of ethanol and other volatile compounds. *Am J Clin Pathol* **1987**;87: 79-85.
- 19) Harper D R. A comparative study of the microbiological contamination of postmortem blood and vitreous humour samples taken for ethanol determination. *Forensic Sci Int* **1989**;43: 37-44.
- 20) Yip D C, Shum B S. A study on the correlation of blood and vitreous humour alcohol levels in the late absorption and elimination phases. *Med Sci Law* **1990**;30: 29-33.
- 21) Pentilla A, Karhunen P J. Alcohol screening with the alcoscan test strip in forensic praxis. *Forensic Sci Int* **1990**;44: 43-48.
- 22) Caplan Y H, Levine B. Vitreous humor in the evaluation of postmortem blood ethanol concentrations. *J Anal Toxicol* **1990**;14: 305-307.
- 23) Marraccini J V, Carroll T. Differences between multisite postmortem ethanol concentrations as related to agonal events. *J Forensic Sci* **1990**;35: 1360-1366.
- 24) Garriott J C. Skeletal muscle as an alternative specimen for alcohol and drug analysis. *J Forensic Sci* **1991**;36: 60-69.
- 25) Briglia E J. The distribution of ethanol in postmortem blood specimens. *J Forensic Sci* **1992**;37: 991-998.
- 26) Levine B, Caplan Y H. Interpretation of low postmortem concentrations of ethanol. *J Forensic Sci* **1993**;38: 663: 667.

- 27) Canfield D V, Kupiec T. Postmortem alcohol production in fatal aircraft accidents. *J Forensic Sci* **1993**;38: 914: 917.
- 28) Pounder D J, Kuroda N. Vitreous alcohol is of limited value in predicting blood alcohol. *Forensic Sci Int* **1994**;65: 73-80.
- 29) Yip DCP. Vitreous humor alcohol. *Forensic Sci Int* **1995**;73: 155.
- 30) Kraut A. Vitreous alcohol. *Forensic Sci Int* **1995**;73: 157-158.
- 31) Pounder D J, Kuroda N. Vitreous alcohol: the author's reply. *Forensic Sci Int* **1995**;73: 159-160.
- 32) Singer P P, Jones G R. Very unusual ethanol distribution in a fatality. *J Anal Toxicol* **1997**;21: 506-508.
- 33) Lima I V, Midio A F. Origin of blood ethanol in decomposed bodies. *Forensic Sci Int* **1999**;106: 157-162.
- 34) Enhelhart D A y col., Evaluation of an onsite alcohol testing device for use in postmortem forensic toxicology. *J Anal Toxicol* **2001**;25 : 612- 615.
- 35) Hardin G. Postmortem blood and vitreous humor ethanol concentrations in a victim of a fatal motor vehicle crash. *J Forensic Sci* **2002**;47: 402-403.
- 36) Spinosa M B, Cinira S M. Automated headspace solid-phase micro-extraction and capillary gas chromatography analysis of ethanol in postmortem specimens. *Forensic Sci Int* **2002**;128: 115-119.
- 37) Leahy M S, Farber E R. Postmortem chemistry of human vitreous humor. *J Forensic Sci* **1967**;12: 214-222.
- 38) Cooper W C. Immunochemical analysis of vitreous and subretinal fluid. *Invest. Ophthal* **1963**;2: 369-372.
- 39) Coe M D. Postmortem chemistries on human vitreous humor. *Am J Clin Pathol* **1969**;51: 741-749.
- 40) Coe J I. Use of chemical determinations on vitreous humor in forensic pathology. *J Forensic Sci* **1972**;17: 541-546.
- 41) Coe J I. Postmortem chemistry: practical considerations and a review of the literature. *J Forensic Sci* **1974**;19: 13-32.
- 42) Erdei Z, Vass Z. Chromatographic investigation of free amino acids of the vitreous body. *Acta Ophthalmologica* **1967**;45; 22-24.

- 43) Sturner W Q. Osmolality and other chemical determinations in postmortem human vitreous humor. *J Forensic Sci* **1972**;17: 387-393.
- 44) Lie J T. Changes of potassium concentration in the vitreous humor after death. *Am J Medical Sci* **1967**: 136-143.
- 45) Muñoz y col., A new perspective in the estimation of postmortem interval (PMI) based on vitreous [K⁺]. *J Forensic Sci* **2001**;46: 209-214.
- 46) Blumenfeld T A, y col., Postmortem vitreous humor chemistry in sudden infant death syndrome and in other causes of death in childhood. *Am J Clin Pathol* **1979**;71: 219-223.
- 47) Devgun M S, Dunbar J A. Biochemical investigation of vitreous: applications in forensic medicine, especially in relation to alcohol. *Forensic Sci Int* **1986**;31: 27-34.
- 48) Klatt E C, Noguchi T T. AIDS and infection control in forensic investigation. *Am J Forensic Med Pathol* **1990**;11: 44.
- 49) Karhunen P J, y col., Stability of human immunodeficiency virus (HIV) antibodies in postmortem samples. *J Forensic Sci* **1994**;39: 129.
- 50) O'Neal C L, Poklis A. Postmortem production of ethanol and factors that influence interpretation. A critical review. *Am J Forensic Med Path* **1996**; 17: 8-20.
- 51) Hentsch R, Muller H P. Tier experimentelle Untersuchungen über die Konzentration von peroral zugeführtem Ethanol in Blut und Glaskörper. *Arch Klin Exp Ophthalmol* **1965**;168: 330-334.
- 52) Chao T C, Lo D S. Relationship between postmortem blood and vitreous humor ethanol levels. *Am J Forensic Med Pathol* **1993**;14: 303-308.
- 53) Kraut A. Vitreous humor / blood and urine / blood alcohol ratios as an aid to the forensic investigator, Part I: methodology. *Can Soc For Sci J* **1984**;17: 91-97.
- 54) Kraut A. Vitreous humor / blood and urine / blood alcohol ratios as an aid to the forensic investigator, Part II: methodology. *Can Soc For Sci J* **1984**;17: 159-166.

- 55) Gilliland M G, Bost R O. Alcohol in decomposed bodies: postmortem synthesis and distribution. *J Forensic Sci* **1993**;38: 1266 -1274.
- 56) Devgun M S, Dunbar J A. Post-mortem estimation of gamma-glutamyl transferase in vitreous humor and its association with chronic abuse of alcohol and road-traffic deaths. *Forensic Sci Int* **1985**;28: 179-180.
- 57) Ferslew K E, Hagardorn A N. Application of micelar electrokinetic capillary chromatography to forensic analysis of barbiturates in biological fluids. *J Forensic Sci* **1995**;40: 245-249.
- 58) Sadler D W, Pounder D J. Postmortem markers of chronic alcoholism. *Forensic Sci Int* **1996**;82: 153-163.
- 59) Osuna E, y col., Vitreous humor carbohydrate-deficient transferrin concentrations in the postmortem diagnosis of alcoholism. *Forensic Sci Int* **2000**;108: 205-213.
- 60) Bost R O. Analytical toxicology of vitreous humor. *Handbook of Analytical Therapeutic Drug Monitoring and Toxicology* **1997**: 281-299.
- 61) Jaffe F. Chemical postmortem changes in the intra-ocular fluid. *J Forensic Sci* **1962**;7: 231-237.
- 62) Sturner W Q, Garriot J C. Comparative toxicology in vitreous humor and blood. *J Forensic Sci* **1975**;6: 31-39.
- 63) Backer R C, Pisano R V. The comparison of alcohol concentrations in postmortem fluids and tissues. *J Forensic Sci* **1980**;25: 327-331.
- 64) Coe J I, Apple F S. Variations in vitreous humor chemical values as a result of instrumentation. *J Forensic Sci* **1985**;30: 828-835.
- 65) Pounder D J, Carson D O. Electrolyte concentration differences between left and right vitreous humor samples. *J Forensic Sci* **1998**;43: 604: 607.