



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

TESINA:

INTOXICACIÓN POR CARBAMAZEPINA

PRESENTADA POR:

CITLALLI ITZEL GONZÁLEZ MACEDO

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIOLÓGICO

ASESOR: M. EN C. VALENTIN ISLAS PÉREZ

11 de abril de 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

ÍNDICE DE CONTENIDO

1. RESUMEN	4
2. INTRODUCCIÓN	5
3. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN	7
4. OBJETIVOS	9
5. METODOLOGÍA	10
6. GENERALIDADES CARBAMAZEPINA	11
6.1. Clasificación de Medicamentos (Carbamazepina).....	11
6.2. Usos de Carbamazepina	12
6.3. Propiedades químicas	15
6.4. Farmacocinética.....	16
6.5. Farmacodinamia	19
7. TOXICOLOGÍA DE CARBAMAZEPINA	21
7.1. Intoxicación por Carbamazepina	21
7.2. Efecto Tóxico	23
7.3. Toxicocinética	23
7.5. Efectos Adversos	24
7.6. Interacciones Farmacológicas:.....	25
8. DETERMINACIÓN DE CARBAMAZEPINA	27
8.1. Métodos Cualitativos:.....	27
8.1.1. Puebas Colorimétricas	27
8.1.2. Cromatografía en Capa Delgada	28
8.2. Métodos Cuantitativos	28
8.3. Inmunoensayo.....	29
8.3.1. Inmunoensayo por Polarización de Fluorescencia (FPIA)	30
8.3.2. Enzimoanálisis.....	32
8.3.3. EMIT (Inmunoanálisis de Multiplicación Enzimática)	33
8.3.4. CEDIA (Inmunoanálisis por Clonado de Dador).....	33
8.3.5. Quimioluminiscencia	34
8.4. Cromatografía	35
8.4.1. Cromatografía de Gases	36

8.4.2. Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR)	37
8.5. Espectrometría de Masas	42
9. ASPECTOS FORENSES.....	48
9.1. Tipos de muestras o indicios a recolectar	48
9.2. Tipos de pruebas recolectadas en la escena	50
9.3. Muestras de fluidos y tejidos biológicos	51
9.4. Casos de Carbamazepina Post Mortem	54
10. ANÁLISIS DE INVESTIGACIÓN	60
11. CONCLUSIONES	63
12. GLOSARIO	65
13. ABREVIATURAS.....	71

1. RESUMEN

La intoxicación por medicamentos es un problema frecuente ocasionado por el mal uso y/o abuso de ellos. Este problema se presenta sobre todo, en casos de medicamentos usados para el tratamiento de enfermedades como: epilepsia y enfermedad del trigémino, entre otras; la Carbamazepina, es considerada dentro de un grupo de medicamentos como primera opción en algunos de estos casos debido a que se ha comprobado que causa menos reacciones adversas; sin embargo, también tiene otros usos en casos de demencia o conductas violentas, síndrome de abstinencia al alcohol. Cabe mencionar que no solo se emplea en el tratamiento de tales padecimientos, también se usa para cometer actos ilícitos o delitos en contra de la salud en los que se puede hablar de la muerte de un ser humano sea provocada o accidental ya que tiene propiedades depresoras del Sistema Nervioso Central.

Por ello el presente trabajo de investigación engloba las características terapéuticas y toxicológicas de la Carbamazepina, así como, los métodos de análisis en muestras biológicas para que sea de utilidad en la indagación y esclarecimiento de algún acto ilícito accidental o provocado para obtener un buen diagnóstico clínico acerca de la intoxicación por sustancias químicas y también la monitorización de la terapia.

Se realiza una recopilación con la finalidad de que la información de este medicamento en particular se encuentre al alcance de cualquiera que la requiriera.

Finalmente en el campo de la Química Forense, Medicina y en la materia legal es necesaria la investigación de las causas de la intoxicación, sobredosis o muerte de sustancias peligrosas para la salud, los probables efectos que producirá y en caso de muerte los exámenes post-mortem con el fin de obtener, de una manera rápida, segura y confiable toda la información necesaria en caso de que se presente un evento de este tipo.

2. INTRODUCCIÓN

El abuso en el consumo de fármacos y la farmacodependencia son un problema de nuestro tiempo que afecta primordialmente a los adolescentes y adultos que forman parte de los núcleos urbanos. Es una situación creciente que ha traspasado el umbral de la problemática individual para instalarse en el ámbito social y repercutir sobre la salud pública de las naciones.

Innegable es el hecho de que la disponibilidad de fármacos causantes de dependencia es una condición previa indispensable para su consumo con fines no terapéuticos y, por lo tanto, para la aparición de problemas relacionados con su uso.

En la actualidad el autoconsumo de medicamentos se ha vuelto un problema de Salud Pública en el país, al cual se debe poner atención, debido a que el mal uso y abuso de éstos puede provocar daños severos a la salud e incluso hasta la muerte, de la población en general.

Aunque en la Ley General de Salud está bien establecido que la dispensación de medicamentos controlados debe ser con receta médica, sin embargo, se ha visto que no hay un control puntual en este aspecto, ya que la población puede tener acceso sin restricción alguna a ciertos tipos de medicamentos como lo es la Carbamazepina, ya que en farmacias de uso popular se venden medicamentos sin receta.

En especial el consumo de este fármaco se da en pacientes epilépticos y otros trastornos mentales, ya que está prescrita para este tipo de padecimiento mental. Esta situación ha fomentado e incrementado el uso y abuso de Carbamazepina en intentos suicidas y focos de violencia.

Las razones del uso terapéutico de fármacos por el hombre puede parecer sencillo: la prevención o el tratamiento de enfermedades. El porqué del abuso de fármacos es más difícil de definir, aunque se pueden identificar algunos factores que lo facilitan: la búsqueda de placer, el alivio de la tensión o el estrés, para escapar de una realidad agobiante, por presión social, etcétera y se ha convertido en problema social grave que no distingue países, grados de desarrollo económico, clases sociales o religiones, es responsable no sólo de la muerte de cientos de miles de personas cada año, sino también

de la miseria a la que condena a la familia, al pasar por la desnutrición y las malformaciones congénitas de su descendencia.

¿Cuáles son los factores que hacen que una persona abuse de un fármaco? Sin duda se trata de una mezcla compleja de factores genéticos, individuales y sociales que se combinan en forma diferente para producir las distintas fases del proceso de dependencia farmacológica. Es decir, los factores que hacen que una persona pruebe por primera vez un fármaco no son los mismos que los que la inducirán a continuar consumiéndola o a cambiar a otros fármacos más fuertes.¹

El mundo moderno se mueve hacia vertientes cada vez más exigentes en lo que respecta al consumo de sustancias consideradas como estupefacientes, día a día surgen nuevas sustancias que generan los efectos deseados por los farmacodependientes. Estados Unidos es el mayor consumidor de sustancias prohibidas del mundo, mientras que Europa se mueve hacia la misma dirección, se estima que cada año muere un número significativo de personas a causa de los efectos de estas sustancias, mientras que otras se suman al consumo de ellas. En América Latina muchos de sus hijos mueren o son esclavizados por estas sustancias, mientras que los gobiernos de turno hacen caso omiso a esta situación.¹

3. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

Planteamiento del problema

La Carbamazepina es uno de los anticonvulsivos más utilizados en la clínica. Su disponibilidad en muchos hogares ha sido motivo de numerosas intoxicaciones accidentales en niños y con fines suicidas en adolescentes, esto ha provocado que en la Ciudad de México, más del 70% de las intoxicaciones son causadas por medicamentos. El primer lugar lo ocupan los analgésicos, le siguen los anticonvulsivos, los anticolinérgicos, los antihistamínicos y otros más. En años recientes se han agregado intoxicaciones agudas originadas por medicamentos homeopáticos

Debido a que la Carbamazepina es un depresor del Sistema Nervioso Central los casos de intoxicación con este fármaco se deben tener presentes en el campo Forense, ya que bajo los efectos de este fármaco se pueden cometer actos ilícitos o incluso provocar algún accidente que provoque algún daño a terceros. Aunque existe información al respecto de sobredosis de Carbamazepina, esta se encuentra dispersa o no es fácilmente accesible por lo cual su disponibilidad constituye un problema que trasciende al laboratorio para determinar su presencia en las muestras recolectadas, por tal razón es importante recopilar y analizar toda la información concerniente a la Carbamazepina respecto a su farmacología y su determinación química.

En el laboratorio Forense es importante tener los medios necesarios para determinar fármacos en las muestras recolectadas, sin embargo, no todos cuentan con los equipos, por esto es que se deben conocer los métodos más eficaces y confiables para la identificación dando a los peritos Químicos opciones a elegir entre técnica y método.

Tener la información correspondiente para la determinación forense de Carbamazepina resulta importante, porque permite evaluar y seleccionar los métodos más eficaces y confiables para identificación de este fármaco y predecir la viabilidad de su ejecución en el laboratorio forense

Justificación

Es importante hacer una investigación de éste fármaco, con la finalidad de elaborar un documento que integre todos los aspectos relacionados con la Carbamazepina, accesible a todos los profesionales que tengan que ver con la determinación de este fármaco en casos de intoxicación (principalmente médicos y químicos) por eso es importante llevar a cabo este proyecto y ponerlo a disposición de los interesados en este tema.

4. OBJETIVOS

Objetivo primario:

- Elaborar una recopilación e investigación de la Carbamazepina que contenga aspectos toxicológicos y Métodos de Cuantificación en sangre con la finalidad de utilizar la información en casos forenses.

Objetivos secundarios

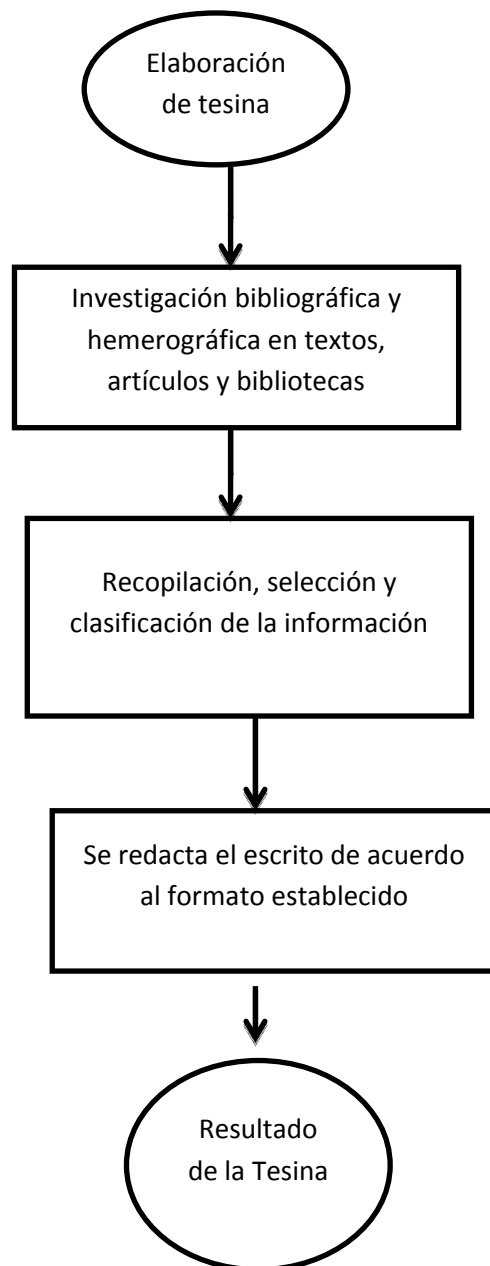
- Describir las propiedades terapéuticas, toxicológicas y reacciones adversas causadas por la Carbamazepina
- Comparar los métodos más usados para la identificación de Carbamazepina en sangre para determinar su confiabilidad
- Establecer las condiciones más adecuadas para las identificaciones preliminares y confirmatorias de Carbamazepina en casos de Intoxicación por Carbamazepina.

5. METODOLOGÍA

Se realizó una investigación bibliográfica en libros de consulta, artículos publicados y de revisión sobre el uso de la Carbamazepina y sus casos de intoxicación. Así también se recopilaron y se analizaron minuciosamente los principales métodos que se usan para la determinación química de Carbamazepina.

El presente proyecto de estudio es una investigación retrospectiva y longitudinal que se llevará a cabo en las siguientes etapas:

Diagrama de flujo



6. GENERALIDADES CARBAMAZEPINA

6.1. Clasificación de Medicamentos (Carbamazepina)

La distribución, almacenamiento y venta de medicamentos está regulada por principios basados en el riesgo a la salud pública. Debido a su consumo, existe la posibilidad que causen adicción o tengan riesgos de toxicidad a dosis ligeramente por encima de las usuales, por lo que es necesario efectuar la distribución, almacenamiento, venta o dispensación, basados en la clasificación de La Ley General de Salud. Por lo anterior señalado se elaboran dos clasificaciones: una por la necesidad de contar con un tipo de receta y condiciones especiales para su almacenamiento según al grupo que pertenezca y la otra por su acción terapéutica.²

Basándose en la Ley General de Salud el Artículo 245. En relación con las medidas de control y vigilancia que deberán adoptar las autoridades sanitarias, las sustancias psicotrópicas se clasifican en cinco grupos; la Carbamazepina pertenece al grupo IV.

- I. Las que tienen valor terapéutico escaso o nulo y que, por ser susceptibles de uso indebido o abuso constituyen un problema especialmente grave para la salud pública.
- II. Las que tienen algún valor terapéutico, pero constituyen un problema grave para la salud pública.
- III. Las que tienen valor terapéutico, pero constituyen un problema para la salud pública.
- IV. Las que tienen amplios usos terapéuticos y constituyen un problema menor para la salud pública
- V. Las que carecen de valor terapéutico y se utilizan corrientemente en la industria, mismas que se determinarán en las disposiciones reglamentarias correspondientes.²

Esto quiere decir que para su venta se requiere receta médica, pero que se puede dispensar las veces que sea necesario, sin retener la receta en la farmacia.²

6.2. Usos de Carbamazepina

De acuerdo a datos del Instituto de Neurología la intoxicación por Carbamazepina es un problema que se presenta de manera recurrente, en pacientes epilépticos y con otros padecimientos como: retraso mental y depresión, quedando marcada esta situación en el campo clínico; sin embargo, como intoxicación por el medicamento en cuestión no se hace un diagnóstico ya que se opta por cambiar el tratamiento farmacológico ante algún problema con el paciente.³

El uso ilegal de éste medicamento, se da en ilícitos financieros en donde el fármaco se utiliza como sedante y bajo ese efecto un individuo puede ser obligado a cometer acciones contra su voluntad, como: firma de documentos, sometimiento a una víctima de violación.

La Epilepsia es uno de los trastornos neurológicos más frecuentes y crónicos que afectan a cincuenta millones de personas en el mundo, de los cuales el 80% viven en países en desarrollo; las pobres condiciones de vida han provocado que la edad más frecuente de aparición sea la infancia y adolescencia. En países en desarrollo como México los niños están más expuestos a lesiones perinatales e inadecuado control pre y posnatal. El retraso mental y la parálisis cerebral se asocian con frecuencia a dichos problemas de salud, lo cual es responsable de secuelas neurológicas como la epilepsia.⁴

En el tratamiento en monoterapia los medicamentos empleados con frecuencia son: ácido Valpróico y Carbamazepina⁴

La epilepsia es un trastorno neurológico crónico que afecta a las personas de todas las edades.⁵

Se estima que la epilepsia afecta a 50 millones de personas en todo el mundo y la proporción estimada de la población general con epilepsia activa en un momento dado es del 4 al 10 por 1000 personas. En los Estados Unidos, aproximadamente 2,7 millones de personas sufren de epilepsia activa. Las personas con epilepsia tienen un mayor riesgo de muerte prematura a 2-3 veces la de la población general.⁵

Las causas de muerte en las personas con epilepsia pueden clasificarse en 3 grupos: las muertes que no están relacionadas con la epilepsia, las que ocurren como resultado de la causa de la epilepsia, y aquellos en los que la propia epilepsia es la causa de la muerte. Las muertes atribuidas a la propia epilepsia incluyen las muertes relacionadas con las convulsiones, tales como muertes que ocurren en el estado epiléptico y los accidentes causados por convulsiones tales como: ahogamiento, quemaduras y accidentes de tráfico, el suicidio, el tratamiento y la muerte súbita inesperada en epilepsia.⁶

Estudios recientes han identificado la muerte súbita inesperada en epilepsia como causa principal de muerte en las personas con epilepsia, que representa hasta un 17% de todas las muertes en esta población.⁶

La Carbamazepina, además de otras aplicaciones terapéuticas, especialmente para el control de las crisis tónico – clónicas (convulsiones) y crisis parciales en niños y adultos, es ampliamente aplicada en el tratamiento de desintoxicación para pacientes dependientes del alcohol y en el tratamiento del síndrome de abstinencia, y es una alternativa a las benzodiazepinas.⁷

La Carbamazepina (CBZ) es en la actualidad el fármaco más utilizado en el tratamiento de la epilepsia que cursan con crisis parciales, simples o complejas, y generalizadas tónico-clónicas, tanto en adultos como en niños. La principal ventaja de este fármaco frente a otros antiepilépticos tradicionales, es la menor incidencia de efectos indeseables de tipo cognitivo y conductual. Además, la CBZ se utiliza en el tratamiento de la neuralgia del trigémino y de algunos trastornos afectivos y de conducta.^{8,9}

La Carbamazepina fue utilizada inicialmente en el tratamiento de la Neuralgia del Trigémino y se aprobó su uso como fármaco antiepiléptico a partir de 1974. Es útil en el control de las crisis tónico-clónicas generalizadas y de las crisis parciales simples y complejas. Su utilización ha ido en aumento en los últimos años. La mayor disponibilidad determinó un aumento del número de intoxicaciones agudas por este fármaco, de causa accidental o intencional.

La Carbamazepina está relacionada químicamente con los antidepresivos tricíclicos y es utilizada también en el tratamiento de pacientes con síndrome bipolar.

Su mecanismo de acción es similar al de la fenitoína: bloqueo de los canales de sodio voltaje dependientes que produce inhibición en el foco epiléptico y en zonas adyacentes. Es además un potente agente anticolinérgico que actúa a nivel de los receptores muscarínicos y nicotínicos.⁹

Otros usos en los que también ha demostrado ser eficaz son: los trastornos bipolares, alteraciones afectivas o de la conducta y esclerosis múltiple. Para el tratamiento de las crisis parciales con o sin generalización secundaria, es considerado el fármaco de primera elección por su menor toxicidad. En comparación con fenobarbital, fenitoína y primidona, es el que produce menor afectación de la función cognitiva y menores alteraciones de la conducta.

No obstante que existe una buena relación entre las concentraciones sanguíneas de CBZ y el efecto farmacológico, el grado de correlación entre las dosis administradas de CBZ y las concentraciones séricas alcanzadas es bajo, como consecuencia de la gran variabilidad interindividual en la biotransformación del fármaco. Esta variabilidad puede ser atribuida a un fenómeno de autoinducción del metabolismo, posiblemente influido por la magnitud de la dosis, por las características fisiopatológicas del paciente, o bien como consecuencia de las interacciones causadas por la acción de otros fármacos que se tienen que asociar frecuentemente en caso de epilepsias refractarias para conseguir un mejor control de las crisis. Este hecho unido a la estrecha ventana terapéutica de la CBZ (4-12 mg/L) dificulta el establecimiento *a priori* de pautas de dosificación que permitan obtener una respuesta óptima en el paciente, evitando riesgos innecesarios de sobredosificación.^{8,9}

La Carbamazepina, es el primer anticonvulsivo usado en trastorno bipolar, fue reconocido como un medicamento útil en la década de 1970.¹⁰

Las enfermedades mentales son ahora reconocidas como una fuente principal de morbilidad y mortalidad entre personas jóvenes. De acuerdo a estudios realizados por la OMS, en América Latina y el Caribe se calcula que 17 millones de niñas y niños de 4 a 16 años sufren de algún trastorno psiquiátrico que amerita atención. Estudios realizados en México reportan alrededor de 15% de prevalencia de trastornos psiquiátricos en niños. Los datos epidemiológicos nacionales recientes indican una alta prevalencia de trastornos hiperkinéticos asociados al déficit de atención, trastornos mentales debidos a lesión o enfermedad médica y retraso mental.

Se observa también un incremento en la tendencia al consumo de fármacos y alcohol, y una mayor incidencia en depresión, intentos suicidas y violencia.¹¹

6.3. Propiedades químicas

Es un polvo blanco amarillento cristalino con un punto de fusión entre 189-193 °C.

Es prácticamente insoluble en agua y éter, soluble 1 en 10 de alcohol y en 1 en 10 de cloroformo, soluble en acetona.

Su fórmula molecular es C₁₅H₁₂N₂O. Posee un peso molecular igual a 236,27 g/mol y un valor de pKa entre 0,82 y 1,43.

Su nombre químico es: 5H-dibenzo-[b,f]-azepina-5-carboxamida.

La estructura química es la siguiente:

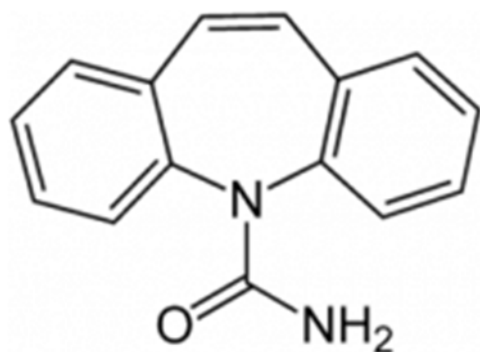


Figura 1. Es un derivado dibenzoazepinaiminoestilbeno (5H-dibenz[b, f]azepino-5-carboxamida), de estructura química similar a la imipramina.¹²

6.4. Farmacocinética

Absorción: por vía oral su absorción es aceptable, pero lenta en comparación con otros fármacos. Así, se comprueba que la vida media de absorción es de alrededor de 3 ó más horas, absorbiéndose solo entre el 60 y el 85% de la cantidad total administrada.¹³

Distribución: Es un compuesto lipofílico que se absorbe lentamente en el tracto gastrointestinal y se distribuye rápidamente a todos los tejidos y los órganos de una manera uniforme.

De haber reportes de distribución en que la Carbamazepina se absorba por completo, el volumen aparente de distribución oscila desde 0.8 a 1.9 l/kg. La Carbamazepina atraviesa la barrera placentaria. La Carbamazepina se une a proteínas plasmáticas entre 70 y 80%. La concentración de la sustancia inalterada en el líquido cefalorraquídeo y la saliva es un reflejo de la porción no unida a proteínas en el plasma (entre 20 y 30%). Las concentraciones en la leche materna resultaron equivalentes entre 25% y 60% de los niveles plasmáticos correspondientes.¹⁴

La Carbamazepina se difunde bien al líquido cefalorraquídeo, fluidos duodenales, bilis, saliva y leche. Sin embargo, el monitoreo de este fármaco se realiza en plasma y suero. La determinación de niveles de fármacos en saliva presenta ventajas considerables, como son que la recolección de la muestra es fácil y no invasiva, logrando así una mayor adherencia de los pacientes a los controles de niveles de sus medicamentos. En niños, el muestrear en saliva no pone en riesgo la relación médico-paciente, la que se puede ver afectada al enfrentar al niño a tomas de muestras de sangre. Otra ventaja de usar saliva como fluido de muestra es que permite detectar la fracción libre de un fármaco (no unida a proteína), lo que es importante, ya que su acción terapéutica depende de esta fracción.¹⁵

Biodisponibilidad: Respecto a sus características farmacocinéticas su biodisponibilidad oral es variable ($f=0,85-0,9$), con diferencias importantes entre individuos (edad, horario de administración, administración con o sin alimento) y entre preparados farmacéuticos. El tiempo que tarda en alcanzarse la concentración plasmática máxima es de 2-6 horas tras dosis múltiples y hasta 24-30 horas tras una sola dosis o en caso de sobredosificación. Esta diferencia se debe a la mayor velocidad de eliminación tras la administración de dosis múltiples. Carbamazepina, al ser una molécula muy lipófila, se distribuye ampliamente en el tejido adiposo siguiendo un modelo monocompartmental. Su volumen de distribución varía entre 0,8 y 1,9 L/kg y la unión a proteínas plasmáticas es del 70-80%. Se elimina

principalmente por metabolización hepática a cargo de isoenzimas del citocromo P450 (CYP3A4), produciéndose varios metabolitos importantes como la 10,11-epoxiCarbamazepina, que es un metabolito activo.

Por un fenómeno de autoinducción de la epoxidación, la Carbamazepina aumenta su propio metabolismo durante el primer mes de tratamiento, teniendo como consecuencia una semivida biológica menor tras la administración de una dosis única (20-50 horas) en el tratamiento crónico (11-27 horas) y un aumento del aclaramiento durante los días 17 a 32 tras el inicio del tratamiento, periodo en el que la autoinducción es mayor. Por tanto, la dosis de inicio será inferior a la de mantenimiento.

La concentración plasmática de Carbamazepina puede verse afectada por fármacos inhibidores o inductores de la isoenzima CYP3A4 del citocromo P-450, y además, la propia Carbamazepina es inductora enzimática de otros fármacos, lo cual requiere una especial atención en el caso de terapia concomitante con otros antiepilépticos u otros medicamentos.¹²

Tan sólo un 2% de la dosis de CBZ se elimina en la orina sin modificar, el resto de la dosis absorbida es metabolizada en el hígado y sus metabolitos se eliminan mayoritariamente por la orina y una pequeña parte en heces (2, 3). La dosis de mantenimiento recomendada es de 7-15 mg/kg/día para los adultos y de 11-40 mg/kg/día para los niños. Se han sugerido varios intervalos terapéuticos para Carbamazepina, los más aceptados son: 4-8 mcg/mL en politerapia y 8-12 mcg/mL en monoterapia ó 4-10 mcg/mL. Pocos pacientes responden a concentraciones inferiores a 4 mcg/mL y la mayoría experimentan efectos tóxicos con concentraciones superiores a 12 mcg/mL, aunque éstos pueden aparecer ya con concentraciones plasmáticas de 8 mcg/mL.¹³

Metabolismo: La Carbamazepina sufre una oxidación hepática y es eliminada en gran parte como metabolitos hidroxilados y conjugados en la orina y las heces.

El metabolismo se produce principalmente en el hígado a través del sistema de oxidasa Citocromo P-450, produciendo Carbamazepina-10,11-epóxido que es igualmente activo y puede llegar a niveles de hasta la mitad del de la Carbamazepina. Es convertida casi en su totalidad a la Carbamazepina-trans-10,11-dihidrodiol por epóxido hidrolasa antes de su excreción en la orina (Fig. 2). El epóxido es 50%

unido a las proteínas en el plasma, la Carbamazepina induce enzimas hepáticas, mejorando así su propio metabolismo.

Por lo tanto, la vida media de una sola dosis oral cae de 20 horas a tres semanas y a 12 horas después de varios meses. La vida media se reduce en pacientes que al mismo tiempo toman otros inductores de enzimas hepáticas como fenobarbital, fenitoína o alcohol. La Carbamazepina también mejora el metabolismo de los fenitoína y warfarina por la misma razón.¹⁶

El fármaco se metaboliza a través de CYP 3A4 y por lo tanto está sujeto a una multitud de interacciones con otros fármacos. Esto, junto con estrecho margen terapéutico del medicamento índice, necesita el uso de monitoreo de fármacos para la prevención de la concentracionestóxicas.¹⁶

La Carbamazepina se biotransforma en el hígado, donde la vía epoxídica es la más importante y produce el 10,11-transdiol derivado y el glucurónido correspondiente, como principales metabolitos.

El citocromo P-450 3A4 es la principal isoforma responsable de la formación del 10,11-epóxido de Carbamazepina farmacológicamente activo a partir de la Carbamazepina. El 9-hidroxi-metil-10-carbamoil acridano es un metabolito secundario relacionado con esta vía. Tras administrar la Carbamazepina por vía oral una sola vez, cerca de 30% se registra en la orina en forma de productos finales de la vía epoxídica. Otras vías importantes de biotransformación de la Carbamazepina producen distintos compuestos monohidroxilados, así como el N-glucurónido de Carbamazepina (por acción del polipéptido β7 de la familia 2 de las UDP-glucuronosiltransferasas o UGT2B7).^{12, 14}

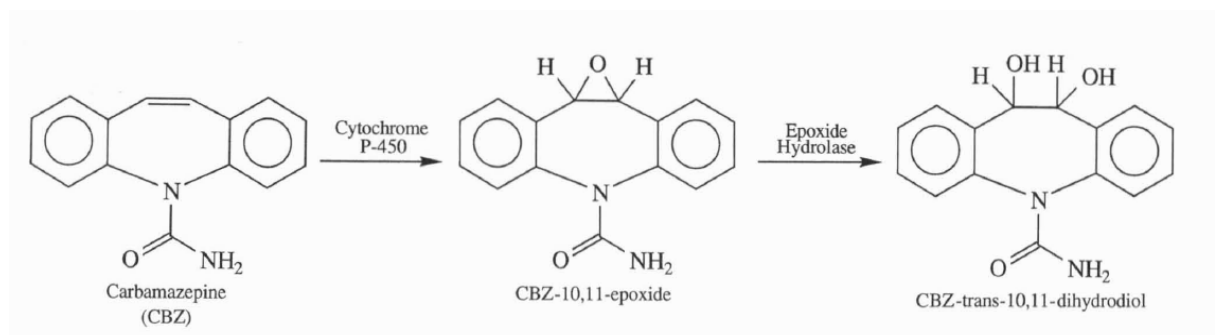


Figura 2. Biotransformación de la Carbamazepina y sus metabolitos¹⁶

Eliminación: La vida media de eliminación de la Carbamazepina sin cambio es de 36 horas en promedio, posterior a una dosis oral única donde con la administración repetida, es de 16 a 24 horas (autoinducción del sistema hepático monooxigenasa), dependiendo de la duración de la medicación. En los pacientes que reciben tratamiento simultáneo con otros fármacos inductores de enzimas hepáticas (por ejemplo, fenitoína, fenobarbital), se han encontrado valores de vida media en promedio de 9 a 10 horas.¹²

La vida media de eliminación del metabolito 10,11-epóxido de Carbamazepina en el plasma es de aproximadamente seis horas posteriores a la administración única de dicho epóxido por vía oral.

Después de la administración de una dosis oral única de 400 mg de Carbamazepina, 72% se excreta en la orina y 28% en las heces. En la orina, aproximadamente 2% de la dosis es recuperada sin cambio y alrededor de 1% en forma del metabolito farmacológicamente activo: 10,11-epóxido de Carbamazepina.

6.5. Farmacodinamia

El mecanismo de acción de la Carbamazepina sólo ha sido parcialmente dilucidado. La Carbamazepina estabiliza las membranas nerviosas hiperexcitadas, inhibe las descargas neuronales y reduce la propagación sináptica de los impulsos excitatorios. Es concebible que la prevención de descargas repetitivas de potenciales de acción dependientes de sodio en neuronas despolarizadas vía uso y bloqueo de los canales de sodio voltaje dependientes puede ser el principal mecanismo de acción.¹⁷ (Figura 3.)

El bloqueo de los canales de sodio y la reducción de la liberación de glutamato producirían la estabilización de la membrana neuronal, responsable de su acción antiepiléptica; los efectos antipsicóticos se deben a la reducción de la producción de dopamina y de la noradrenalina. La efectividad de su acción anticonvulsivante más importante es su acción sobre el efecto kindling de la actividad propagada de la amígdala.

El alivio del dolor puede ser debido al bloqueo de la transmisión sináptica en el núcleo trigémino. La

Carbamazepina posee adicionalmente propiedades anticolinérgicas, antiarrítmicas, relajantes musculares, sedantes y bloqueantes neuromusculares.

Su efecto en la manía estaría mediado a través de la disminución de AMPc, que está aumentado en este trastorno.¹⁴

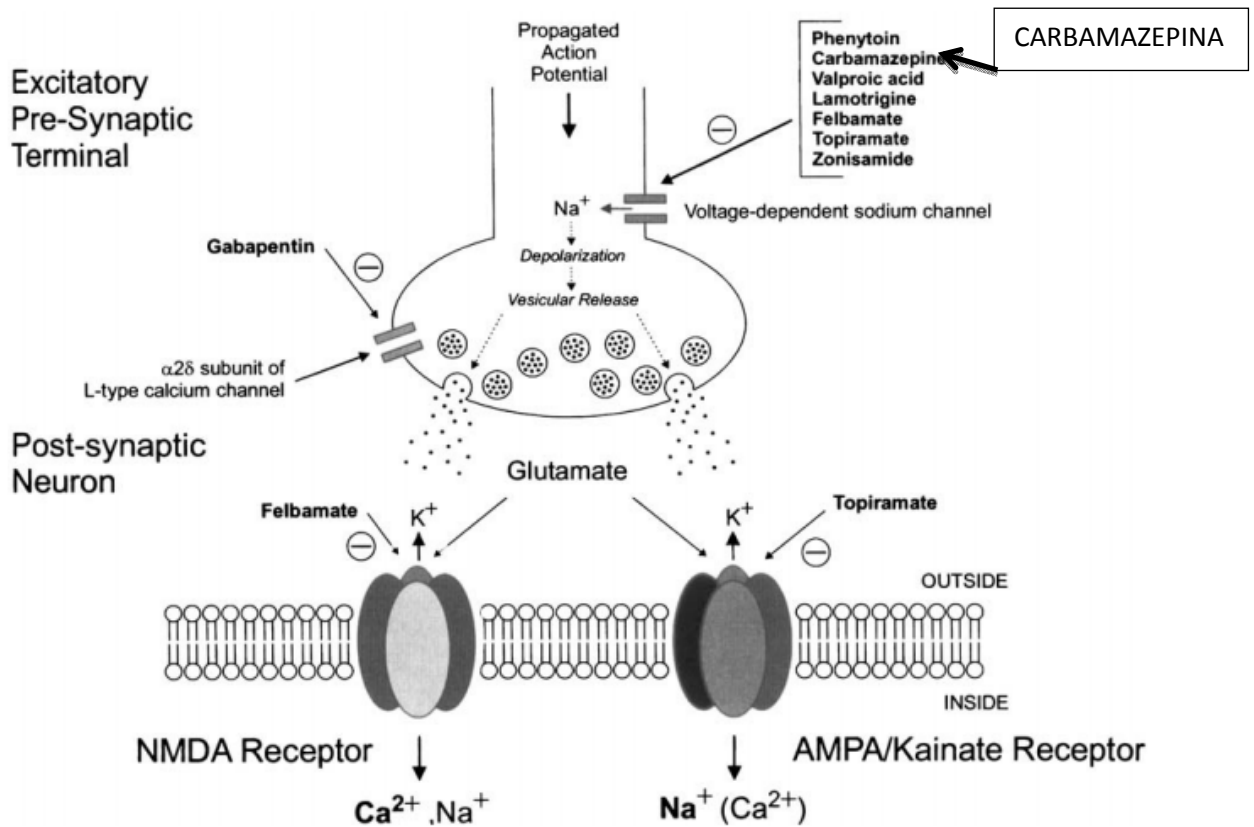


Figura 3. Diagrama esquemático de una sinapsis excitatoria en el sistema nervioso central, y los sitios principales de acción de diversos fármacos antiepilépticos (FAE). De NMDA, N-metil-D-aspartato; AMPA, ácido-5-methyl-4-isoxazolepropionic un-amino-3-hidroxi. postsináptica¹⁷

Mientras que la reducción en la liberación de glutamato y la estabilización de las membranas neuronales pueden explicar en gran medida los efectos antiepilépticos, el efecto depresor sobre el recambio de dopamina y noradrenalina podría ser responsable de las propiedades antimaniacas de la Carbamazepina.

7. TOXICOLOGÍA DE CARBAMAZEPINA

7.1. Intoxicación por Carbamazepina

Todas las personas que son expuestas de forma aguda a un tóxico o una fármaco deben ser sometidos a una rápida valoración clínica de sus funciones vitales (cardiorrespiratoria y neurológica), a un apoyo sintomático de aquellas funciones que se encuentren comprometidas y, en caso necesario, a unas medidas de tratamiento específico (antídotos) y de descontaminación.

Aunque el perito Químico debe intentar siempre identificar el tóxico responsable, su búsqueda no debe retrasar nunca el inicio de estas medidas terapéuticas que pueden ser vitales para la víctima afectada.⁹

La acción de un agente tóxico sobre un organismo se traduce en una alteración del estado fisiológico o de salud; por tanto, una intoxicación es una enfermedad. Según el grado de afectación del individuo, la intoxicación puede calificarse como leve, moderada y/o severa o grave. También puede ser considerada bajo un criterio patocrónico, es decir, estimando su curso o evolución en función del tiempo, así podemos clasificarlas de intoxicaciones agudas, crónicas y recaídas.²³

El efecto tóxico de la Carbamazepina está relacionado con su acción anticolinérgica. Su estructura similar a los antidepresivos tricíclicos podría ser el causante de las convulsiones y posibles alteraciones cardíacas provocadas por la sobredosis de Carbamazepina. Deprime la actividad en el núcleo central del tálamo o disminuye la transmisión sináptica o disminuye la sensación temporal de estímulos limitando el refuerzo de sodio a través de la membrana celular.²⁴

Las intoxicaciones mixtas con Carbamazepina y etanol son particularmente peligrosas debido a la administración simultánea de Carbamazepina con otros medicamentos o después del consumo de alcohol puede dar lugar a interacciones que pueden tener efectos peligrosos. Este problema es particularmente importante entre los pacientes dependientes del alcohol. Debido a que el uso médico de Carbamazepina entre el adicto al alcohol es muy frecuente, puede existir un gran riesgo de ocurrencia de tales interacciones.⁷

Los casos de intoxicación por Carbamazepina ocurridos nos permiten establecer en 6 las posibles causas de dicha intoxicación.

Por orden de importancia en cuanto a frecuencia de presentación, las causas registradas son:

1. Intento de autolisis.: intento de suicidio con la ingesta de dosis por encima de las terapéuticas, en conjunto con algún otro depresor del Sistema Nervioso como las benzodiazepinas, alcohol y otros derivados de antidepresivos tricíclicos.

2. Semivida biológica aumentada: Se asocia a la ingestión de dosis terapéuticas del fármaco, debido a la variabilidad biológica de cada paciente en particular, existen factores que modifican esta situación como la edad, el sexo, masa corporal, entre otras.

3. Inicio de terapia: En todo inicio de terapia con algún fármaco de esta categoría se debe monitorizar ya que se pueden presentar signos y síntomas de intoxicación debido a que la acción enzimática de eliminación del fármaco aún no es activada.

4. Toma intencionada para aliviar síntomas de la enfermedad: En casos de ingesta por encima de las dosis recetadas, los pacientes creen aliviar el dolor si se toman más comprimidos y así aumentan el efecto del fármaco.

5. Prescripción de dosis elevadas: En este caso es evitable ya que el médico debe conocer las características farmacológicas y farmacocinéticas del medicamento en cuestión para evitar la intoxicación e iniciar con seguridad el tratamiento y evitar las posibles interacciones farmacológicas.

6. Disminución del volumen de distribución: Es común que la ingesta de varios medicamentos a la vez, (politerapia), se vea afectado el volumen de distribución y se disminuya debido que puede acumularse cierto fármaco por la inhibición del citocromo P-450 que es la vía metabólica de la Carbamazepina.¹³

7.2. Efecto Tóxico

En la intoxicación aguda por Carbamazepina las manifestaciones neurológicas son los hallazgos más frecuentes: letargia, nistagmus, ataxia, disartria y en casos más severos pueden presentarse coma y convulsiones.^{16, 20.}

La presencia de convulsiones se reporta entre 18% y 20% de los casos y se asocian con mayor severidad de la intoxicación.

La taquicardia sinusal constituye la manifestación cardiovascular más frecuente y se produce en respuesta a la acción del fármaco y su metabolito a nivel de los canales de sodio y por su acción anticolinérgica.

En dosis terapéutica la Carbamazepina no es arritmógena. Sin embargo, cuando se alcanzan niveles tóxicos 20 mg/L produce, al igual que los antidepresivos tricíclicos, bloqueo de canales de sodio a nivel cardíaco favoreciendo la presencia de arritmias. Por su acción anticolinérgica puede presentarse disminución del peristaltismo intestinal e íleon, lo cual debe tenerse en cuenta ya que la permanencia del fármaco en la luz intestinal favorece que su absorción sea lenta y errática.

De amplio uso como anticonvulsivante, pero también utilizado en neuralgia del trigémino y en algunos síndromes de dolor crónico (ej.: neuropatía diabética). La intoxicación no es frecuente y rara vez fatal.

7.3. Toxicocinética

Por su estructura se relaciona con los antidepresivos tricíclicos y con Hidantoína. Su absorción es errática y lenta por vía oral: concentración pico a las cuatro a ocho horas, pero puede demorarse más de 24 horas en ingestas masivas.²¹

Se distribuye rápidamente en todos los tejidos, se une a las proteínas plasmáticas en un 75%. 98% es metabolizado en CBZ10,11 epóxido, el cual tiene también efecto anticonvulsivante, y en CBZ diol, dependiendo de si se utiliza en forma crónica o no. Es importante tener en cuenta que dosis masivas pueden generar concreciones gástricas que prolongan el cuadro tóxico. Se elimina por la orina en un 70% y por las heces en un 28%.

7.4. Dosis: (Concentraciones en sangre)

Dosis terapéuticas: Adultos; hasta 1600 mg/día. Niños 30 mg/kg/día. Rango terapéutico 4-12 µg/mL como lo indica la Figura 4.

Niveles terapéuticos: 4-10 mg/L. Vida media: 20-65 horas.

Niveles tóxicos: superiores a 20 mg/L.²²

Dosis mínima letal: en adultos 5g. 40 µg/ml.

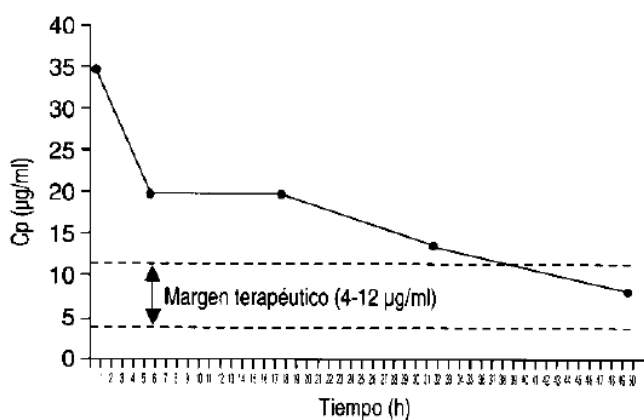


Figura 4 .Evolución de la concentración tóxica de Carbamazepina.²²

7.5. Efectos Adversos

Las reacciones adversas más graves de la Carbamazepina se han observado en el sistema hematopoyético, el hígado y el sistema cardiovascular.¹⁸

- **Sistema hematopoyético:** Anemia aplásica, agranulocitosis, pancitopenia, depresión de la médula ósea, trombocitopenia, leucopenia, eosinofilia, porfiria intermitente aguda.
- **Piel:** Rash eritematoso y pruriginoso, urticaria, necrólisis epidérmica tóxica (Síndrome de Lyell), Síndrome de Stevens-Johnson, reacciones de fotosensibilidad, trastornos de pigmentación, dermatitis exfoliativa, eritema multiforme y nodoso, púrpura, agravamiento de un lupus eritematoso diseminado, alopecia, diaforesis.¹⁹

➤ **Sistema nervioso:** Mareos, somnolencia, trastornos de coordinación, confusión, cefalea, fatiga, visión borrosa, alucinaciones visuales, diplopía transitoria, trastornos óculo-motores, nistagmus, trastornos del habla, movimientos involuntarios, neuritis periférica, parestesias, depresión con agitación, locuacidad, tinnitus, hiperacusia.

7.6. Interacciones Farmacológicas:

Cuando se administra conjuntamente con algunos medicamentos en específico modifican su metabolismo:

Aumenta	Inhibe (aumenta concentración sérica)	Disminuye
<ul style="list-style-type: none"> • Fenobarbital. • Benzodiacepina. • Hidantoína. 	<ul style="list-style-type: none"> • Eritromicina, • Propoxifeno. • Isoniacida. • Bloqueadores de Calcio • Cimetidina 	<ul style="list-style-type: none"> • Warfarina. • Doxiciclina. • Imipramina. • Anticonceptivas orales • Teofilina .

Tabla 1 Medicamentos que modifican el metabolismo de la Carbamazepina.

- Diagnóstico diferencial

Los casos leves de intoxicación pueden presentarse como hipoglicemia y/o abuso dealcohol.

Los casos severos de intoxicación pueden presentarse como sobredosis deantidepressivos tricíclicos. Debe descartarse trauma craneoencefálico.

- Diagnóstico de intoxicación por Carbamazepina.

Con sobredosis inicialmente se presenta ataxia, nistagmus, midriasis,taquicardia sinusal, confusión, excitación, agresividad, mareo y náuseas.

A las 2 horas aparecen: mioclonías, convulsiones, hipertermia, coma, depresión respiratoria, alteraciones cardiovasculares; hipotensión y disturbios del ritmo (extrasístoles ventriculares, prolongaciones de las ondas QRS y QT, bloqueo AV, sobre todo en pacientes ancianos).

Es importante destacar que la sintomatología puede aparecer varias horas después de la exposición tóxica.

- Diagnóstico de laboratorio

- Muestras de sangre para determinar niveles de Carbamazepina en la primera hora, repitiendo cada 4 a 6 horas. Bioquímica sanguínea: glicemia, electrolitos, y creatinina y nitrógeno ureico. En casos aislados de sobredosis han incluido leucocitosis, cuenta baja de leucocitos, glucosuria y acetonuria, aparición de anemia aplásica y agranulocitosis

- Electrocardiograma inicial; repetir si es necesario.

- Hay una correlación entre los niveles y las manifestaciones más importantes (Tabla 2).

Nivel (mg/mL)	Convulsión (%)	Coma (%)	Ventilación Mecánica (%)
<20	4	4	4
20<40	21	27	12
>40	33	100	100

Tabla 2 ²²Manifestaciones clínicas de acuerdo a los niveles de Carbamazepina.

En la intoxicación por Carbamazepina se puede actuar administrando una dosis de Carbón Activado (dosis iniciales de 30 g), monitorizando la función cardiorespiratoria y las concentraciones de Carbamazepina, así mismo, otros recursos terapéuticos que han sido ensayados en pacientes críticos, cuando fracasa el tratamiento convencional, son la hemoperfusión con carbón activado y la hemodiálisis.

8. DETERMINACIÓN DE CARBAMAZEPINA

En el laboratorio existen diversas formas y métodos para la identificación y cuantificación de fármacos, drogas y sustancias de interés, en cuanto a la Carbamazepina que es nuestro fármaco de interés existen:

8.1. Métodos Cualitativos:

8.1.1. Puebas Colorimétricas

Muestras biológicas

Contenido estomacal y residuos de la escena.

Reactivos

Solución acuosa de ácido clorhídrico (2 mol/L).

Reactivo de hipobromito de sodio.

Disolver 0,5 ml de bromo elemental cuidadosamente y enfriando en 5 ml de solución de hidróxido de sodio (400 g/l), recientemente preparada.

Procedimiento

Agregar en partes iguales la muestra y la solución de ácido clorhídrico (Relación 1:1) a 5 mL de cloroformo, mezclar por 1 minutos y centrifugar por 5 minutos.

Descartar la capa superior acuosa y agregar la capa clorofórmica a 0,2 mL de solución de hipobromito de sodio en un tubo limpio y mezclar por 30 segundos.

Resultados

Un color azul-violeta en la capa del cloroformo indica la presencia de carbamazepina.²⁸

Sensibilidad

250 mg/L.

8.1.2. Cromatografía en Capa Delgada

La Carbamazepina se puede detectar en cromatografía en capa delgada, utilizando como fase móvil los sistemas: CA:Metanol: Amoníaco (100:1.5), CC:Cloroformo:Metanol (90:10), y CE: Acetato de Etilo:Metanol:Amoníaco (85:10:5)

Revelado

Bajo luz UV: fluorescencia amarilla

Permanganato de potasio: positivo

Barrido al UV

En solución metanólica presenta dos máximos a 237 y 285 nm.²⁸ (Figura 5.)

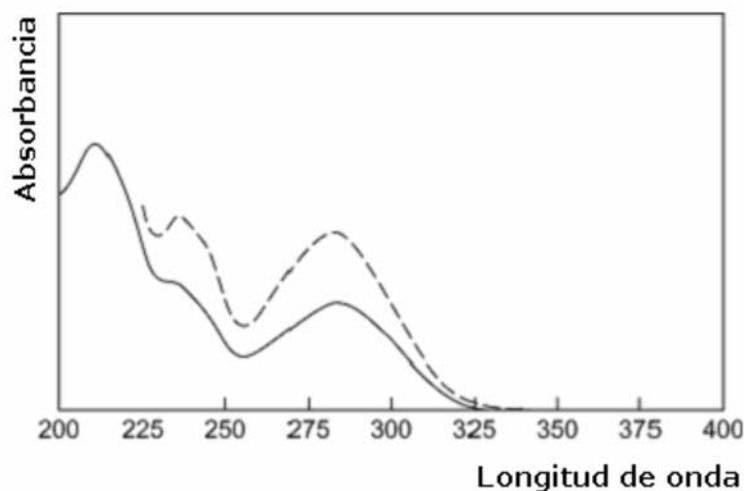


Figura5.Barrido al UV de la Carbamazepina

8.2. Métodos Cuantitativos

Existen diversos métodos de análisis para la identificación y cuantificación para los antiepilépticos, en general, las técnicas de inmunoanálisis que incluyen ensayos de polarización de fluorescencia (FPIA), ensayos inmunoenzimáticos (EMIT o CEDIA) y ensayos turbidimétricos (PETINIA, QMS) y ensayos de quimioluminiscencia (CMIA) son las más comúnmente empleadas en la práctica asistencial por su facilidad de uso y por la automatización en grandes plataformas de análisis que permiten la obtención de resultados con unos tiempos de respuesta cortos. Las técnicas cromatográficas, como la

cromatografía de gases y la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC), son técnicas más versátiles, sensibles y específicas, circunstancias que las sitúan como una alternativa a los inmunoanálisis de gran interés. No obstante, estas técnicas cromatográficas hasta el momento presentan limitaciones; como su elevado costo y la necesidad de personal altamente calificado. Además, suele ser necesario tratar las muestras biológicas antes de su inyección en el cromatógrafo. Así, los métodos de HPLC para antiepilépticos incluyen una extracción previa de las muestras bien a través de una precipitación, una extracción líquido-líquido o una extracción en fase sólida en cartuchos de extracción.

La incorporación de los detectores de masas-masas ha revolucionado el análisis de fármacos y la cromatografía.

Esto hace pensar en la cromatografía de gases acoplada a masas como la técnica idónea para su implantación en un futuro próximo en el laboratorio clínico; sin embargo, la necesidad de personal cualificado y su elevado coste suponen una importante limitación para su utilización en la práctica clínica asistencial. Esta es la principal razón por la que la HPLC junto con los métodos de inmunoanálisis siguen siendo las técnicas de referencia.²⁹

8.3. Inmunoensayo

El Inmunoensayo es una prueba que usa complejos de anticuerpo y antígeno como medio para generar un resultado perceptible. Un complejo anticuerpo:antígeno también es conocido como inmunocomplejo. “Inmuno” se refiere a una respuesta inmunológica que hace que el cuerpo genere anticuerpos, y “ensayo” se refiere a una prueba. Entonces, un inmunoensayo es una prueba que utiliza inmunocomplejos cuando se unen los anticuerpos y los antígenos.

Los Inmunoensayos se diferencian de otros tipos de pruebas de laboratorio, como las pruebas colorimétricas, ya que usan complejos anticuerpo:antígeno (Figura 6 y 7) para generar una señal que pueda medirse. En oposición, la mayoría de las pruebas de rutina de química clínica utilizan reacciones químicas entre el reactivo (solución de sustancias químicas u otros agentes) y la muestra del paciente para generar un resultado de la prueba.

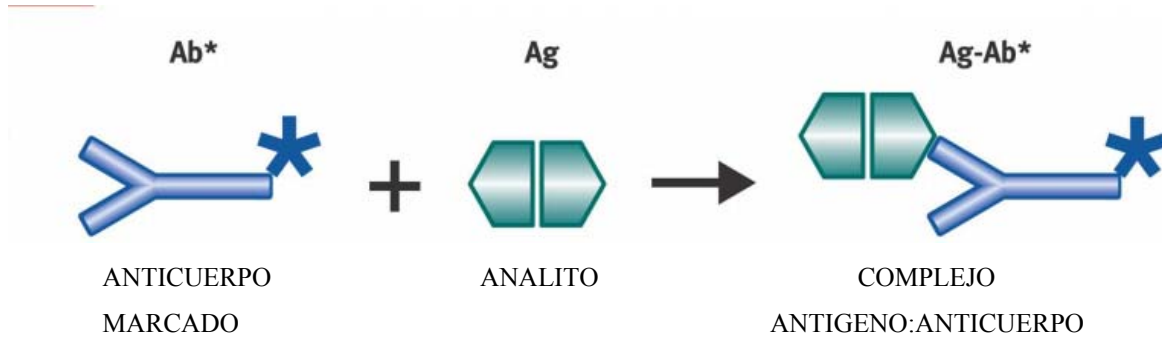


Figura 6. Los anticuerpos marcados permiten la detección de complejos antígeno/ anticuerpo en los Inmunoensayos.

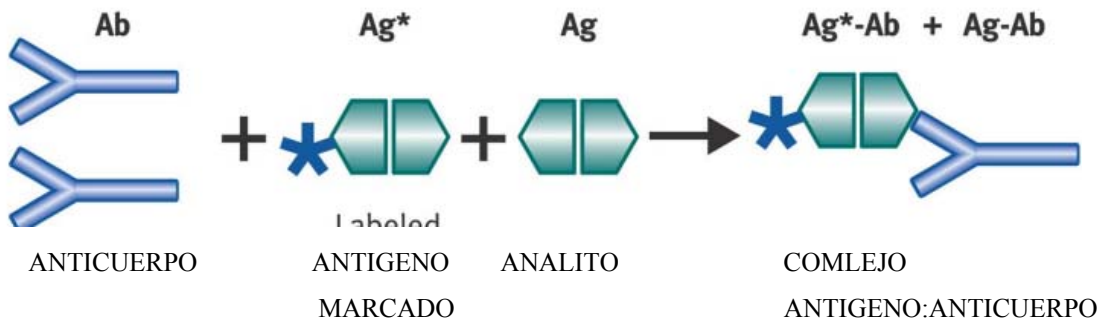


Figura 7. El antígeno marcado también permite la detección de complejos antígeno/anticuerpo en los Inmunoensayos.

TIPOS DE INMUNONSAYO

8.3.1. Inmunoensayo por Polarización de Fluorescencia (FPIA)

Es un tipo de inmunoensayo homogéneo competitivo por fluorescencia. Con la unión competitiva, el antígeno de una muestra y el reactivo marcado antígeno-fluoresceína (AgF) compiten por los puntos de unión en el anticuerpo. Como inmunoensayo homogéneo, la reacción se lleva a cabo en una solución de reacción simple, y el complejo Ab-AgF no requiere un paso de lavado para separarlo de la marca AgF “libre”. (Figura 8.)

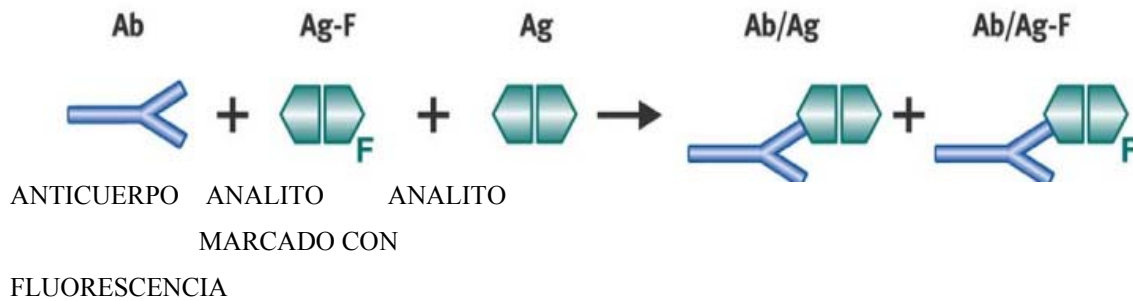


Figura 8. Inmunoensayo competitivo por polarización de fluorescencia (FPIA).

FPIA se utiliza para proporcionar una medición exacta y sensible de pequeños analitos de toxicología como pueden ser las drogas terapéuticas, y las drogas de abuso, toxicología y algunas hormonas.

El reactivo FPIA incluye:

S: Reactivo para anticuerpo: Antisero para analito

T: Indicador radioactivo (Tracer): analito marcado fluoresceína

P: Detergente para pretratamiento: facilita la liberación de la droga de las proteínas del suero.

Fluorescencia: La fluoresceína es una marca fluorescente. Absorbe la energía de la luz a 490nm y libera esta energía a una longitud de onda superior (520nm) como luz fluorescente.

Rotación de Moléculas en la Solución: Las moléculas más grandes rotan más lentamente en la solución que las moléculas más pequeñas. Este principio puede utilizarse para distinguir entre la molécula más pequeña antígeno-fluoresceína: AgF, que rota rápidamente, y los complejos Ab-AgF más grandes, que rotan lentamente en la solución.

Rotación de Moléculas en la Solución: Las moléculas más grandes rotan más lentamente en la solución que las moléculas más pequeñas. Este principio puede utilizarse para distinguir entre la molécula más pequeña antígeno-fluoresceína: AgF, que rota rápidamente, y los complejos Ab-AgF más grandes, que rotan lentamente en la solución.

La luz polarizada describe ondas de luz que solamente están presentes en un plano simple del espacio. Cuando la luz polarizada es absorbida por la molécula más pequeña AgF, la AgF tiene la capacidad de rotar su posición en la solución rápidamente antes de que la luz sea emitida como fluorescencia.

La luz emitida se liberará en un plano diferente del espacio de donde fue absorbido y por consiguiente se la denomina luz no polarizada. Con el complejo Ab-AgF de mayor tamaño, la misma luz polarizada absorbida se libera como fluorescencia polarizada ya que cuanto más grande sea el complejo Ab-AgF no rota tan rápidamente en la solución. La luz es liberada en el mismo plano del espacio como energía de la luz absorbida, y el detector puede medirla.²⁶

Los resultados de FPIA se muestran como una curva inversa por cuanto a valores bajos de analito del paciente producen una señal más alta (en este caso, la señal es luz polarizada).

Una señal alta a niveles bajos de analitos del paciente da como resultado un ensayo muy sensible.³⁰

8.3.2. Enzimoimmunoanálisis

Los enzimoimmunoanálisis (EIA) emplean la capacidad catalítica de las enzimas como marcador inmunoquímico para la valoración de la unión Ag-Ac producida tras un periodo de incubación, con la adición posterior de un sustrato. Una única molécula de enzima tiene la capacidad de catalizar la conversión de millones de moléculas de sustrato en su producto a determinar, propiciando una amplificación que permite la detección de concentraciones muy bajas de complejos marcado.³¹

Las enzimas empleadas en los enzimoimmunoanálisis han de ser solubles, con elevada actividad específica y recambio enzimático alto, ser estables en las condiciones de la prueba, con una medida sencilla, sensible y rápida, así como no estar presentes en los líquidos biológicos ni ser inhibidas por las condiciones del análisis. Las principales enzimas empleadas en este tipo de ensayos son la fosfatasa alcalina, la peroxidasa de rábano, la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa y la β -galactosidasa.³²

La realización de los enzimoimmunoanálisis consta de dos etapas bien diferenciadas. En la primera de ellas se produce la unión entre el Ag y el Ac, mientras que en la segunda se añade el sustrato y se determina la actividad enzimática del marcador. Esta determinación puede ser principalmente realizada por dos tipos de métodos.³³

8.3.3. EMIT (Inmunoanálisis de Multiplicación Enzimática)

Fue el primer tipo de enzimo-inmunoanálisis homogéneo desarrollado, la unión del ligando marcado con la enzima al anticuerpo origina un cambio en la actividad de la enzima, el cual consiste en una disminución de la misma, en la mayoría de los casos la inhibición de la enzima es debida a un impedimento estérico que bloquea físicamente el acceso del sustrato al centro activo de la enzima, la inhibición de ciertas enzimas puede ser debida a los cambios conformacionales inducidos en estas por la unión del anticuerpo.

Cuanto mayor es la concentración del ligando problema en el analito, mayor es la concentración de ligando marcado no unido al anticuerpo en el medio de reacción, aumentando simultáneamente la actividad catalítica del mismo. La máxima actividad catalítica se alcanza cuando todo el ligando marcado se encuentra en forma libre (no unido al anticuerpo), o todo el anticuerpo está unido a ligando presente en el analito.

Válido para determinar moléculas de bajo peso molecular, como por ejemplo la tiroxina. Se basa en el marcaje de una enzima con el Ag a determinar. La unión del Ac a este complejo inhibe la actividad catalítica de la enzima, al impedir el acceso del sustrato al centro activo. La competencia entre el Ag del espécimen y el Ag ligado a enzima por el anticuerpo implica que a mayor concentración de Ag presente en el espécimen, menor cantidad de enzima será inactivada, por lo que la actividad es directamente proporcional al Ag del espécimen.

8.3.4. CEDIA (Inmunoanálisis por Clonado de Dador)

Se basa en el uso de la enzima β -galactosidasa fraccionada mediante técnicas de DNA recombinante en dos partes inactivas, una aceptora grande y una donadora de menor tamaño unida al Ag a determinar. La combinación de ambos fragmentos da lugar a la enzima activa, siendo ésta imposibilitada por la unión del Ac al Ag ligado a la fracción donadora. La competencia entre el Ag del espécimen y el Ag ligado a la fracción donadora por el Ac implica que a mayor concentración de Ag presente en el espécimen, un mayor número de moléculas de enzima β -galactosidasa activa podrá ser ensamblada, por lo que la actividad es directamente proporcional al Ag del espécimen.

8.3.5. Quimioluminiscencia

FUNDAMENTO

Es un inmunoensayo que se basa en la emisión de luz asociada con la energía.

La quimioluminiscencia es definida también como la emisión de fotones de luz asociada con la disipación de energía con una sustancia electrónicamente excitada esto se da a través de una reacción enzimática sustrato.

La emisión de luz es causada por los productos de una reacción específica química, en la cual se involucran las siguientes sustancias según el sistema automatizado que sea utilizado: éster de acridina, peróxido-ácido, hidróxido de sodio, fosfatasa alcalina. En el caso de esta reacción el agente quimioluminiscente es el éster de acridina que es oxidado por el peróxido ácido y el hidróxido de sodio.

La quimioluminiscencia se define como la emisión de radiación electromagnética (normalmente en la región del visible o del infrarrojo cercano) producida por una reacción química.

La concentración de las especies químicas implicadas en la reacción quimioluminiscente, las medidas de la intensidad de emisión pueden emplearse con fines analíticos. Una ventaja de las técnicas quimioluminiscencia es que permiten emplear una instrumentación básica bastante sencilla, ya que el sistema óptico no requiere fuente externa de excitación. La quimioluminiscencia se describe a menudo como una técnica de “campo oscuro”: la ausencia de niveles altos de luz de fondo, que sí ocurren en espectrofotometría y fluorimetría, reduce el ruido y permite mejorar los límites de detección. La instrumentación para medidas de quimioluminiscencia varía desde sistemas muy simples hasta instrumentación más compleja, pudiéndose usar un fluorímetro simplemente con la fuente de excitación apagada.

MARCADORES DE REACCIÓN LUMINISCENTE

Ester de Acridina.

Hidróxido de Sodio Peróxido Acido Fosfatasa Alcalina.

EQUIPO

Es un analizador automático altamente sensible que puede realizar una amplia gama de pruebas. Es útil para determinar analitos del metabolismo de proteínas, carbohidratos, lípidos, purinas; así como electrolitos del metabolismo óseo, del metabolismo del hierro. También determinan enzimas para evaluar daño al miocardio, pancreático, muscular, hepático y renal fundamental para la eficacia diagnóstica y control terapéutico.

Además se emplean para la monitorización de fármacos, perfil reumático, reactantes de fase aguda

PRUEBAS QUE SE REALIZAN

Perfil Hormonal, Química Sanguínea (Perfil Lipídico, Perfil Renal, Perfil Cardíaco, etc.) Proteínas en Suero y en LCR Drogas Terapéuticas (Ácido Valpróico) Drogas de Abuso como la Cocaína, TMC. Pruebas Inmunológicas - PCR-C, C3 y C4 complementario, etc.³⁴

8.4. Cromatografía

La cromatografía es un proceso de migración diferencial en el cual los componentes de una mezcla son transportados por una fase móvil (gas o líquido), y retenidos selectivamente por una fase estacionaria que puede ser un líquido o un sólido. De acuerdo a la naturaleza de las fases involucradas y a los mecanismos de separación, la cromatografía se divide en:

Cromatografía de gases.	Cromatografía de líquidos.
Gas-líquido (partición)	Plana
Gas-sólido (adsorción)	En columna

Tabla 3. Tipos de Cromatografía.

8.4.1. Cromatografía de Gases

En la cromatografía de gases, la fase móvil es un gas y la estacionaria es un sólido (Cromatografía gas-sólido) o un líquido (Cromatografía gas-líquido). En la primera, el proceso de separación se lleva a cabo por adsorción entre el gas que transporta al soluto y el soporte, que puede ser alúmina, sílica gel, carbón, etc. y en la segunda, la partición se lleva a cabo entre una fase estacionaria líquida que cubre a un sólido inerte, como sílica, vidrio, etc. y el gas que transporta al soluto. Cuando se introduce una sustancia en la corriente del gas, ésta se volatiliza por la elevada temperatura y de esta manera es transportada por el gas transportador a lo largo de la columna donde se distribuye entre las fases sólida y líquida.

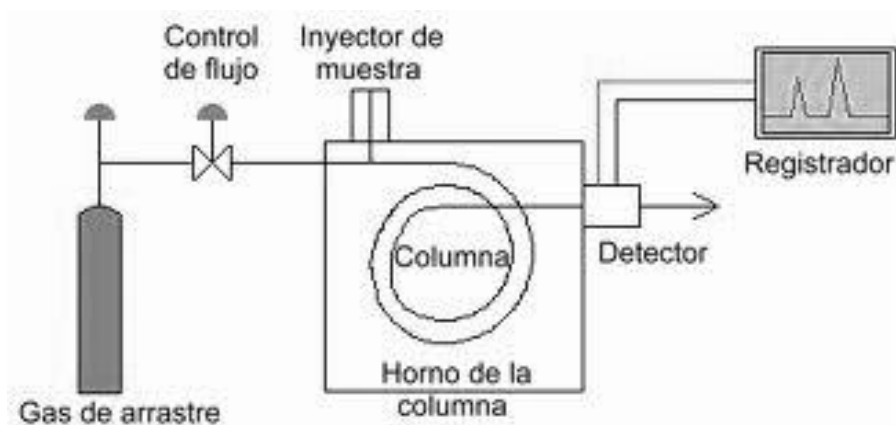


Figura 9. Esquema de un equipo Cromatógrafo de Gases.³⁵

Debido a que la cromatografía de gases es principalmente un método de separación, no puede usarse para identificar compuestos sin comparar con una sustancia de referencia (SR). Para el análisis cualitativo, debe determinarse el tiempo de retención o el volumen que la sustancia de referencia (velocidad de flujo por tiempo de retención del pico) del pico de una sustancia conocida, inyectando al sistema una solución de dicha sustancia.

Cuando un pico aparece al mismo tiempo o con el mismo volumen bajo las mismas condiciones experimentales, la probabilidad de una identificación correcta es muy alta.³⁵

8.4.2. Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR)

La cromatografía líquida de alta eficacia se encuadra dentro de la cromatografía de elución. En ésta, un líquido (fase móvil) circula en íntimo contacto con un sólido u otro líquido inmisible (fase estacionaria); al introducir una mezcla de sustancias (analitos) en la corriente de fase móvil, cada analito avanzará a lo largo del sistema con una velocidad diferente que dependerá de su afinidad por cada una de las fases. Esto supone que después de terminado el recorrido de la muestra por la columna, cada una de las sustancias introducidas en el sistema eluirá con un tiempo diferente, es decir, estarán separadas.³⁶(Figura 10)

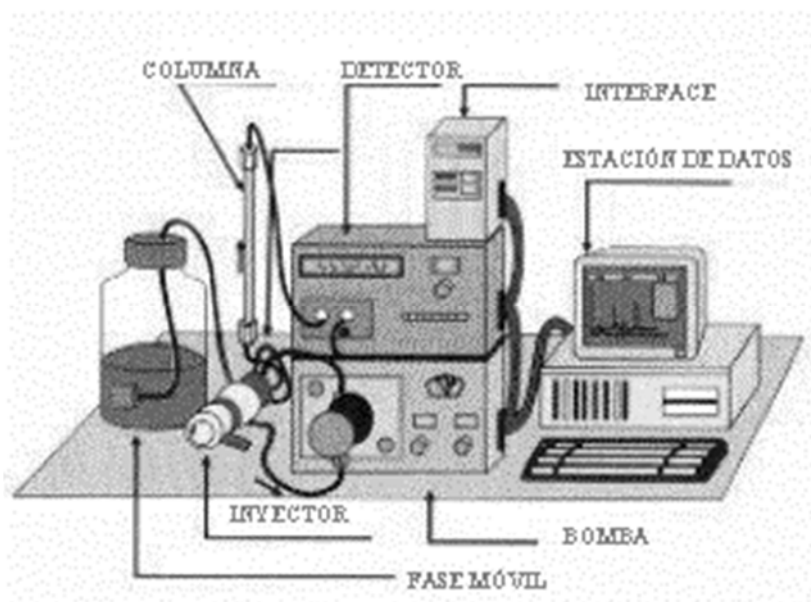


Figura 10. Esquema de un Equipo de HPLC

Esta técnica es conocida también como Cromatografía de Líquidos a Alta Presión (CLAP).

El éxito en la aplicación de la CLAR para un compuesto dado depende de la combinación correcta de las condiciones de operación, es decir: la preparación de la muestra, el tipo de la columna, la fase móvil, la longitud y diámetro de la columna, la velocidad de flujo de la fase móvil, el tipo de detección, el algoritmo de integración, etc.

La migración diferencial en la CLAR es resultado del equilibrio de distribución de los componentes de una mezcla entre la fase estacionaria y la fase móvil. Dichos componentes se separan en la columna y

al salir de ésta son conducidos por la fase móvil en el orden en que emergieron, hacia un detector donde se registra una respuesta proporcional a su cantidad sus concentraciones y sus tiempos de retención en la columna. El cromatograma resultante muestra cada compuesto que sale de la columna en forma de picos simétricos con un tiempo de retención característico por lo que este tiempo puede emplearse para identificar el compuesto.

Este tiempo de retención (T_r) se mide desde el momento de la inyección de la muestra hasta el momento en que aparece el máximo del pico en el cromatograma.

Los mecanismos o procesos de separación que dan como resultado la retención de las moléculas de una muestra por parte de la fase estacionaria dan lugar a los diferentes métodos de cromatografía líquida; esto es: líquido-líquido o de partición, que consta de una fase estacionaria líquida de composición diferente a la de la fase móvil e inmiscibles.

Las moléculas de la muestra se distribuyen entre ambas fases como sucedería en una extracción líquido-líquido. La cromatografía líquido-sólido o de adsorción incluye partículas de gran área superficial donde las moléculas son atraídas, y por lo tanto, retenidas.³⁵

Dentro de las aplicaciones de éstas técnicas instrumentales es la determinación/detección de fármacos como es el caso de la Carbamazepina; al respecto se describirán algunas técnicas usadas para tal fin.

Snezana D. en el 2009 realizó la determinación de Carbamazepina por HPLC usando suero y saliva como matriz biológicas. Las condiciones de la Determinación de Carbamazepina fueron:

Método. Separación del fármaco desde la matriz, para 0.2 mL de suero y 1 mL de saliva, se les agregaron 50 µL de Hidróxido de Amonio al 25% y 5 mL de Cloroformo. Las muestras se mezclaron en un agitador mecánico durante 20 minutos y se centrifugaron a 3 000 rpm durante 10 min. Después de la centrifugación, se separó la capa orgánica y se evaporó en una corriente de aire. Los extractos secos se reconstituyeron en la fase móvil y se analizaron por el método de HPLC-UV en 285 nm.

Cromatografía fase reversa, columna C18, con una fase móvil de metanol-agua-ácido acético (65:34:1) a una velocidad de flujo de 1,0 mL / min. La detección se efectúa por absorción ultravioleta a 285 nm. El tiempo de ejecución total fue de 5 min. Las muestras se prepararon por extracción alcalina (pH 10) usando cloroformo.

Resultados. Las curvas de calibración se encontraban en el rango de 0.1-5 g / mL para muestras de suero y saliva. La media de las recuperaciones de los picos de suero y saliva fueron de 97,59 y 92,30%, respectivamente. Los límites de detección (LD) de Carbamazepina en suero y saliva fueron de 0,166 y 0,178 g / mL, respectivamente. Los límites de cuantificación (LC) en el suero y saliva eran 0,237 y 0,226 g / mL, respectivamente. La precisión del método se llevó a cabo con coeficiente de variación de 2,10% y 4,03% para el suero y saliva, respectivamente. Los datos obtenidos mostraron que había un fuerte correlación entre la saliva y las concentraciones séricas ($r = 0,9481$, $p < 0,001$).

El autor concluye que: El método descrito aquí es rápido, exacto, preciso y simple, y se puede utilizar para la determinación cuantitativa de la Carbamazepina en humanos suero y saliva después de la aplicación de la terapia. Las muestras de saliva podrían ser usadas como una matriz alternativa para la monitorización terapéutica de este fármaco antiepiléptico.³⁶

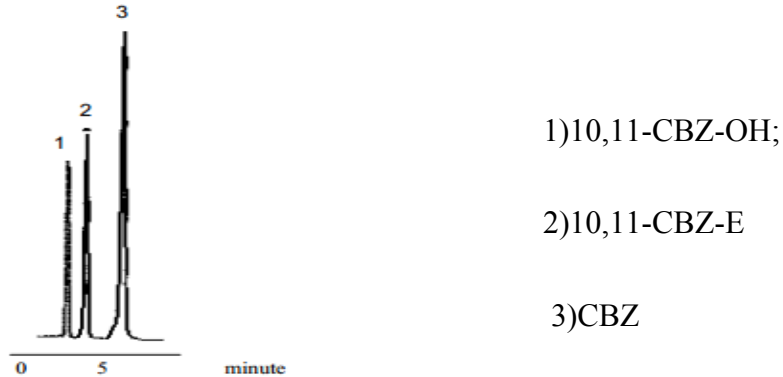


Figura 11. La separación cromatográfica (HPLC) de la Carbamazepina y sus metabolitos³⁶.

Por otro lado Moreno y colaboradores en el 2001 ya habían realizado la comparación de 2 EMIT y HPLC, en el cual se analizaron 40 muestras de suero de pacientes tratados con Carbamazepina por inmunoanálisis enzimático (EMIT) y cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC) y se compararon los resultados. El método cromatográfico incluye la extracción de la Carbamazepina con cloruro de metileno y su separación cromatográfica en una columna Nova Pak C18 usando una mezcla de Acetonitrilo al 25% en Agua pH 5.6. La detección se hizo en un detector de absorbancia a 215 nm.

La correlación entre estos dos métodos fue de 0.93. Las bandas de confianza para la predicción de HPLC en función de EMIT calculadas mediante el criterio de Working-Hotelling, mostraron un error máximo de 1.1, 0.5 y 1.6 µg/ml en el rango bajo, medio y alto respectivamente con una probabilidad 0.05.

La ecuación que expresa el comportamiento de la medición de Carbamazepina por HPLC en función del EMIT es:

$$\text{HPLC} = 0.824 \times \text{EMIT} + 0.777$$

Posteriormente, se usó el método cromatográfico para determinar los niveles séricos predosis de Carbamazepina y 10,11- epoxi-Carbamazepina en 5 pacientes epilépticas que recibieron una dosis oral de 200 mg de Carbamazepina cada 8 horas como único anticonvulsivante para el control de sus crisis.

Las muestras de los pacientes fueron extraídas en ayuno, entre las 8 y 9 horas antes de la dosis matutina, los sueros de 40 pacientes tratados con Carbamazepina. Las dosificaciones oscilaron entre 200 y 800 mg del medicamento. Las muestras se cuantificaron por EMIT y por HPLC.

Para el Enzimoimmunoensayo: Los reactivos para el EMIT de Carbamazepina se obtuvieron de Syva Corp. y se usaron según las indicaciones de los insertos. La absorbencia se midió a 340 nm en un equipo Cobas Bio (Roche DiagnosticSystem)

Para el sistema Cromatográfico: La Carbamazepina y el 10,11-epoxi-carbamacepina se obtuvieron de Sigma (St. Louis, MO, USA) y la oxcarbamacepina, fue obtenida de NovartisFarma. El diclorometano HPLC se obtuvo de Mallinckrodt, el Acetonitrilo grado HPLC y el sulfato de sodio anhidro de JT Baker.

Resultados:

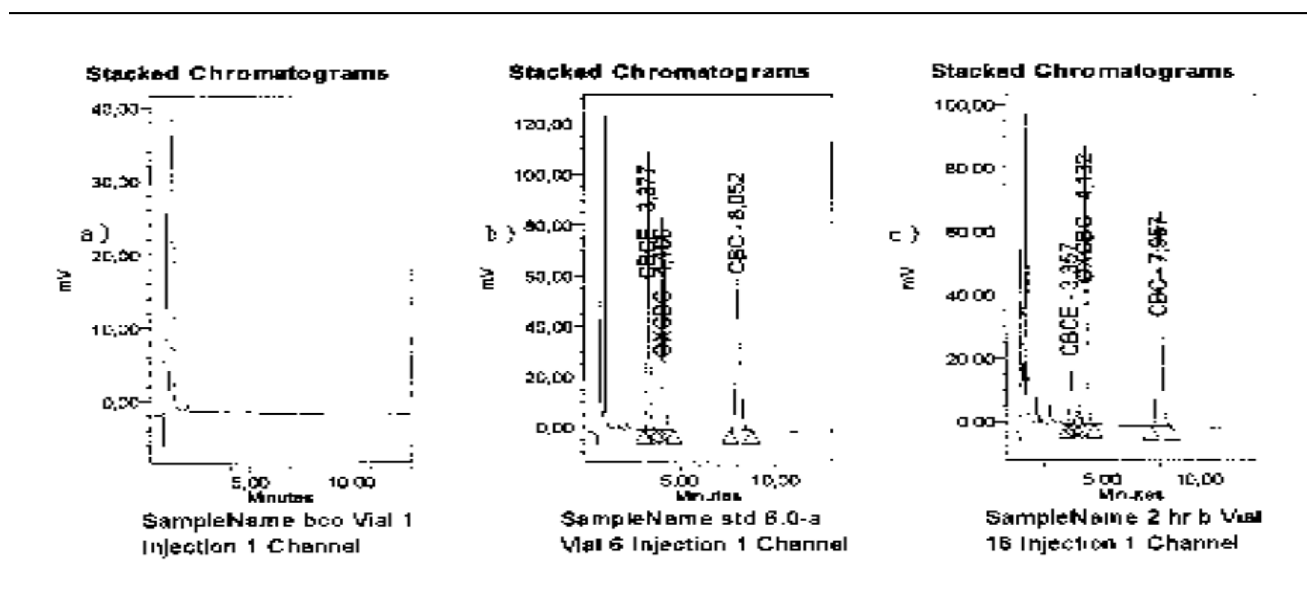


Figura12Cromatograma de a) suero libre de fármaco, b) suero con adición de cantidades conocidas de 10,11 epoxicarbamacepina, oxcarbamacepina (estándar interno) y Carbamazepina, c) suero de paciente al que se le adicionó una cantidad conocida de oxcarbamacepina.

En la Figura 12 se muestra el cromatograma de: a) un suero libre del fármaco, b) un suero al que se añadieron cantidades conocidas de CBC-E, oxcarbamacepina(estándar interno) y Carbamazepina, c) el

sueros de un paciente medicado con Carbamazepina al que se le añadió una cantidad conocida de estándar interno.

La recuperación de Carbamazepina y de CBC-E fue de 89 a 112% y de 88 a 114% respectivamente.

Dentro de su Discusión Moreno indicó: La determinación de los niveles de Carbamazepina por EMIT tiene la ventaja de que la muestra no requiere un tratamiento previo para su medición, razón por la que el tiempo para analizarlos es corto, pero tiene la desventaja de que por tratarse de una reacción de cinética enzimática, el ensayo puede resultar afectado por el tiempo y la temperatura. El análisis por HPLC es un procedimiento que requiere de tratamiento previo de la muestra, pero ofrece una alta especificidad para estudiar simultáneamente la Carbamazepina y su metabolito más importante (CBC-E) con una reproducibilidad satisfactoria.

La sensibilidad de ambas metodologías permite detectar las concentraciones de Carbamazepina que están por abajo del rango terapéutico. La correlación entre estos dos métodos es alta ($r = 0.93$).³⁷

8.5. Espectrometría de Masas

La espectrometría de masas es una técnica instrumental universal y específica, altamente sensible y que permite la identificación inequívoca de una sustancia.

El principio de la espectrometría de masas es la producción de iones a partir de compuestos neutros y la observación de la subsiguiente descomposición de esos iones. Estos iones descompuestos (fragmentos que también poseen carga) se mueven rápidamente y son “clasificados” de acuerdo a su relación m/z (masa/nº de cargas del ión). El espectrómetro de masas no solo clasifica los fragmentos, sino que además mide la cantidad de ellos que se forman.

Cuando a una molécula se le suministra una determinada energía la molécula se descompone siguiendo un patrón concreto en el que se obtienen siempre los mismos fragmentos y en la misma relación de intensidad. Este patrón concreto se representa gráficamente en el espectro de masas, al que denomina por esta razón “huella digital de la sustancia”. De esta forma, el espectro de masas permite la identificación inequívoca de las moléculas.

Los espectrómetros de masas son instrumentos sofisticados que en general constan de:

- A) Un sistema de introducción de muestra, que puede ser entre otros un cromatógrafo de líquidos o un cromatógrafo de gases.
- B) Una fuente de ionización, que es donde se produce la fragmentación molecular característica de cada compuesto.
- C) Un analizador o filtro de masas que separa los fragmentos iónicos generados en función de su relación masa/carga.
- D) Un detector que recoge y caracteriza los fragmentos iónicos que salen del analizador.

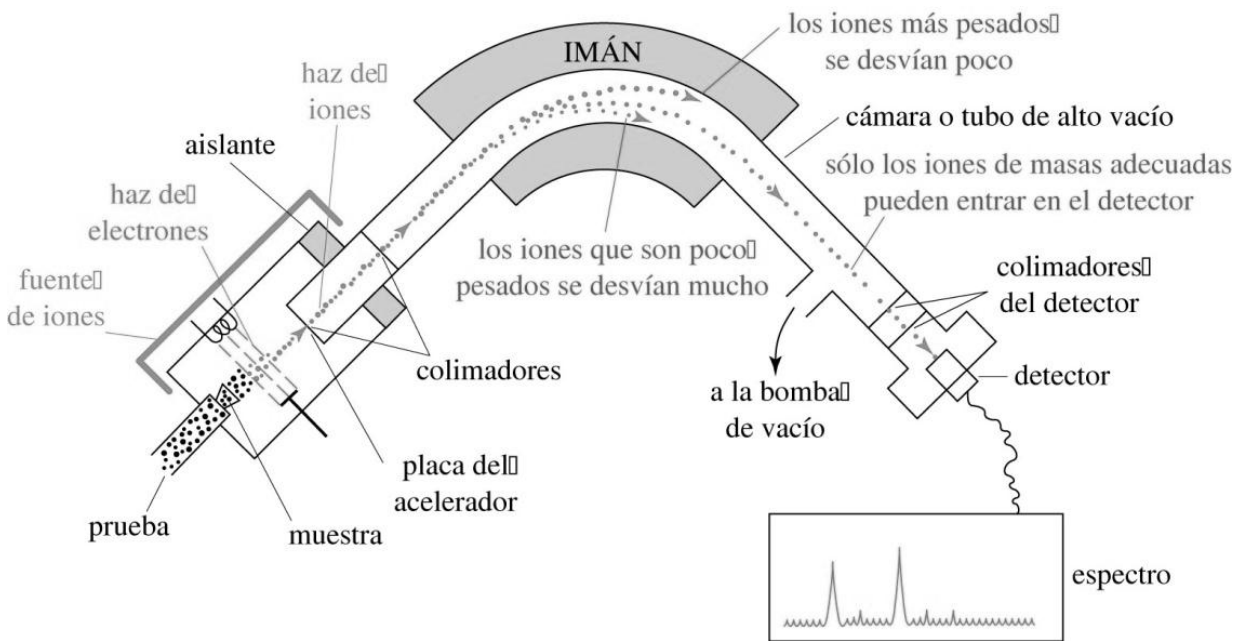


Figura 13. Esquema representativo de un Equipo de Espectrometría de Masas.

Además todo el sistema se encuentra sometido a alto vacío (1×10^{-4} - 1×10^{-5} torr.) para evitar colisiones entre los fragmentos iónicos generados.

Existen diferentes tipos de espectrómetros de masas en función del analizador que posean. Los analizadores más comunes son: cuadrupolo (Q), triple cuadrupolo (QqQ), sector magnético, trampa de iones (IQ), tiempo de vuelo (TOF).

La elección del sistema de introducción de muestra en el espectrómetro de masas dependerá de las propiedades físico-químicas de los compuestos a detectar. El acoplamiento de la cromatografía tanto líquida (LC) como gaseosa (GC) como sistema de introducción de muestra, incrementa la capacidad de identificación de la técnica, proporcionando una herramienta de identificación y confirmación única.

La fuente de ionización es el lugar del espectrómetro de masas en el que se introduce la muestra y en el que se produce la ionización.

Cuando el sistema de introducción de muestra es un acoplamiento GC, la muestra se encuentra en estado vaporizado y la única función de la fuente de ionización es ionizar las moléculas neutras (conferirles carga) por aplicación de una determinada energía. En este tipo de acoplamientos la ionización se produce en estado de vacío.

En el caso de los acoplamientos LC, las fuentes de ionización son interfases más sofisticadas que han tardado casi más de 30 años en ser desarrolladas. Este lento desarrollo se ha debido a que en el acoplamiento LC la muestra se encuentra disuelta en el efluente procedente del sistema LC. Esto resulta incompatible con el alto vacío requerido en la espectrometría de masas. Por esta razón, las interfases o fuentes de ionización desarrolladas han tenido la doble función de eliminar el disolvente (normalmente presente en ordenes de 0.5-0.5 ml/min), vaporizar la muestra e ionizarla. En este acoplamiento, la ionización se produce a presión atmosférica.

El analizador es la parte del espectrómetro de masa donde tiene lugar la separación (o clasificación) de los fragmentos iónicos generados en función de su relación masa/carga. Esta separación se produce por aplicación de diferentes campos eléctricos y magnéticos.

Existen diferentes tipos de analizadores que poseen unas características diferentes en lo que se refiere a sensibilidad, rango de masas que se puede separar y capacidad de separar masas que se diferencian solo en decimales (resolución).

Los tipos de analizadores más utilizados son:

El analizador de masas tipo cuadrupolo (MS) está formado por cuatro barras conductoras de sección hiperbólica alineadas paralelamente entre sí y equidistantes de un eje central imaginario situado sobre

el eje Z, donde los segmentos opuestos están conectados y los segmentos adyacentes están eléctricamente aislados. Se aplica una combinación de corriente continua (DC) y voltajes de radiofrecuencia (RF) sobre los pares de segmentos. La magnitud del voltaje de radiofrecuencia determina la relación masa/carga que es capaz de describir una trayectoria tal que atraviesa el analizador y alcanza el detector. De modo que variando dicha magnitud se podrán detectar los fragmentos iónicos cargados positivamente que se generaron en la fuente de ionización y que son característicos de cada compuesto.³⁸

Este tipo de analizador es robusto y muy reproducible. Es muy utilizado en el modo SIM (Selected Ion Monitoring) en el que solo filtra los iones de unas relaciones m/z concretas. Esto permite obtener espectros de masas muy simples (con muy pocos iones) pero que son muy sensibles. Además la respuesta lineal a la concentración es muy buena, por lo que son muy utilizados para llevar a cabo análisis de cuantificación.

El analizador de masas tipo trampa de iones (MSn), se caracteriza porque tanto la ionización, como la separación y la detección de los iones tiene lugar en el mismo espacio, produciéndose de forma secuencial en el tiempo. La trampa de iones está formada por tres electrodos hiperbólicos: un electrodo con forma de anillo y dos electrodos por encima y por debajo del anillo. Una vez que las moléculas del compuesto de interés llegan a la trampa, son ionizadas y fragmentadas. Los iones son retenidos o expulsados de la trampa en función de su relación masa/carga, ya que, para unos voltajes de RF y DC dados, sólo determinadas relaciones m/z describirán trayectorias tales que permitan que el ión se encuentre confinado en la trampa. Una vez que los iones son expulsados de la trampa pasan al detector.

Este tipo de analizador es muy útil para obtener espectros de masas en modo Scan en los que se filtran todos los iones comprendidos en un rango m/z determinado. Este tipo de espectros son ricos en iones y muy informativos. A diferencia de los analizadores de tipo cuadrupolar, en los analizadores de tipo trampa de iones estos espectros pueden ser obtenidos sin que se produzca una considerable pérdida de sensibilidad.

Otra característica de estos analizadores es que permiten obtener espectros de masas de iones productos (MSn) lo que tiene mucho interés en la elucidación estructural.

El analizador de masas tipo sector magnético (HRMS), opera según el principio de la dispersión del haz de iones cuando se le sometea un campo magnético intenso. Son equipos voluminosos y que requieren un alto vacío ($10E-7$ torr). Para iones de una sola carga y considerando un campo magnético y un voltaje de aceleración constantes la masa es directamente proporcional al radio del arco descrito por los iones, de modo que éstos se pueden separar en función de su masa. Variando el campo magnético aplicado se van seleccionando todos los fragmentos iónicos generados. Además el campo magnético produce un enfoque direccional del haz de iones. Los campos electrostáticos permiten corregir la dispersión del haz de iones que conduce a una pérdida de resolución.³⁴

La característica principal de este tipo de analizadores es que permiten trabajar a alta resolución (diferenciar relaciones m/z que solo difieren a partir del cuarto decimal) con gran sensibilidad.

El analizador triple cuadrupolo (QqQ), consiste en tres cuadrupolos conectados en serie. El cuadrupolo 1 (Q1) y el cuadrupolo 3 (Q3) funcionan como dos analizadores de tipo cuadrupolo conectados en serie. El cuadrupolo 2 (q2), o celda de colisión, se sitúa entre medias de Q1 y Q3. Es un cuadrupolo especial en el que se aplica una energía, energía de colisión (CE), que permite fragmentar los iones obtenidos en la fuente de ionización. Esta energía puede tomar diferentes valores, lo que permite obtener espectros de masas en los que aparecen diferentes fragmentos y/o diferentes relaciones de intensidad entre ellos.

El modo de adquisición más utilizado en los triple cuadrupolos es el MRM (MultipleReactionMonitoring). Este modo permite obtener EM altamente selectivos, con gran sensibilidad, pero con pocos iones (poca información). Es muy útil en los procesos en los que se requiere analizar unas sustancias muy concretas, de las que se conoce el peso molecular y el patrón de fragmentación.

Permiten también la obtención de espectros de masas de iones precursores y pérdida de neutros. Este tipo de espectros son poco sensibles pero muy útiles en el análisis de sustancias desconocidas que presentan estructura similar a alguna sustancia conocida, bien porque pertenezcan a la misma familia farmacológica o porque sea metabolito de esta.

Finalmente, el analizador de tipo triple cuadrupolo-trampa lineal (Qtrap), consiste en un sistema similar al triple cuadrupolo (QqQ) en el que el Q3 es modificado para poder “atrapar” iones. Sobre Q3 se aplica un campo eléctrico axial que permite el flujo de los iones a través de Q3. Al final de este se aplica un elevado voltaje que bloquea la salida de los iones. También se aplica una radiofrecuencia que mantiene los iones suspendidos en el interior de Q3. De esta manera se consigue tener los iones confinados en Q3 durante un tiempo (tiempo de llenado) antes de ser expulsados hacia el detector. Esto conduce a que una mayor densidad de iones de un mismo analito llegue al detector al mismo tiempo, lo que se traduce en una mayor sensibilidad en el análisis.

Otra característica de este tipo de analizador es que se puede regular la velocidad de selección o filtro de los iones con diferentes m/z . Esto permite regular la resolución y la sensibilidad del análisis (a menor velocidad se obtiene mejor resolución, aunque peor sensibilidad).

Además, en estos analizadores los iones precursores obtenidos en la fuente de ionización y fragmentados en q2, pueden volver a ser fragmentados por la RF aplicada en Q3. Lo que posibilita la obtención de espectros de masa MSⁿ.³⁹

9. ASPECTOS FORENSES

9.1. Tipos de muestras o indicios a recolectar

En las muerte no naturales, repentina, violenta o inesperada, el investigador a menudo necesita pruebas ya sean compuestos extraños que están presentes en el material de la autopsia. En primer lugar, el forense toxicólogo aplicará una prueba de detección para establecer si hay cualquier componente de una muestra que normalmente no está presente. Después de las pruebas de confirmación de un fármaco o veneno, la cantidad de sustancia se determina en un espécimen adecuado.²⁵

En la cuantificación de la sustancia es necesario establecer si la cantidad del compuesto particular es compatible con la intoxicación mortal.

La fase preanalítica se ha reconocido que tienen un papel importante para la calidad y la fiabilidad de los resultados analíticos, que dependerán en gran medida del tipo y la calidad de las muestras proporcionadas. Hay varios desafíos únicos para seleccionar y recopilar muestras para el análisis toxicológico post mortem. Muestras postmortem pueden ser numerosas, y la calidad de la muestra pueden ser bastante variable.

En el laboratorio forense se encontró que la mayoría de errores se originan en la fase preanalítica y no de problemas sobre el proceso analítico ya que abarca una serie de condiciones tales como la solicitud, recolección de material biológico, su preparación para almacenamiento y transporte, el registro, especímenes, incluidas la congelación, descongelación y alícuotas.

En los casos de las investigaciones de laboratorio comienza con las preguntas correctas realizadas a la brevedad, y con la estrategia elegida para la toma de muestra post-mortem, ya que debe basarse en un profundo conocimiento sobre el caso en particular y debe estar relacionada con la sustancia sospechosa.

En la medicina forense, un número de diferentes factores, tales como los eventos terminales, el intervalo de tiempo entre la muerte y descubrimiento del cadáver, su transporte y almacenamiento hasta la autopsia, así como la participación y la cooperación de los diversas profesiones, como un médico de urgencias, la policía, el patólogo y el personal de la autopsia incluyendo el toxicólogo forense puede ser considerado como una influencia potencial en la fase preanalítica. En principio, la mayor parte de los requisitos previos para la fase preanalítica, la calidad de las muestras es considerada en la química clínica, así como, también se aplican la calidad de las muestras post mortem. Sin embargo, muchas de las condiciones previas no están dentro del alcance postmortem de muestreo y la posterior investigación toxicológica, y por lo tanto debe ser considerado como único.¹⁴ En los casos de sospecha de intoxicación el error preanalítico se puede dar por las cantidades insuficientes de muestras de tejido, el uso inapropiado de los contenedores y su transporte a larga distancia pueden ser resultados poco fiables. Hasta la fecha, guías de buenas prácticas no existen para ayudar a los médicos forenses y patólogos cuando se presenta un caso así.²⁵

En muchos casos, la evidencia desde el principio en investigaciones toxicológicas son necesarios debido a las observaciones y los hallazgos en el lugar, los informes sobre los eventos terminales, los resultados de las investigaciones de la policía, así como las actas de la historia clínica o social de la persona fallecida. Toda esta información nos permite dar las instrucciones detalladas para la selección apropiada de las muestras correctas, incluso en casos especiales.

Además, la evidencia encontrada en la escena puede proporcionar valiosa información y facilitar la decisión que pone a prueba hacer preferentemente

Las muestras disponibles en las investigaciones de toxicología postmortem pueden ser numerosas y variables, y son seleccionadas basados en la historia del caso, peticiones, aspectos legales y disponibilidad en un caso determinado. En general, los especímenes recogidos rutinariamente en la autopsia incluyen fluidos como la sangre de los sitios periféricos y la sangre del corazón, orina, bilis, líquido cefalorraquídeo, humor vítreo y contenido gástrico y los tejidos de órganos, en particular hígado

Si se identifica una probable muerte por sobredosis o envenenamiento, las preguntas pueden surgir como: la vía de administración, un plazo largo o una exposición reciente a un fármaco o veneno. En estos casos, se pueden adicionar muestras alternativas como: el pelo, las uñas o las muestras de piel que deberían haber sido recolectadas para completar la investigación toxicológica. Un cuerpo en estado de descomposición, esqueletizado o embalsamado la disponibilidad de las muestras es limitado, por lo tanto, estos casos le presentan un desafíos para el toxicólogo.²⁵

9.2. Tipos de pruebas recolectadas en la escena

La evidencia encontrada en la escena puede proporcionar información adicional para ayudar en el análisis toxicológico o incluso puede dar una orientación valiosas para llegar al rápidamente al esclarecimiento correcto del ilícito.

Cucharas ennegrecidos con hollín, jeringas y cocinas nos sugiere una posible muerte relacionada con drogas, y envases vacíos de los medicamentos recetados pueden ser indicativos de sobredosis. Los fármacos utilizados para cometer suicidio son entregados a menudo a través de una bebida en un vaso, taza o biberón. Los análisis de líquidos residuales o residuos de envases facilitan la determinar del agente utilizado. En algunos casos, los productos para el hogar como cáusticos, solventes o pesticidas puede proporcionar evidencias al toxicólogo forense. En otros casos, se sospecha de sustancias que se encuentran en el lugar no están implicados en la mortalidad en absoluto. Por lo tanto, la evidencia circunstancial puede soportar pero nunca prescindir de un análisis de los fluidos corporales o tejidos del caso subyacente.

Un caso que se reporta en una Clínica de Toxicología se hizo la siguiente investigación:

Un hombre de aproximadamente setenta años, fue encontrado en su apartamento que probablemente fue robado en estado de coma al lado de su cama. Durante la investigación de la escena la policía encontró una taza con un líquido verde y un tazón con unas plantas previamente cocidas.

El paciente fue ingresado en la Clínica de Toxicología. Además fue enviado al laboratorio el material biológico (sangre, orina y el contenido gástrico del estómago), así como también, el líquido verde y las plantas cocidas.

El análisis de toxicológico de las muestras se realizó por el método Cromatografía de Gases acoplado a Masas (GC/MS).

Se verificó la presencia de la Carbamazepina y midazolam. La identificación se realizó por la comparación de los espectros de las muestras con los espectros de masas de la biblioteca NIST 90.

La cuantificación se realizó utilizando el método de patrón interno. En la sangre la concentración del Midazolam en la muestra fue de $0,40\mu\text{g} / \text{ml}$ y la Carbamazepina $1,72\mu\text{g}/\text{ml}$.²⁶

Este artículo es solo un ejemplo de las muestras que se deben recolectar en la escena, algunas son muy obvias pero otras no tanto y sin embargo, pueden proporcionar información importante en un caso de intoxicación o envenenamiento.

9.3. Muestras de fluidos y tejidos biológicos

En casos de intoxicación por Carbamazepina, se ven considerados los siguientes puntos:

I. TIPO DE MUESTRA A RECOLECTAR.

- a. Fluidos biológicos: La sangre es la muestra de elección para cuantificación y la interpretación de las concentraciones de los fármacos y sus correspondiente metabolitos. La cuantificación se realiza generalmente en especímenes de sitios periféricos, por ejemplo, desde la vena femoral.
- b. Orina: La acumulación de fármacos y metabolitos por lo general resulta se da en la orina en altas concentraciones que facilitan la detección o exposición del consumo de drogas. Por lo tanto, la orina tiene un gran potencial para proporcionar información sobre la exposición de fármacos antes de la muerte. La orina, a diferencia de la sangre, es sobre todo libre de proteínas y lípidos, y por lo tanto pueden ser analizados ya sea

directamente por inmunoensayos o pruebas puntuales no instrumentales como así como después de la extracción con un disolvente apropiado

- c. Bilis: La bilis representa una colección y almacenamiento de depósito xenobióticos y sus metabolitos correspondientes que tienen una excreción biliar y están sujetos a la circulación enterohepática
- d. Líquido cefalorraquídeo y humor vítreo²⁵
- e. Contenido gástrico e intestinal
- f. Tejidos: hígado, pulmones, cerebro, riñón son los más significativos.

De acuerdo a la cinética de la Carbamazepina dado que su fracción libre en el suero oscila entre el 8-35%, los ajustes de su dosificación deberían realizarse mediante el monitoreo de estos niveles.^{23, 24}

Su metabolismo se efectúa a través del sistema enzimático oxidativo hepático; por ende, las fármacos inductores de éste (ej. fenobarbital, fenitoína) aumentan el índice de aclaramiento de la CBZ.^{23,24}

El análisis sérico resulta eficaz para determinar el consumo del fármaco únicamente durante los días previos a la extracción de la muestra. En el uso a largo plazo puede no detectarse si el sujeto se abstiene del consumo en los días previos al análisis.

El análisis del cabello, indica que es un método alternativo que puede brindar una determinación del uso a largo plazo de este fármaco, en dado caso que el sujeto haya dejado de ingerirlo.^{23, 24}

La CBZ es una sustancia lipofílica, cuyas elevadas concentraciones en el cabello se asociarían a la facilidad para su transferencia desde la sangre a los folículos capilares.¹³

Los niveles de CBZ en los folículos capilares, dependen de la dosis del fármaco; los niveles séricos son afectados por otros factores por ejemplo: peso corporal, niveles de albúmina.¹³

El estudio de los niveles de la CBZ en el cabello aporta un adecuado registro del tratamiento crónico con el fármaco, superior a la determinación diaria que brindan las muestras séricas.

Sin embargo se prefiere la muestra de suero y orina para las pruebas a realizar para su identificación.

II. CADENA DE CUSTODIA

La Cadena de Custodia representa una serie de actividades “eslabonadas”, encaminadas a la correcta y adecuada preservación de los indicios o evidencia material desde su descubrimiento en lugar de hechos por parte de una autoridad, hasta que autoridad competente ordene su conclusión, según se trate de averiguación previa, carpeta de investigación o el proceso penal.

La razón fundamental estriba en el hecho de que el indicio o evidencia material deberá mantener todas y cada una de las características inherentes al lugar del cual ha sido recuperado, de manera indubitable e inalterable, para que el especialista en el laboratorio pueda realizar los estudios correspondientes, en caso de ser necesario.

La Cadena de Custodia se divide en 6 grandes etapas:

1. Protección y Preservación de Lugar de los Hechos y/o del Hallazgo.
2. Procesamiento de los Indicios o Evidencias.
3. Entrega al Ministerio Público de los Indicios o Evidencias e Integración del Registro a la Averiguación Previa o Carpeta de Investigación.
4. Manejo de los Indicios o Evidencias en los Laboratorios.
5. Manejo de los Indicios o Evidencias en la Bodega de Evidencias.
6. Manejo de las Evidencias Provenientes de Entidades Prestadoras de Servicios de Salud Pública o Privada.

La información mínima que se debe disponer en la Cadena de Custodia, para un caso específico, es la siguiente:

- a. Una hoja de ruta, en donde se anoten los datos principales sobre descripción del indicio, fechas, horas, responsable del indicio, identificaciones, cargos y firmas de quien recibe y de quien entrega;
- b. Recibos personales que guarda cada responsable del indicio y en la que aparecen los datos similares a los de la hoja de ruta;
- c. Rótulos que van adheridos o pegados a los envases o embalajes de los indicios, por ejemplo: a las bolsas plásticas, sobres de papel, sobres de manila, frascos, cajas de cartón, etc.;

- d. Etiquetas que tienen la misma información que los rótulos, pero van atadas con una cuerda a las bolsas de papel kraft, frascos, cajas de cartón o sacos de fibra;
- e. Libros de registro de entradas y salidas, o cualquier otro sistema informático que se debe llevar en los laboratorios de análisis, en las oficinas del Ministerio Público y en Bodega.
- f. Registro de las Condiciones de Almacenamiento (temperatura, humedad, etc.).²⁷

9.4. Casos de Carbamazepina Post Mortem

Para interpretar las concentraciones de medicamentos post-mortem en la sangre o en los tejidos es importante tener un conocimiento de las concentraciones generalmente observadas bajo condiciones terapéuticas. Comúnmente, en el plasma o las concentraciones séricas observadas in vivo en circunstancias terapéuticas o en los estudios farmacocinéticos se utilizan como referencia.³³

Malgorzata K. y colaboradores en el 2003 realizaron una investigación sobre la posible intoxicación por Carbamazepina y se analizaron las muestras biológicas en las autopsias realizadas a cada cadáver:

El estudio se centra en una serie de 16 casos mortales en los que la Carbamazepina y sus dos metabolitos principales (10,11-epóxido y 10,11-dihydroxycarbamazepine) se detectaron en los fluidos corporales y tejidos recolectados en la autopsia. El fármaco puede estar implicado en un número de muertes, sin embargo, la mayoría de estos se deben a múltiples intoxicaciones de fármacos con una contribución particular de etanol. Las investigaciones sobre los hallazgos son una fuente de datos toxicológicos postmortem y muestran las diferencias del metabolismo como en función de los niveles de concentración de Carbamazepina y xenobióticos que se encuentran en la muestra de la autopsia durante la investigación post mortem de un cuerpo.

Los especímenes, las muestras de sangre femoral, el hígado y los riñones fueron recolectados en la autopsia durante las investigaciones de las muertes que ocurren en el distrito Krakow entre 1999 y 2000. Las autopsias se realizaron en el Instituto de Medicina Legal (Collegium Medicum de la Universidad Jagellonian, Krakow, Polonia) en las 24 h después de la muerte. El tiempo exacto entre la ingestión del fármaco(s) y la muerte en general no era conocido. En algunos casos, el tiempo de vida en el hospital fue de hasta dos días. Las muestras se mantuvieron congelados (-22°C) hasta que los análisis se realizaron.

Paralelamente a los materiales extraídos de los sujetos, fueron investigados estándares de Carbamazepina, CBZ -E, y CBZ - DHD y muestras de sangre blanco de la autopsia y el hígado se extrajeron de sujetos que no fueron intoxicados con estos fármacos. Éstos últimos fueron usado para facilitar la identificación, cuantificación, y la validación por medio de Cromatografía Líquida-Espectrometría de Masas (LC - MS).

Materiales y métodos

LC-MS

Un Finnigan MAT LC (San José, CA) equipado con una bomba modelo TSP 4000 y un automuestreador TSP AS 3000 con un bucle de inyección de 10 μ L que se utiliza en modo de gradiente. La separación cromatográfica se realizó con una columna Purospher RP 18 de 125 x 3 mm d.i., 5 μ m de tamaño de partícula y una precolumna Lichrocard 4 x 4 mm de diámetro interno, seguido de una Lichrospher 60 5 μ m de tamaño de partícula (Merck, Darmstadt, Alemania). La fase móvil consistió de una mezcla de gradiente de la fase (A), que era Ácido Trifluoroacético al 1% (TFA) con agua desmineralizada y se mezcla con (B) que era 90% de Acetonitrilo + 10% de la fase (A). La velocidad de flujo fue de 0,4 mL/min. El gradiente se programó como se menciona a continuación: 5% (A) y 95% (B) durante 2 min, seguido por una línea creciente al 70 % (A) y 30 % (B) en 30 min y, a continuación, después de 2 min. disminuye a 5 % (A) y 95 % (B) durante 8 min.

Un detector de masas LCQ con trampa de iones (Finnigan MAT) equipada con una ionización por Electro spray (ESI). Las condiciones del ESI fueron las siguientes: presión del gas (nitrógeno) 70 psi, gas auxiliar (nitrógeno) 10 mL/min, capilar calentado temperatura de 200°C y la fuente de corriente a 100mA. Los espectros de masas de las sustancias involucradas fueron tomadas entre m/z 50 y 650 en octapolo desplazamiento de 10 V (iones positivos). La detección de las drogas de interés se basó en la selección de iones específicos (SIM) con una corrida cromatográfica de los espectros de masas en el modo de barrido completo y en los tiempos de retención observados. Paralelo al detector de masa, un modelo de detector UV TSP 2000 (Finnigan MAT) se utilizó a un rango de 400 nm - 200.

Extracción de la muestra de la matriz

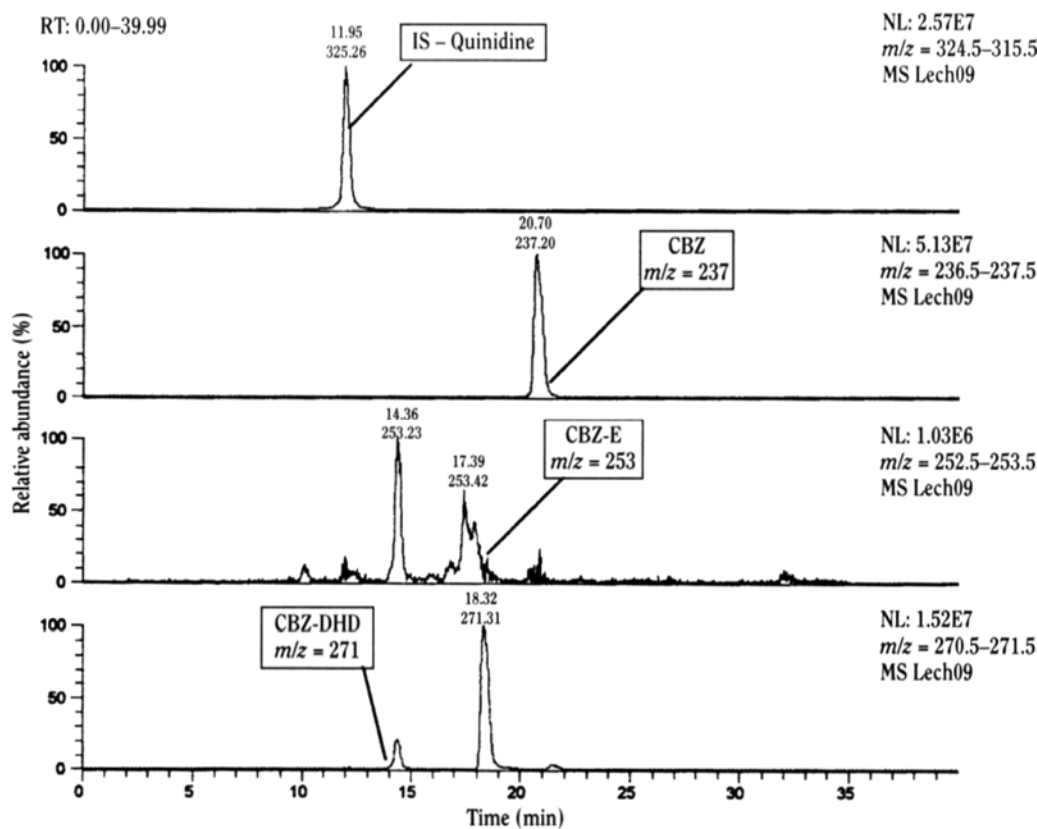
Las muestras post mortem de la autopsia en sangre, el hígado, y el riñón se recolectaron para el análisis. Los tejidos se colocaron en un homogeneizador a 10.000 xg durante 3 min y se someten a la

extracción Líquido-Líquido. La Quinidina en una concentración de 5 µg/g fue utilizado como el estándar interno (SI). Todos los sujetos de análisis fueron negativos para la Quinidina.

En un inicio, las muestras de 5 g se mezclaron con 5 g de Búfer de TRIS (Hidroximetil-Aminometano) a pH 9,0 y se colocaron en un baño ultrasónico durante 15 minutos. Posteriormente, las muestras se mezclaron con 7.5 mL de Acetonitrilo para llevar a cabo la precipitación de proteínas, a continuación, se mezclan con el vórtice y se centrifugan. El sobrenadante se mezcló con 15 mL de Acetato de Etilo y las soluciones se separaron en papel de filtro Whatman(Maidstone, Inglaterra). La fase orgánica se recolectó, se evaporó a sequedad a 40° C bajo una corriente de nitrógeno, los residuos se reconstituyeron con 1000 µL de la fase móvil utilizada para el equipo HPLC. Diez microlitros de los extractos reconstituidos se inyectaron en el Sistema LC- MS para la identificación

Resultados

Los métodos descritos fueron utilizados para el análisis de los fármacos y sus metabolitos en muestras de autopsia de los casos relacionados con Carbamazepina, que eran sujetos de nuestras investigaciones. Los datos relativos a 16 de los casos se enumeran en la Tabla 4, junto con la información disponible sobre las circunstancias, modo, y las causas de la muerte. Seis sujetos fueron probables suicidios, cinco fueron accidentes, dos muertes naturales, un homicidio, y en dos casos la forma de la muerte no se pudo determinar.



En los 16 casos, evaluaron la sangre, el hígado y muestras de riñón (si está disponible) en el que Carbamazepina y sus dos metabolitos se habían detectado durante los exámenes toxicológicos postmortem de rutina. Un ejemplo de la identificación de los

Carbamazepina y sus metabolitos en la sangre de la autopsia (caso 2) se presenta en la Figura 14.

Figura 14. Corrida del ion utilizado de Carbamazepina, CBZ-E y CBZ-DHD en la sangre examinada de la autopsia.

En la Tabla 4 se muestra que en los casos 1-4 la muerte se atribuyó solamente a Carbamazepina. Los niveles en la sangre oscilaron entre 16µg/g en el caso 2, casi 100µg/g en el caso 3. En el hígado, el límite superior de la Carbamazepina encontrado era casi dos veces más alto (caso 3). El caso 3 es especial debido a un nivel muy alto de concentración de los metabolitos en la sangre, mientras que en el hígado CBZ-E llegó a un valor inexplicablemente bajo en comparación para CBZ-DHD, que era dos veces más alto como CBZ-DHD en relación a Carbamazepina.

En los casos 5-7 muestran las concentraciones terapéuticas de Carbamazepina en niveles más bajos de sus metabolitos, en estos casos, la muerte era debido a otras causas.

Nueve casos (casos 8-16) con niveles de concentración inferiores de Carbamazepina, en un intervalo terapéutico a fatal, también tenían ciertas concentraciones de otros xenobióticos, incluyendo etanol, benzodiazepinas, y la morfina, lo que enfatiza la importancia de tomar en consideración las posibles interacciones con otros medicamentos o enfermedades preexistentes (por ejemplo, epilepsia). Cabe la posibilidad de que existan interacciones entre los xenobióticos mencionados, la Carbamazepina fue considerada por los patólogos ser un factor para contribuir a la toxicidad en estas muertes. En este grupo de nueve casos, cuatro casos (8-11) se consideraron la combinación de Carbamazepina con etanol. La concentración de etanol en la sangre fue baja, mientras que en la orina fue significativamente más alta que indica la muerte en la fase tardía de la eliminación. Los cinco casos restantes (casos 12 a 16) fueron intoxicaciones mixtas con las drogas, en el que la Carbamazepina y sus metabolitos se han encontrado junto con otros fármacos.

Ellos discuten que la Carbamazepina tiene relativamente un pequeño volumen de distribución de 0,8 a 2,0 L/Kg , lo que implica que el fármaco y posiblemente sus metabolitos no se acumulan ampliamente en los tejidos . La Carbamazepina aparentemente está sujeta a la redistribución postmortem , en una serie de muertes , la relación de concentración de sangre del corazón/femoral en promedio de 0,9. Aunque se han descrito un total de 33 metabolitos de la Carbamazepina, la principal vía de su biotransformación es la formación del 10,11 -epóxido por medio de la monooxigenasa hepática, posteriormente la hidrólisis a 10,11 - dihydroxycarbamazepine por medio de la hidrolasa epóxica microsomal. Una menor parte da lugar a una formación del iminoestilbeno, y finalmente, la conjugación también se produce un Ácido Glucurónico. La importancia de la formación cuantitativa de epóxido-diol se ve afectada por la presencia de otros xenobióticos (por ejemplo, etanol o fármacos anti-epilépticos). Una vida media de entre 5 y 13 h se determinó en politerapia, que generalmente es más alta en virtud de una sola y/o el uso crónico.

Las características de distribución de 10,11 -epóxido, con una actividad similar a la del fármaco madre, han sido estudiados por su potencial contribución a los efectos terapéuticos y tóxicos de la droga madre.⁴⁰

Tabla 4 Casos de Intoxicación por Carbamazepina⁴⁰

	Edad	Género	Circunstancias	Causas	Manera	Alcohol (%)	Fármaco	Sangre(mg/L)	Hígado(mg/L)	Riñón(mg/L)
1	42	M	Tratado en el hospital durante 2 días, muere ah, paciente psiquiátrico	Posible intoxicación	Suicidio	Negativo	CBZ CBZ-E CBZOH	39.40 10.40 6.52	56.48 6.26 3.70	8.29 2.38 1.25
2	50	M	Encontrado muerto en el baño. Farmacodependiente.	Posible intoxicación	Suicidio	Negativo	CBZ CBZ-E CBZOH	16.40 3.06 3.25	130.60 20.94 50.80	NA NA NA
3	35	F	Encontrado muerto en su casa, epilepsia, paciente psiquiátrico.	Posible intoxicación	Suicidio	Negativo	CBZ CBZ-E CBZOH	99.45 274.47 199.09	218.79 8.85 428.17	40.69 85.02 73.90
4	39	F	Encontrado muerto en su casa	Posible intoxicación	Suicidio	Negativo	CBZ CBZ-E CBZOH	18.79 6.93 23.74	19.51 0.95 12.74	4.37 1.99 5.06
5	22	F	Muerto en el hospital, epilepsia desde la niñez, embarazo de 4 meses.	Indeterminada	Natural	Negativo	CBZ CBZ-E CBZOH	3.14 1.60 1.21	6.35 5.02 2.02	16.62 6.87 4.87
6	7	M	Tratamiento para la epilepsia, asesinado por estrangulación.	Asfixia	Homicidio	Negativo	CBZ CBZ-E CBZOH	4.28 2.03 0	6.50 3.18 1.63	1.24 3.98 0

7	29	M	Muerte inesperada en el hospital, paciente psiquiátrico, epilepsia, deficiente mental.	Infarto al Miocardio	Natural	Negativo	CBZ CBZ-E CBZOH	10.00 0.74 0	21.27 0.33 0	8.51 0.48 0
8	54	F	Encontrado cerca de su casa muerto. Paciente neurológico, alcohólico.	Posible intoxicación	Accidental	8-0.5 U-2.2	CBZ CBZ-E CBZOH	32.44 11.10 0.61	14.65 0.62 0	40.34 0.81 1.05
9		M	Sin datos, encontrado en la calle muerto.	Indeterminada	Desconocida	B-0.2 U-1.6	CBZ CBZ-E CBZOH	6.85 0.37 0	112.71 19.89 12.04	NA
10	32	M	Encontrado en su casa muerto, epilepsia	Posible intoxicación	Suicidio	B-negativo U-2.0	CBZ CBZ-E CBZOH	50.50 1.35 0.40	6.78 0.41 0.87	4.67 0.89 0.26
11	46	W	Encontrado en el baño muerto, epilepsia, depresión.	Posible múltiple intoxicación	Accidental	B-2.6 U-3.2	CBZ CBZ-E CBZOH	20.18 0.43 0.19	362.48 0 0	58.85 1.86 0.54
12	54	M	En el hospital dura 1 día y fallece, paciente psiquiátrico.	Posible múltiple intoxicación	Desconocido	B-2.22	CBZ CBZ-E CBZOH Estazolam	11.53 0.72 3.13 1.52	10.10 0.68 1.21 0.80	8.89 0.79 2.03 0.40
13	70	M	Muere en el hospital después de dos días, farmacodependiente	Posible múltiple intoxicación	Suicidio	Negativo	CBZ CBZ-E CBZOH Estazolam	7.08 1.68 3.14 23.5	1.57 0.29 1.27 ---	NA
14	33	M	Encontrado en un Hotel muerto	Posible múltiple intoxicación	Accidental	Negativo	CBZ CBZ-E CBZOH Fenobarbital	7.08 1.68 3.14 23.5	1.57 0.29 1.27 ---	NA
15	26	M	Encontrado en su casa muerto, alcohólico, paciente psiquiátrico.	Posible múltiple intoxicación	Accidental	Negativo	CBZ CBZ-E CBZOH Diazepam Nordiazepam	3.66 1.82 0.62 0.2 1.1	14.95 1.51 6.14 0.6 10.9	6.89 3.84 4.22 0.5 6.9
16		F	Sin datos, encontrado en el parque.	Posible múltiple intoxicación	Probablemente accidental	B-2.9 U-3.5	CBZ CBZ-E CBZOH Morfina	3.84 0.05 0 1.13	5.86 0.03 0.02 2.10	NA

Concluyendo el artículo, los niveles que se pueden observar en los casos 1-4, 8, 10 y 11 los niveles de Carbamazepina se acercan o incluso los sobrepasan la dosis letal mínima que es $40\mu\text{g/mL}$ (40mg/L) como ya se mencionó anteriormente en el presente trabajo, se puede decir, que es casi un hecho que la intoxicación por este fármaco causó la muerte de dichos pacientes.

10. ANÁLISIS DE INVESTIGACIÓN

De acuerdo a los Métodos de Investigación antes mencionados, cada uno tiene sus ventajas y desventajas, que hacen llegar a la elección de acuerdo a las necesidades técnicas para emplear cada uno en ciertas situaciones para su identificación y cuantificación.

Método	Ventajas	Desventajas
QUIMIOLUMINISCENCIA	<ul style="list-style-type: none"> • Alta sensibilidad (femtogramos 10⁻¹⁵g). • No emplea radiactividad. • No genera riesgo contaminante ni ruido de fondo a la hora de efectuar el proceso del análisis de una muestra, control o estándar. • Los resultados son rápidos (generalmente a los 15 min). • Equipos automatizados de fácil manejo. 	<ul style="list-style-type: none"> • Depende de la emisión quimioluminiscente de varios factores ambientales que deben ser controlados • Falta de selectividad, ya que un reactivo quimioluminiscente no se limita a un único analito, y finalmente • La emisión quimioluminiscente no es constante sino que varía con el tiempo (el flash de luz está compuesto de una señal que se produce tras la mezcla de los reactivos, alcanza un máximo y después cae hasta la línea de base)
INMUNOENSAYO	<ul style="list-style-type: none"> • La muestra no requiere tratamiento previo para su medición, razón por la que el tiempo para analizarlos es corto • Equipos automatizados 	<ul style="list-style-type: none"> • El ensayo puede resultar afectado por el tiempo y la temperatura. • Reacciones cruzadas entre especies estrechamente relacionadas y originar falsos positivos
HPLC	<ul style="list-style-type: none"> • Alta especificidad para estudiar 	<ul style="list-style-type: none"> • Requiere de tratamiento previo de la

	<p>simultáneamente la Carbamazepina y su metabolito más importante (CBC-E) con una reproducibilidad satisfactoria.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Determinación de compuestos no volátiles (alto Peso Molecular, iones metálicos) o termolábiles. • Determinaciones cuantitativas exactas 	<p>muestra</p> <ul style="list-style-type: none"> • Instrumentación costosa • Difícil análisis cualitativo • No existe detector universal y sensible • Elevado costo de operación • Experiencia indispensable
<p>ESPECTROMETRÍA DE MASAS</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Analíticamente sensible, específica y capaz de medir diversos compuestos en una única prueba • Capacidad de identificación inequívoca de casi cualquier sustancia, desde átomos hasta moléculas complejas de peso molecular elevado • Análisis cuanti y cualitativo • Identificación de sustancias en presencia de otras similares • Técnica universal y específica • Información estructural, energías de enlace, cinética, fisicoquímica • Técnica rápida 	<ul style="list-style-type: none"> • Gran costo • Personal científico capacitado • Tiempos de análisis largos • Necesidad de disponer de la muestra en fase vapor sin descomposición lo que implica que la sustancia a analizar sea: <ul style="list-style-type: none"> • Volátil • Termoestable • Es una técnica destructiva. • Es necesario un alto vacío (10⁻⁶ torr). • Dificultad operativa • Dificultad de analizar sustancias de alto peso molecular

Comparando y analizando la tabla anterior podemos visualizar los Métodos de Identificación para la Carbamazepina, en todo laboratorio ya sea Analítico, Clínico o Forense se busca economizar, la rapidez y la confiabilidad en los Métodos, sin embargo, en este caso en particular podemos decir que la Espectrometría de Masas es un Método sensible, confiable, con la opción a identificación y cuantificación, a pesar de su alto costo.

Hoy en día en la Procuraduría General de Justicia de Coyoacán, México, D.F, es utilizado el inmunoensayo acoplado a masas esto es, que buscan una técnica más sofisticada debido a que no siempre se podrá identificar en una muestra un solo componente si no que estarán presentes más de un fármaco o droga de interés.

En cuanto a la determinación preliminar como ya se mencionó actúa de diversas formas, dependiendo los casos, si el individuo o paciente es trasladado a una institución de Salud se procede a la extracción de sangre, para determinar si el fármaco es el causante de ésta, o en ocasiones simplemente se hace un cambio en el tratamiento del paciente; sin embargo, en casos que se pueden considerar como ilícitos se procede a investigar el hecho de que el paciente haya sido intoxicado deliberadamente por sí mismo o por alguna otra persona, si está consciente se puede hacer un interrogatorio para saber la causa de la posible ingesta el fármaco, pero si el paciente fallece en este caso se procede a realizar una investigación ordenada de los posibles indicios (Cadena de Custodia) que hayan provocado su muerte y a determinar si en efecto el fármaco en cuestión es el responsable de la muerte.

11.CONCLUSIONES

- La intoxicación por Carbamazepina es un tema importante en la toxicología clínica y forense, que requiere métodos adecuados, útiles para la interpretación diagnóstica de contenido en fluidos biológicos para la correcta identificación de este fármaco y evitar posibles complicaciones de salud.
- Las condiciones propuestas de aislamiento de Carbamazepina en los dos artículos citados en el presente trabajo y sus metabolitos pueden ser útiles en el diagnóstico clínico de la intoxicación por sustancias químicas (fármacos ilegales) y la monitorización de la terapia, cabe mencionar que los HPLC-MS y el CG/MS son métodos de elección propuestos, desarrollados, probados y que en la actualidad su uso es frecuente, aunque los Inmunoensayos comúnmente usados en las Clínicas como en el Instituto de Neurología se usa la Quimioluminiscencia, por su bajo costo en consumibles e insumos.
- Es importante, una evaluación objetiva de la gravedad de la intoxicación, curso clínico y determinar el mecanismo de la muerte súbita (si es que la hay), para poder realizar las pruebas necesarias e identificar correctamente cual fue el motivo principal de la intoxicación.
- La investigación en el campo del diagnóstico químico, la confrontación de la salud y los síntomas de la paciente en el momento del evento, y exámenes post-mortem; son necesarios para las aportaciones a las distintas ramas que se ven involucradas como la Química Forense, Medicina e incluso el área legal, para poder así obtener de una manera, rápida, segura, confiable toda la información necesaria en caso de que se presente un evento de este tipo.

- Se describieron las propiedades terapéuticas, farmacológicas, toxicológicas, reacciones adversas y los efectos tóxicos de la Carbamazepina, cumpliendo con el objetivo del presente trabajo para su aplicación pertinente en algún caso que se requiera dicha información.
- Los métodos preliminares para su identificación incluyen a la Cromatografía de Capa Delgada y Pruebas Colorimétricas, en los que la matriz de elección puede ser el contenido estomacal o residuos de la escena
- En los métodos de cuantificación, el Método de elección depende de las condiciones y equipos con los que el laboratorio cuente, se describieron tres tipos de Métodos principales, los Enzimáticos, los Cromatográficos y la Espectrometría de Masas, esta a su vez puede ser acoplada a Cromatografía de Gases, Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución o a un Método Enzimático.
- De igual manera podemos concluir que la matriz biológica más óptima en cuanto a su identificación es la saliva, ya que es una muestra que no requiere de un método invasivo para su obtención, sin embargo, en el presente trabajo se menciona la sangre (suero o plasma), para su identificación en casos de intoxicación, debido a que se puede medir tanto el fármaco presente como Carbamazepina y sus metabolitos.

12.GLOSARIO

a) Farmacodependencia

Es el conjunto de fenómenos de comportamiento, cognoscitivos y fisiológicos, que se desarrollan luego del consumo repetido de estupefacientes o psicotrópicos.¹

b) Fármaco

A la sustancia natural o sintética que tenga alguna actividad farmacológica y que se identifique por sus propiedades físicas, químicas o acciones biológicas, que no se presenten en forma farmacéutica y que reúna condiciones para ser empleada como medicamento o ingrediente de un medicamento.²

c) Medicamento

A toda sustancia o mezcla de sustancias de origen natural o sintético que tenga efecto terapéutico, preventivo o rehabilitatorio, que se presente en forma farmacéutica y se identifique como tal por su actividad farmacológica, características físicas, químicas y biológicas.²

d) Estupefaciente

Fármacos que modifican las funciones cerebrales provocando estupor, comprende básicamente de los derivados naturales de opio y de los derivados sintéticos de los opiáceos.³

¹Cámara de Diputados del H. Congreso de la Unión, Secretaría General Secretaría de Servicios Parlamentarios , Ley General de Salud, Última Reforma DOF 15-01-2014

²Norma Oficial Mexicana NOM-059-SSA1-2013, Buenas prácticas de fabricación de medicamentos

e) Psicotrópico

Fármacos cuyas acciones modifican el humor, raciocinio y conducta de los individuos a quienes se les administra, por lo que son utilizados en el tratamiento de padecimientos cerebrales. Debido a que son susceptibles de abuso, pueden producir farmacodependencia.³

f) Convulsiones

Las convulsiones son episodios breves de contracciones musculares que pueden afectar a una parte del cuerpo (convulsiones parciales) o a su totalidad (convulsiones generalizadas) y a veces se acompañan de pérdida de la consciencia y del control de los esfínteres.⁴

g) Convulsiones tónico-clónicas

Estas crisis tienen un fase inicial tónica (excitatoria) con una duración de 5 a 10 segundos, seguidos de flexiones pequeñas y rápidas de los brazos, que pueden evolucionar a contracciones clónicas con una frecuencia de 5 Hz que reduce progresivamente.⁵

h) Crisis simples

Son movimientos que se producen por activación de las áreas de 4 y 6 de Brodmann.

Tienen un carácter estereotipado, repetitivo, que afectan el mismo segmento corporal y que se mueven en un plano constante. Si se tiene en cuenta su duración, ritmicidad y grupo musculares involucrados pueden subdividirse: Mioclónicas, clónicas, tónicas, espasmos epilépticos, tonicoclónicas, versivas.⁵

i) Crisis complejas

Los movimientos son similares a los naturales el cuerpo, también son llamados automatismos. Comprometen varios segmentos corporales que se mueven en diferentes planos: hipermotoras, automatismos motores, gelásticas.⁵⁹

³Secretaría de Salud. Comisión Permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. Suplemento para Establecimientos Dedicados a la Venta y Suministro de Medicamentos y Otros Insumos para la Salud, 4ª Edición, México, 2010.

⁴ Organización Mundial de la Salud, OMS

⁵ Medina Malo Carlos, Epilepsia Aspectos Cínicos y Psicosociales, Edit. Médica Panamericana, Colombia, 2004

j) Fenómeno kindling

Consiste en la estimulación repetida, eléctrica o química, sobre diversas estructuras del sistema límbico (habitualmente amígdala, corteza e hipocampo) de modo que, con el paso del tiempo hay un aumento de la excitabilidad y las neuronas se transforman en "neuronas patológicas" capaces de generar crisis epilépticas, primero, cuando se las estimula y, posteriormente, en algunos modelos de animales, también de forma espontánea. La instauración del kindling es gradual y se distinguen una serie de etapas que van de 0 a 5; en esta última etapa las crisis son ya permanentes. Se considera que el mecanismo inicial del kindling es la potenciación prolongada (LTP, longterm potentiation), cuyo objetivo es conseguir que una breve descarga de frecuencia repetitiva produzca un aumento mantenido de la respuesta sináptica en el hipocampo que puede durar días o semanas. Los cambios anatómicos y bioquímicos que se observan tanto en el kindling como en las convulsiones repetidas o en el estado convulsivo son:

— Liberación de glutámico que activa receptores NMDA.

— Aumento del calcio intracelular que activa la proteincinasa II dependiente de calciocalmodulina.

— Apoptosis y muerte neuronal selectiva en áreas CA1, CA3 y zona del hilus del hipocampo. La mayor susceptibilidad de estas áreas que conduce a la apoptosis se debe a dos hechos: falta de mecanismos protectores intracelulares y una mayor proporción de receptores con afinidad por aminoácidos excitatorios (glutamato y aspartato).

— Proliferación o sprouting de axones de las células granulares de la fascia dentada (fibras musgosas) que establecen contacto con la capa molecular del giro dentado tanto con neuronas excitadoras como con interneuronas inhibitoras. El papel que desempeña la reinervación por las fibras musgosas en la epileptogénesis sigue en controversia, y se indica que puede tratarse más de una consecuencia que de la causa de las crisis. No obstante, existen otros estudios en los que se muestra cómo esta proliferación amplifica las descargas.

— Incremento de la neurogénesis en el giro dentado. Estas neuronas recién formadas tienen propiedades electrofisiológicas y localizaciones diferentes de las habituales, por lo que se supone

intervienen en la generación de redes anormales hiperexcitables y en la aparición de nuevas crisis epilépticas.⁶

k) Efecto Adverso (Reacción adversa a medicamentos)⁹

A cualquier ocurrencia médica desafortunada en un paciente o sujeto de investigación clínica a quien se le administró un medicamento y que puede o no tener una relación causal con este tratamiento.⁷

Una reacción adversa a un medicamento (RAM) se puede definir como "cualquier respuesta a un fármaco que es nociva, no intencionada y que se produce a dosis habituales para la profilaxis, diagnóstico, o tratamiento...". Por tanto, las RAM son efectos no deseados ni intencionados de un medicamento, incluidos los efectos idiosincrásicos, que se producen durante su uso adecuado. Difieren de la dosificación excesiva accidental o intencionada o de la mala administración de un fármaco.⁴

l) Efecto Tóxico

Cualquier desviación del funcionamiento normal del organismo que ha sido producida por la exposición a sustancias tóxicas.³

m) Muerte Súbita Inesperada

Se puede definir como muerte inesperada, sin síntomas precedentes la mayoría de las veces o que, en casos de existir éstos, ocurren pocos segundos antes de que la muerte sobrevenga, y sin causa traumática que la explique. Se considera muerte súbita (MS) la que ocurre de manera inesperada dentro de la primera hora desde el inicio de los síntomas o si se produce en ausencia de testigos cuando el fallecido ha sido visto en buenas condiciones menos de 24 h antes de hallarlo muerto.

n) Intoxicación

La acción de un agente tóxico sobre un organismo se traduce en una alteración del estado fisiológico o de salud; por lo tanto una intoxicación es una enfermedad. Según, el grado de afectación del individuo, la intoxicación puede calificarse como leve, moderada y severa o grave. También puede ser

⁶Modelos experimentales en epilepsia

⁷NORMA Oficial Mexicana NOM-220-SSA1-2012, Instalación y Operación de la Farmacovigilancia

considerada bajo un criterio patocrónico, es decir, estimando su curso o evolución en función del tiempo, y así podemos clasificarlas de intoxicaciones agudas, crónicas y recidivantes.⁸

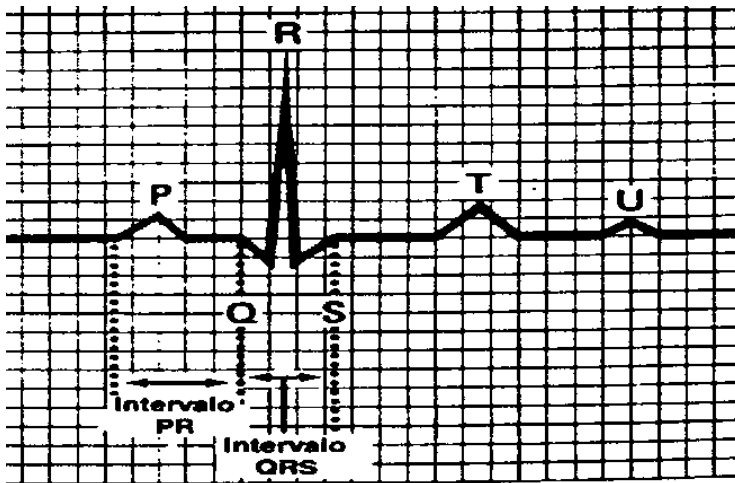
o) Intoxicación aguda

Consiste en la aparición de un cuadro clínico patológico, tras una única exposición a una sustancia o múltiples exposiciones en un periodo de 24 horas.⁷

p) Intoxicación crónica

Es la consecuencia a la repetida absorción de un tóxico. A veces esta absorción se produce en cantidades por sí mismas insuficientes para hacer patentes trastornos tóxicos, pero que por acumulación del producto dentro el organismo, normalmente en órganos, tejidos concretos, o por suma de efectos lesivos, con el transcurso del tiempo, lleva a estados patológicos.⁷

q) Onda QRS



El primer elemento en el trazo electrocardiográfico es la Onda P que resulta de los frentes de despolarización de las aurículas derecha e izquierda, su duración normal es de 0.06 a 0.10 seg., el voltaje normal es de hasta 0.25 mV (2.5mm.)

⁸RepettoJiménez, M.; Et Al; Toxicología Fundamental, 4º Ed., Díaz de Santos Editorial, España 2009, p.22-23

IntervaloPR: representa el tiempo que mide la primera activación auricular y la primera activación ventricular y se mide desde el comienzo de la Onda P hasta el inicio del complejo QRS. La duración normal es de 0.12 a 0.20 seg.

Complejo QRS:corresponde a las manifestaciones de los principales vectores resultantes de la activación ventricular.Corresponde a la despolarización ventricular.

Onda R: deflexión positiva del complejo ventricular.

Onda S: deflexión negativa que sigue a la Onda R, la duración normal del complejo QRS es de 0.06 a 0.10 seg.

Segmento ST: corresponde a la fase de la repolarización ventricular y comprende desde la finalización de la Onda S hasta el inicio de la Onda T, la segunda parte de la repolarización corresponde a la inscripción de la Onda T

Intervalo QT: constituye la integración de todos los potenciales de acción del miocardio contráctil ventricular

El voltaje del QRS es muy variable.

Si se produce un retraso o una interrupción de la conducción en cualquiera de las ramas del haz, el QRS se ensanchará de la manera característica del bloqueo de la rama derecha o izquierda del haz.

r) Cadena de custodia

Es el procedimiento de control que se aplica al indicio o dato de prueba material, ya sea vestigio, huella, medio de comisión, objeto material o producto relacionado con el hecho que la ley señala como delito, desde su localización por parte de cualquier autoridad, Agente del Ministerio Público, policía y peritos, hasta que la autoridad competente ordene su conclusión. Tiene como fin que dichos datos de prueba no se alteren, modifiquen, destruyan o desaparezcan.⁹

Es el registro fiel del curso seguido por los indicios o evidencia desde su descubrimiento por parte de una autoridad, policía o agente del Ministerio Público, hasta que la autoridad competente ordene su conclusión, según se trate de Averiguación Previa, Carpeta de Investigación o Proceso Penal.¹⁰

s) Indicio

⁹ Gaceta Oficial de la Federación, 13 de Septiembre 2013

¹⁰Código Penal

Son las huellas, vestigios y demás elementos físicos encontrados en el lugar de los hechos, de su hallazgo, o bien aquellos derivados de una revisión o examen corporal que, por sus características, indiquen que existe la probabilidad de que tengan alguna relación con la comisión del hecho señalado por la ley como delito. El indicio adquirirá el carácter de dato de prueba cuando sea incorporado por el ministerio público a la investigación, por considerarlo idóneo, pertinente y suficiente, para establecer que se ha cometido un hecho que la ley señale como delito y que exista la probabilidad de que el imputado intervino en su comisión.⁹

t) Anticuerpo

Es una proteína producida por el cuerpo en respuesta a una sustancia “invasora” (extraña). Los anticuerpos se producen como parte de la respuesta inmunológica del cuerpo para protegerse.¹¹

u) Antígeno

Es la sustancia que el cuerpo está tratando de “combatir” (eliminar o reducir) preparando una respuesta inmunológica. Algunos test de inmunoensayos determinan la presencia de antígenos directamente, en vez de buscar anticuerpos. En un análisis para medir la concentración de una droga terapéutica, por ejemplo, la droga es el antígeno que se une al anticuerpo.¹¹

13.ABREVIATURAS

- a) CBZ: Carbamazepina
- b) AMPc: Adenosina Mono Fosfato Cíclico
- c) AV: Atrio Ventricular

¹¹ Wild D, The Immunoassay Book. New York: Stockton Press;1994.

14.REFERENCIAS

1. Ray, O., C. Ksir, *Drugs, Society and Human Behavior*, 6ª ed., Mosby, St. Louis, 1993.
2. Cámara de Diputados del H. Congreso de la Unión, Secretaría General Secretaría de Servicios Parlamentarios, Ley General de Salud, Última Reforma DOF 15-01-2014
3. Entrevista con el Supervisor Operativo Técnico del Laboratorio de Hormonas y Niveles Séricos de Antiepilépticos del Instituto de Neurología, Josué Isaac Morales Villavicencio
4. Figueroa Duarte A.S., Estudio clínico, Epidemiológico y Sociocultural de la Epilepsia. Un Enfoque Crítico, *ArchNeurocién(Mex)*, 2010, Vol. 15, No. 3: 139-151.
5. Organización Mundial de la Salud, OMS.
6. Luo Z., Et. Al., Sudden Unexpected Death in Epilepsy: Evaluation of Forensic Autopsy cases, *Forensic Science International* 223, 2012, 171–175.
7. Wojciech P., Et. Al., Carbamazepine Intoxication in Alcohol Dependent Epileptic Patients, *Pharmacological Reports* 62, 2010. 398-404.
8. Romano-Moreno S., Medina-Rojas Eréndida Lizbeth, Et. Al. Farmacocinética poblacional de Carbamazepina en pacientes epilépticos adultos, *Revista de Investigación Clínica*, 2005, vol. 57, num1 ,Enero-Febrero, pp:38-48.
9. Protasio L., PizzornoElina, Bello Osvaldo, Intoxicación por Carbamazepina, *ArchPediatrUrug*, 2005; 76(1): 43-45.
10. Herranz Aguirre M. Intoxicaciones por psicofármacos. En: *Manual de Intoxicación en Pediatría*. Madrid: Ergon, 2003: 133-4.

11. Lares Asseff I., Sosa Macías M.: Et Al; Farmacoepidemiología de psicofármacos empleados en la práctica pediátrica en el Servicio de Psiquiatría Infantil del Hospital General de Durango, México, Vol. 67, p: 27-36.
12. Goodman GA. Las bases farmacológicas de la terapéutica. Vol. 1.9a. edición. España: Editorial Panamericana,2000, p. 491-506.
13. M. P. Ortega García, Et. Al., Revisión de los casos de intoxicación por Carbamazepina en un hospital general en un periodo de 5 años, Farmacia Hospitalaria, 2001, Vol. 25. N.º 6, pp. 332-337.
14. Psillakis T, Tsatsakis AM, Christodoulou P, Et Al, Niveles de Carbamazepina en el Cabello de Pacientes Sometidos a Tratamiento Prolongado: Método para Evaluar los Antecedentes de Consumo de esta Fármaco, Rev. Journal of ClinicalPharmacology,, 1999, 39:55-67.
15. Mennickent C S., Vega H M., Godoy M. C. G., León H M. D.,Relación entre niveles de Carbamazepina en saliva y plasma: Estudio piloto. Rev. méd. Chile, 2007; 135(3): 335-340.
16. Edward Kim, M.D., Uses of Carbamazepine for Psychiatric, Disorders: A Review
17. Ashton E. Guidelines for the rational use of benzodiazepines. When and what to use. Drugs, 1994; 48: 25-40.
18. <http://www.eutimia.com/psicofarmacos/anticiclicos/Carbamazepina.htm>
19. NebojsaArsenovic MD SpecPath, Fatal carbamazepine induced fulminant eosinophilic (hypersensitivity) myocarditis: Emphasis on anatomical and histological characteristics, mechanisms and genetics of drug hypersensitivity and differential diagnosis, Journal of Forensic and Legal Medicine, 2010, 17, 57–6.
20. ChenY.-T., Carbamazepine-Induced Toxic Effects and HLA-B*1502 Screening in Taiwan, N Engl J Med, 2011;364:1126-33.
21. MacKichan JJ, Kutt H. Carbamazepine: therapeutic use and serum concentration monitoring. In: Taylor WJ, Finn AL. eds. Individualizing drug therapy: practical applications of drug monitoring: New York: Gross, Townsend, Franck 198.
22. Roa Bernal C. Uribe Granja, Pardo Herrera J., Delgado Rodríguez O.,Guías de Práctica Clínica Basadas en la Evidencia, Intoxicaciones por Medicamentos, , Asociación Colombiana de Facultades de Medicina- Ascofame, pp: 27-30
23. ReppetoJimenez, M.I; Et Al; Toxicología Fundamental, 4º Ed., Díaz de Santos Editorial, España, 2009, p.22-23.

24. Cabrera Bonet R. Et Al; Toxicología de los psicofármacos. Edit. Mosby/ Doyma Libros, España, 1994, p:157-158.
25. Skopp G., Preanalytic aspects in postmortem toxicology, Forensic Science International 142, 2004, 75–100.
26. Abstracts / Toxicology Letters 189S,(2009), S57–S273.
27. Código Penal
28. Flanagan R. J., Manual de procedimientos analíticos toxicológicos para laboratorios de baja complejidad, international programme on chemical safety geneva, 1995, pp: 84-85.
29. Aldaz A., Et. Al., Monitorización farmacocinética de antiepilépticos, Elsevier. Farmacia Hospitalaria, España, 2011;35(6):326---339.
30. Wild D, editor. The Immunoassay Book. New York: Stockton Press; 1994.
31. González de Buitrago. Técnicas y métodos de laboratorio clínico. Ed. Masson. 2004.
32. Fuentes Arderiu, X. Bioquímica clínica y patología molecular. Ed. Reverté. 1998.
33. González de Buitrago, J.M. Bioquímica clínica. Ed. McGraw-Hill. 1998
34. García-Campaña, Quimioluminiscencia: una interesante alternativa para la detección analítica en sistemas de flujo, Ars Pharmaceutica, 2001,42:1; 81-107.
35. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, Método General de Análisis 0241 Cromatografía, 10° Edición, Tomo I, México, 2011.
36. Snezana D., Determination of carbamazepine in serum and saliva samples by high performance liquid chromatography with ultraviolet detection, Military Medical Academy, National Poison Control Centre, Crnotravska, 2009, volumen 66, pp:347-352.
37. Moreno J., Et. Al., Comparación del análisis inmunoenzimático y la cromatografía de líquidos de alta eficiencia (EMIT y HPLC) para la medición de Carbamazepina en muestras séricas, salud mental, octubre 2001, vol. 24, no. 5.
38. Chen C.H and Shih-Ku L, Carbamazepine treatment of bipolar disorder: a retrospective evaluation of naturalistic long-term outcomes, Chen and Lin BMC Psychiatry, 12:47, 2012.
39. Anderson R. J., Bendell D. J., Groundwater P. W., Organic Spectroscopic Analysis, Royal Society Chemistry, 2004.
40. Malgorzata K. Et. Al., Postmortem Toxicology of Carbamazepine Journal of Analytical Toxicology, 2003, Vol. 27, May/June, 243-248.

41. Stark M, The Clinical Management of Substance Misusers in Police Custody – a survey of current practice, *Journal of Clinical Forensic Medicine*, 2005, 12, 199–204.
42. Spina E, Pisani F, Perucca E. Clinically significant pharmacokinetic drug interactions with carbamazepine. An update. *ClinPharmacokinet*;, 1996, 31: 198-214.
43. Lifshitz M, Gavrilov V, Sofer S. Signs and symptoms of carbamazepine overdose in young children. *PediatrEmergCare*;2000, 16(1): 26-7.
44. Linnet MD, Et. Al., Postmortem drug concentration intervals for the non-intoxicated state e A review, *Journal of Forensic and Legal Medicine*;2012 19, 245-249.