

El humor vítreo como fluido biológico de importancia clínica en ciencias forenses

Vitreous humour as a biofluid of clinical importance in forensic sciences

Humor vítreo como fluido biológico de importância clínica nas ciências forenses

► Carlos Victor Montefusco-Pereira¹, Luciana de Matos Alves Pinto²

¹ M.Sc. en Ciencias Forenses (University of Lincoln, United Kingdom).

² Doctora Biología Funcional y Molecular (Universidade Federal de Lavras, Departamento de Química, Brasil).

Resumen

El humor, cuerpo o fluido vítreo (HV) es un gel claro que ocupa la cavidad vítrea o cavidad posterior del globo ocular y cuyas funciones son las de dar volumen al ojo, sostener la retina y mantener su transparencia de manera que los haces de luz puedan atravesarla. En este estudio se aborda la importancia del humor vítreo como muestra en el área de la bioquímica clínica, y se destaca su valor en el ámbito de las ciencias forenses. El humor vítreo es una muestra indispensable en la investigación de casos de muertes sospechosas, inexplicables o violentas, puesto que su ubicación proporciona un medio estéril para determinaciones como la confirmación *post mortem* de la ingestión de etanol. Tiene un rol en la determinación de drogas, intervalo *post mortem*, diabetes, deshidratación, desnutrición e insuficiencia renal. La interpretación de los datos puede ser problemática donde factores como la difusión *post mortem* de las drogas desde el cerebro hacia la cavidad vítrea, el método analítico, la recolección de la muestra, la calibración y el tratamiento estadístico de los datos aportan dificultad en la interpretación y añaden más variables a la hipótesis de investigación. La investigación del humor vítreo como matriz de análisis tiene una importancia considerable y debería ser difundida en países como Brasil y otros de América Latina donde, a pesar de existir personal capacitado para trabajar con esta muestra, este tipo de análisis no se pone en práctica con la debida frecuencia.

Palabras clave: cuerpo vítreo * toxicología * medicina legal * drogas de abuso * cambios *post mortem* * ciencias forenses

Summary

The vitreous humor, body or fluid is the clear gel that fills the vitreous chamber or posterior chamber of the eyeball, whose functions are to give volume to the eye, serve as retina support and maintain its transparency to allow light beams to reach the retina. This study addresses the vitreous humor as an important sample for clinical biochemistry, pointing out its value for forensic sciences. The vitreous humor is a mandatory sample in cases of

Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana

Incorporada al Chemical Abstract Service.

Código bibliográfico: ABCLDL.

ISSN 0325-2957

ISSN 1851-6114 en línea

ISSN 1852-396X (CD-ROM)

suspected, unexplained or violent deaths and its location gives a sterile medium for the postmortem confirmation of alcohol intake. It plays a role in the measurement of drugs, estimation of postmortem interval, and definition of diabetes, dehydration and renal failure. Factors such as drug postmortem diffusion in the vitreous humour coming from the brain, along with factors of the analytical method such as the collection process, calibration and statistical processing of data, make it difficult to interpret and add more variables to the cases investigated. HV use should be promoted in countries like Brazil and in Latin America, which possess trained professionals to address and use this biological sample, but who do not work with it frequently.

Keywords: *vitreous body * toxicology * legal medicine * abuse drugs * postmortem changes * forensic*

Resumo

O humor, corpo ou fluido vítreo (HV) é um gel claro que enche a cavidade vítrea ou cavidade posterior do globo ocular, cujas funções são dar volume ao olho, apoiar a retina e manter a sua transparência para permitir que os feixes de luz possam atravessá-la. Este trabalho aborda a importância do humor vítreo como amostra na área da bioquímica clínica, destacando seu valor no âmbito das ciências forenses. O humor vítreo é amostra obrigatória na investigação de casos de mortes suspeitas, inexplicáveis ou violentas, visto que sua localização provê um meio estéril para, por exemplo, determinações como a confirmação post mortem da ingestão de etanol. Tem um papel na mensuração de drogas, estimação do intervalo post mortem, diabetes, desidratação, desnutrição e insuficiência renal. Fatores como a difusão post mortem das drogas desde o cérebro para a cavidade vítrea, juntamente com o método analítico, o processo de coleta da amostra, calibração e tratamento estatístico dos dados, trazem dificuldades na interpretação e adicionam mais variáveis às hipóteses de investigação. A investigação do humor vítreo como matriz de análise tem importância considerável e deveria ser divulgada em países como o Brasil e outros da América Latina onde, apesar de contar com profissionais capacitados para trabalhar com esta amostra, ainda não colocam em prática esta análise com a merecida frequência.

Palavras-chave: *corpo vítreo * toxicologia * medicina legal * drogas de abuso * mudanças post mortem * ciências forenses*

Introducción

La investigación criminal siempre ha sido un tema muy atractivo, asumiendo distintos matices de interés mórbido y especulativo en todos los aspectos relacionados a la perpetuación de un crimen.

La segunda muestra de mayor importancia para la toxicología forense, después de la sangre, es el humor vítreo. En algunos casos resulta incluso más conveniente que la sangre, debido a que es un fluido acelular y aislado, menos susceptible a la contaminación y a cambios de índole bioquímica. Es por esta razón que se pueden realizar estudios electrolíticos en humor vítreo cuando la sangre no es una muestra viable para ello (1).

Muchas muertes van acompañadas de la ingestión de varias drogas, por lo que es necesario muestrear mayor cantidad de tejido o fluido durante la autopsia, para que el análisis toxicológico pueda realizarse de manera exhaustiva. En tales casos, se recomienda recolectar las siguientes muestras (y sus cantidades respectivas) durante la autopsia: cerebro (50 g); hígado (50 g); riñón (50 g); sangre del corazón (25 mL); sangre periférica (10 mL); humor vítreo (todo el disponible); bilis (toda

la disponible); orina (toda la disponible); contenido gástrico (todo el disponible) (2).

Frente a las nuevas formas de crimen y las dificultades para determinar la causa, el mecanismo y la forma de muerte, la necropsia se puede beneficiar de trabajos de investigación que expongan el valor de nuevas muestras para detectar drogas, estimar el intervalo *postmortem* y otras estrategias dentro de las ciencias forenses.

El objetivo del presente trabajo es describir la importancia del humor vítreo como muestra de fluido biológico. Así, es necesario esclarecer su función, anatomía y composición química, pero, principalmente, describir sus funciones en la medicina, la toxicología y la química, en el ámbito legal.

¿Qué es el humor vítreo?

El interior del ojo está dividido en tres cámaras: anterior, posterior y vítrea o extrema posterior (Figura 1) (3). El humor vítreo pesa cerca de 4 g y ocupa un volumen de aproximadamente 4 mL. El peso y volumen exactos varían con la edad y el tamaño del ojo. El es-

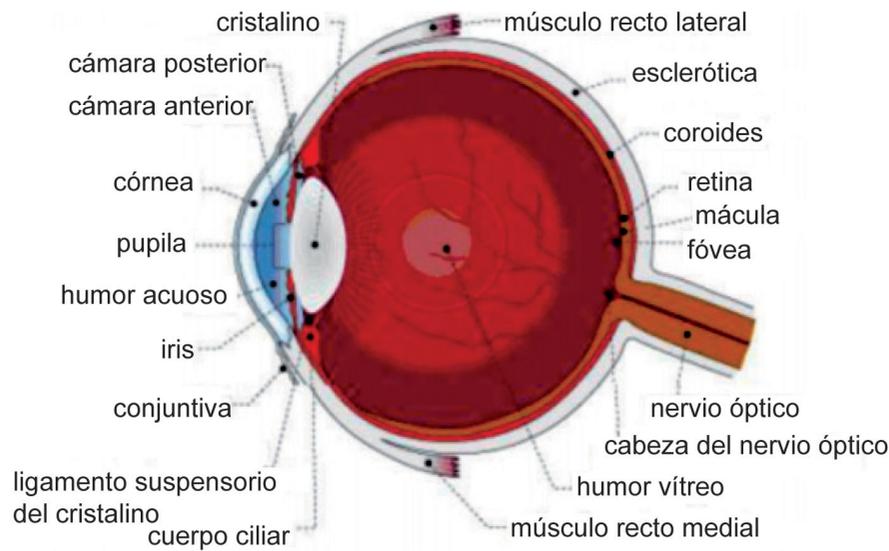


Figura 1. Representación esquemática del ojo humano (32).

pacio que ocupa el cuerpo vítreo es esférico, con una depresión en la superficie anterior, denominada fosa patelar, la cual se corresponde con la superficie posterior de la lente cristalina (4).

Según Ramalho (5), las células vítreas se clasifican en: hialocitos, células ovales o reniformes, de 10 a 15 micrómetros de diámetro, P.A.S. positivas (presentan coloración con ácido periódico – Schiff o coloración P.A.S.) y tienen la capacidad de sintetizar colágeno; y fibroblastos, que llegan a constituir menos del 10% de la población celular total del humor vítreo, situados en la base del mismo. Aunque el vítreo esté constituido en un 99% por agua, este tejido se asemeja a un gel viscoelástico. Estas propiedades se deben al colágeno y al ácido hialurónico (y a la interacción entre ambos), que son los componentes estructurales mayoritarios del humor vítreo.

En una autopsia, el humor vítreo debe aspirarse con cuidado para la obtención de resultados fiables. Para ello, una aguja hipodérmica, muy fina, encajada en una jeringa de 5 mL se inserta en la esquina externa del globo ocular, luego de haber retirado el párpado hacia un costado. La aguja se debe insertar en el centro del globo para evitar la aspiración de material cerca de la retina, que presenta una composición química muy diferente de la del humor vítreo debido a los pedazos de retina desplazada que podrían entrar en la jeringa (Figura 2). El fluido debe aspirarse lentamente y con suavidad; debe recolectarse de ambos ojos, puesto que con frecuencia su composición química difiere. Después de la extracción del humor vítreo, el globo puede rellenarse con agua para mejorar la apariencia de los ojos. El almacenamiento de muestras de humor vítreo destinadas a la detección de alcohol y otras drogas requiere de la adición de fluoruro de potasio para inhibir la formación *postmortem* de etanol (6).

Metabolismo del humor vítreo

Por muy apropiada que sea la recolección de la muestra, los procesos metabólicos naturales son inevitables debido a las interacciones moleculares, la edad avanzada e incluso la densidad del humor vítreo que, por ejemplo, tiene características diferentes en los recién nacidos.

Los niveles de glucosa en la sangre suelen decrecer hasta llegar a cero dentro de las primeras horas después de la muerte, aunque a veces se miden concentraciones elevadas que no corresponden al nivel real de glucosa en el momento de la muerte, sino a procesos posteriores. La glucogenólisis *postmortem* en el hígado aumenta la difusión de glucosa en la vena cava y el ventrículo derecho del corazón. La liberación de catecolaminas y fluidos intravenosos que contienen la glucosa administrada durante la reanimación, también eleva las concentraciones *postmortem* de glucosa en la sangre situada lejos del hígado. Así, la medición *postmortem* de los niveles de glucosa en sangre no aporta datos fiables

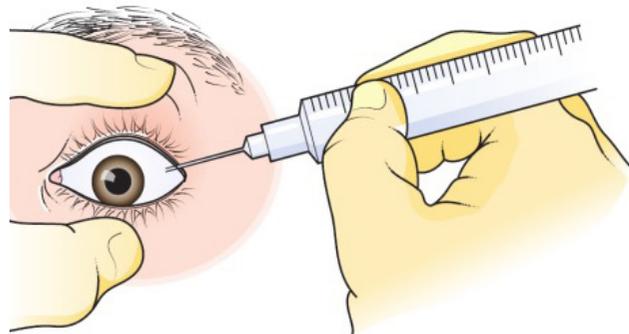


Figura 2. Obtención de humor vítreo para análisis (6).

para determinar la presencia de diabetes. En cambio, las concentraciones de glucosa medidas en humor vítreo jamás son superiores a 200 mg/dL, salvo que exista diabetes. Los niveles de glucosa en el humor vítreo también sufren una disminución *postmortem*, pero muy rara vez esto impacta de manera importante en el elevado contenido de glucosa de los diabéticos mal controlados. De esta manera, la cetoacidosis diabética se puede diagnosticar dentro de un período corto (una media de 16 horas) después de la muerte, por glucosa vítrea (superior a 200 mg/dL) y cetonas elevadas (7)(8).

En relación a la edad, existen alteraciones que ocurren en la estructura vítrea a lo largo de la vida. En la fase más tardía de la vida de un individuo, el cuerpo vítreo es relativamente pequeño y tiene una apariencia densa, encontrándose la mayor densidad en la "corteza" externa, correspondiente al córtex vítreo. La densidad generalizada del cuerpo vítreo durante dicha fase puede deberse a que el colágeno y el proteoglicano, un compuesto distinto del ácido hialurónico, son sus principales componentes estructurales.

¿Cuál es el papel del humor vítreo en la medicina legal?

El análisis químico del humor vítreo contribuye a establecer la causa de muerte (deshidratación, hipoglicemia, etc.), pues ayuda a evaluar los efectos fisiológicos subyacentes y los hallazgos anatómicos de la autopsia, además de que puede facilitar la determinación del momento de la muerte.

El diagnóstico de deshidratación se puede confirmar por análisis bioquímicos y clínicos del humor vítreo, mediante la comprobación de sodio (>155 mmol/L) y cloruro (>135 mmol/L) vítreos, simultáneamente elevados, junto a un aumento moderado del nitrógeno ureico (400-1000 mg/L). Es especialmente difícil discriminar entre víctimas del síndrome de muerte súbita infantil (SMSI) y víctimas de asfixia accidental o contusión, incluyendo asfixia por compresión torácica, intoxicación, ahogamiento o mecanismos de agitación. Es la autopsia misma la que debe satisfacer ciertos criterios que incluyen, precisamente, el contenido normal de electrolitos en el humor vítreo. En cuanto a la hiperglicemia cerebral, la reducción del O_2 cerebral se asocia con la reducción del metabolismo de la glucosa, dando lugar a los síntomas del edema citotóxico. Así, el diagnóstico *postmortem* de encefalopatía hipoglicémica está basado en el análisis bioquímico de la orina, del líquido cefalorraquídeo (LCR) y del humor vítreo. En la autopsia, la suma de los niveles de glucosa y ácido láctico en el LCR (o en el humor vítreo) de individuos con hipoglicemia e hiperglicemia, puede ser indicativo de los niveles de glucosa en el momento de la defunción. Sumas de lactato y glucosa >400 mg/dL en el LCR y >450 mg/

dL en el humor vítreo o >500 mg/dL en el LCR y >650 mg/dL en el humor vítreo, contribuyen a muertes relacionadas con hiperglicemia aguda, mientras que sumas <50 mg/dL son una clara señal de situaciones fatales de hipoglicemia (9).

Altas concentraciones de sodio están presentes en el humor vítreo de individuos que mueren a consecuencia de una contusión cerebral, mientras que se han reportado altas concentraciones de magnesio en el humor vítreo de individuos con enfermedades hepáticas crónicas (10). Es por ello que se ha propuesto la utilidad bioquímica *postmortem* del vítreo en los casos de muerte por deshidratación, uremia e hiponatremia (11). También se ha reportado que el nivel de hidratación y el estado renal *antemortem* de un individuo, se reflejan en la elevación simultánea de sodio (>155 mmol/L) y cloruro (>132 mmol/L) en el humor vítreo (12). La concentración vítrea de la urea y la creatinina son útiles para la evaluación del estado renal *antemortem*, debido al aumento de los niveles de calcio en el diagnóstico de hipercalcemia *antemortem* (13). Además, la presencia de bilirrubina en el humor vítreo se ha reportado como patológica, pues indica la presencia de una enfermedad hepática (11).

Se ha detectado una disminución de los niveles de sodio y cloro en alcohólicos que no padecían anomalías patológicas (12). Niveles bajos de magnesio se identificaron como marcadores bioquímicos útiles para el diagnóstico *postmortem* de tetania hipomagnésica en ovejas adultas (14). Se observaron concentraciones vítreas de magnesio <0,60 mmol/L en muestras frescas y <0,65 mmol/L en muestras colectadas 24 horas después del momento del fallecimiento (15).

Por muchos años, el humor vítreo ha sido la muestra preferida para confirmar la ingestión de etanol previa al fallecimiento, pues la liberación de etanol no ocurre tan rápido en el ojo, un medio estéril, como en el resto del organismo. Es por ello que el humor vítreo se utiliza especialmente para la determinación de etanol en cuerpos que ya están en estado de descomposición (16).

En el estudio de Thierauf *et al.* (17), se colectaron muestras de orina, sangre de la vena femoral y humor vítreo, durante la necropsia de 26 fallecidos que se supone habrían consumido etanol antes de la defunción. Solamente en uno de los casos se detectó etilglucurónido (EtG) en orina. Antes de la normalización, las concentraciones variaban entre valores por debajo del límite de cuantificación hasta 150 mg/L, y hasta 816,7 mg/L después de la normalización. El etilsulfato (EtS) presentó el mismo comportamiento. En el humor vítreo se encontraron los siguientes resultados: 24 muestras fueron positivas para EtG con niveles entre 0,1-9,4 mg/L. Por otra parte, se pudo detectar EtS en 23 muestras, con concentraciones que variaban de 0,13 a 4,1 mg/L. Se encontró etanol en 24 muestras con niveles de entre 0,1 y 4,32 g/kg. Los resultados para la determinación

de etanol *postmortem* demostraron ser significativamente más concluyentes en humor vítreo que en sangre (*test* de Wilcoxon, $a = 0,1$, $n = 24$, $R = 0 +$).

El intervalo *postmortem* (IPM) es el intervalo de tiempo transcurrido entre la muerte y el examen posterior del cuerpo. Su determinación es esencial en muchas investigaciones criminales forenses, así como en algunos casos de muerte natural. A pesar de su gran importancia, la determinación de la hora exacta de la muerte es un problema recurrente. A lo largo de las últimas décadas, se ha venido realizando un extenso trabajo para determinar el IPM a partir de diversos cambios físicos, así como del estudio de alteraciones en los constituyentes bioquímicos de varios fluidos corporales, como la sangre, el LCR y el humor vítreo, inmediatamente después de la muerte (18).

La estimación química más común en humor vítreo es la del intervalo *postmortem* por determinación del contenido de potasio. El cálculo más famoso para la estimación del intervalo *postmortem* es el recomendado por Sturmer (19), donde: $IPM \text{ (horas)} = 7,14 \times [\text{concentración de potasio (mEq/L)}] - 39,1$.

También se ha reconocido la utilidad de otros constituyentes para estimar el IPM, particularmente la de la hipoxantina (Hx), el calcio y el magnesio. Las oxipurinas hipoxantina, xantina y ácido úrico representan los estados terminales del catabolismo de la purina en el organismo humano. Se ha reportado el aumento *postmortem* de la hipoxantina, un marcador bioquímico de hipoxia que se acumula en los fluidos corporales durante la degradación hipóxica del adenosín monofosfato (AMP) durante los minutos subsiguientes a un evento de esta naturaleza (20) (21). En el estudio de James *et al.* (22) se sugiere que, al combinar las dos variables (potasio vítreo e hipoxantina), la precisión de las estimaciones de los IPM mejoraría en comparación a determinaciones basadas tan sólo en potasio o tan sólo en hipoxantina. En dicho estudio se proponen las siguientes ecuaciones para la determinación del IPM en base al potasio y a la hipoxantina, respectivamente: I) $IPM \text{ (horas)} = 4,32 [K^+] - 18,35$; II) $IPM \text{ (horas)} = 0,31 [Hx] + 0,05$.

¿Cuál es el papel del humor vítreo en la detección *postmortem* de drogas?

En caso sospecha de muerte por intoxicación, que se sitúa en la categoría de muertes violentas, es obligatorio proceder a la autopsia médico-legal, debiendo solicitar, en la mayoría de los casos, el informe de pericia toxicológica (Código de Proceso Penal - Decreto-Ley N° 3.689, del 3 de octubre de 1941, Brasil; Código Penal - Decreto-Ley n° 2.848, del 7 de diciembre de 1940, Brasil) (23).

Actualmente, miles de compuestos letales por ingestión, inyección o inhalación se encuentran a disposi-

ción del público. Sin embargo, el toxicólogo dispone de una cantidad limitada de material para ejecutar sus análisis, por lo cual es imperativo recopilar toda la información posible sobre los hechos del caso, antes de comenzar con los análisis.

Se ha observado que las concentraciones de drogas en el humor vítreo suelen reflejar las concentraciones que había en sangre circulante una o dos horas antes de la muerte y cualquier droga que se encuentre en la sangre puede detectarse en el vítreo mediante técnicas analíticas suficientemente sensibles, como cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) o cromatografía líquida acoplada a masas (LC-MS) o a un detector por arreglo de diodos (DAD). El vítreo ha sido utilizado durante años para verificar las concentraciones etílicas después de la muerte, ya que la fermentación *postmortem* no es significativa en el ojo. También se lo ha utilizado en el análisis de un gran número de drogas, incluyendo barbitúricos, cocaína, cannabinoides, morfina, antidepresivos tricíclicos y benzodiazepínicos (24). Sin embargo, en general, las concentraciones vítreas de aquellas drogas que tienden a ser más hidrofílicas a pH fisiológico (por ejemplo, la digoxina, la benzoilecognina, el paracetamol, los salicilatos), suelen ser más aproximadas a las respectivas concentraciones sanguíneas y plasmáticas que las concentraciones vítreas de las drogas que se unen fácilmente a las proteínas plasmáticas (antidepresivos tricíclicos) o que son altamente lipofílicas (benzodiazepínicos) (25).

En un estudio realizado por Pelander *et al.* (26), se colectaron muestras vítreas en autopsias médico-legales, mismas que se analizaron por cromatografía líquida de alta resolución acoplada con espectrometría de masas con analizador de tiempo de vuelo (conocida en inglés como *Liquid Chromatography - Time Of Flight - Mass Spectrometry*, LC-TOFMS). Se determinaron valores de corte o límites de sensibilidad para 70 medicamentos en muestras de humor vítreo. El punto de partida para las concentraciones fueron los puntos de corte previamente determinados para muestras de orina. La Tabla I muestra el valor de corte en humor vítreo para cada una de las 70 drogas analizadas.

Dificultades en la interpretación de resultados y problemas de análisis

Aunque se sabe que existe un aumento significativo y progresivo de la concentración de potasio después de la muerte, la controversia está en si este aumento es lineal o bifásico. El nivel de confianza es otro asunto en discusión, así como el efecto de los factores variables. En primer lugar, los valores de potasio difieren entre un ojo y el otro, algunas veces de manera bastante considerable. La toma de muestra es, pues, crítica, ya que las muestras pequeñas o marginales presentan variacio-

Tabla I. Valores de corte de 70 drogas en humor vítreo (26).

Compuesto	Valor de corte (mg/L)	Compuesto	Valor de corte (mg/L)
Acebutolol	0,02	Metadona	0,01
Amitriptilina	0,02	Metanfetamina	0,02
Anlodipino	0,5	Metoprolol	0,01
Anfetamina	0,05	Mianserina	0,015
Atenolol	0,04	Midazolam	0,025
Benzoilecgonina	0,25	Mirtazapina	0,01
Betaxolol	0,01	Moclobemida	0,015
Bisoprolol	0,015	6AM	0,04
Buprenorfina	0,1	Morfina	0,025
Carbamazepina	0,009	Nortriptilina	0,03
Carvedilol	0,09	Olanzapina	0,05
Celiprolol	0,025	Orfenadrina	0,01
Cloroquina	0,1	Oxprenolol	0,01
Citalopram	0,013	Oxicodona	0,025
Clomipramina	0,05	Paroxetina	0,07
Clonidina	0,015	Fenazona	0,0075
Clozapina	0,035	Fenciclidina	0,015
Cocaína	0,01	Fenitoína	0,25
Codeína	0,015	Propranolol	0,008
Dextropropoxifeno	0,02	Quinina	0,03
Ranitidina	0,01	Diazepam	0,03
Diltiazem	0,03	Risperidona	0,05
Dixirazina	0,2	Selegilina	0,4
Doxepin	0,015	Sildenafil	0,35
Etilmorfina	0,02	Sotalol	0,6
Fentanil	0,02	Sulpirida	0,015
Flunitrazepam	0,02	Timolol	0,015
Fluoxetina	0,05	Tizanidina	0,01
Fluoxamina	0,05	Tramadol	0,008
Glipizida	0,5	Trimipramina	0,02
Indometacina	0,8	Venlafaxina	0,007
Cetoprofeno	0,04	Verapamil	0,08
LSD	0,025	Warfarina	0,02
MDMA (Éxtasis)	0,03	Zolpidem	0,01
Melperona	0,01	Zopiclona	0,07

nes importantes. En caso de forzar la aspiración o de realizarla muy cerca de la retina, los fragmentos celulares distorsionan los valores, porque el potasio alcanza al humor vítreo como consecuencia de la fuga desde la retina. Además, las diferentes técnicas analíticas existentes para la determinación de potasio proporcionan resultados diferentes: la antigua fotometría a la llama produce un margen diferente de valores cuando se

compara con los métodos modernos basados en la selección por electrodos (6).

Desde la década de 1960, el aumento en los niveles de potasio se ha utilizado para estimar el IPM. De hecho, se pueden utilizar alrededor de 15 algoritmos para realizar dicha estimación (27). Estos algoritmos provienen de diseños de estudio basados en presuposiciones carentes de un respaldo adecuado para cada caso. En

primera instancia, se excluyen los casos de patología renal, sin evaluar en qué medida esto afecta de manera directa a la estimación del IPM y desconociendo si dicha patología constituye un factor clave del escenario forense. Otros algoritmos usan criterios de inclusión/exclusión, diferencias en el muestreo y tratamiento estadístico que no viabilizan la aplicación más universal de las ecuaciones. A pesar de la amplitud de las investigaciones sobre el uso de potasio para la estimación del IPM, todavía no se ha llegado a un consenso. Las ecuaciones previamente propuestas para la estimación del IPM se basan en una aproximación lineal de la difusión que se produce desde las células circundantes en el vítreo. Se debe investigar mejor la pertinencia de dicha linealidad e incluso considerar modelos no lineales (27) que pueden demostrar que el nivel de potasio es un factor clave, al tomar en cuenta las constantes adecuadas (especialmente para períodos de IPM más prolongados, en los que se puede llegar a una meseta y que luego los niveles se vean afectados por cambios en otros factores, como la temperatura ambiente o la edad del difunto).

La concentración de drogas en humor vítreo depende del tiempo transcurrido entre la ingestión y la muerte, produciéndose una menor razón vítreo/sangre antes de alcanzar el equilibrio. El tiempo necesario para alcanzar el equilibrio puede depender de varios factores, como los grados de lipofilidad, de unión con las proteínas plasmáticas y de hidrofiliidad de la droga. La vía de administración de la sustancia también puede afectar las proporciones de concentración entre vítreo y sangre. Por ejemplo, la lidocaína se administra frecuentemente por inyección intravenosa o intracardiaca al momento de la reanimación, habiéndose encontrado variaciones muy grandes en las concentraciones de esta sustancia en vítreo, en casos en los que la concentración en sangre era la misma para todos. La concentración de fármacos en el vítreo representa la fracción libre, pues sólo las moléculas pequeñas son capaces de atravesar la barrera sangre/vítreo y, por lo tanto, se puede esperar una correlación entre el grado de unión del fármaco con las proteínas plasmáticas y su concentración en el vítreo, expresados en relación al porcentaje de concentración en la sangre (28).

El fenómeno de redistribución *postmortem* de drogas se ha descrito para un cierto número de ellas (cocaína, digoxina, etanol, etc.). La liberación *postmortem* del fármaco desde los tejidos con mayores concentraciones del mismo hacia los tejidos circundantes, puede resultar en alteraciones de la concentración medida, dependiendo del sitio y el momento del muestreo. Por ello, se recomienda que las muestras de sangre se obtengan de un lugar periférico aislado, tal como la vena femoral, tan pronto como sea posible después de la muerte para minimizar los efectos de la redistribución *postmortem*. Sin embargo, la gran mayoría de medicamentos todavía no se analizan de esta manera mediante métodos adecuadamente validados (29).

La posibilidad de que las muestras de humor vítreo puedan presentar anomalías intrínsecas relacionadas con enfermedades oftalmológicas no se considera en la extensa literatura donde se reportan alteraciones bioquímicas y toxicológicas en el humor vítreo. Se recomienda no muestrear humor vítreo para el análisis bioquímico cuando los ojos han sufrido desprendimiento de retina, manipulación quirúrgica o enfermedades que involucren la cámara posterior. Algunos ojos pueden estar tan calcificados u osificados, que resulta imposible obtener la muestra de vítreo. El muestreo de vítreo debe abortarse en caso de ojos pequeños, arrugados y rígidos, o cuando existe algún tipo de resistencia a la punción (30).

Una de las principales desventajas en el análisis del humor vítreo es que los métodos analíticos que se aplican en la actualidad sólo están calibrados y validados para análisis de plasma u orina. Además, hace décadas que se observaron variaciones en los valores bioquímicos debido a la instrumentación. Otro problema, debido a la alta viscosidad del humor vítreo, es la poca repetitividad en el análisis de un mismo electrolito, en la misma muestra y por el mismo analista. Por lo tanto, se ha intentado reducir dicha viscosidad por diferentes métodos de pre-tratamiento de la muestra. Para reducir la viscosidad del humor vítreo, se ha recomendado la utilización de hialuronidasa, calentamiento, licuefacción por ultrasonido y centrifugación, ya sea por separado o de manera combinada. El calor y el tratamiento con hialuronidasa generan valores ligeramente superiores e inferiores en la medición de electrolitos y de glucosa. Sin embargo, para la determinación de la concentración de calcio, los dos métodos (especialmente el del calor) se asocian con valores extremos bajos o altos. Las diferencias entre ultrasonido y centrifugación muestran variaciones relativamente pequeñas y están cerca del valor de la precisión del instrumento. Por lo tanto, se recomienda la centrifugación, combinada con agitación, como el mejor método y el más sencillo para preparar las muestras congeladas destinadas al análisis. Además, la medición de lactato demuestra que los métodos analíticos calibrados para suero y orina no pueden aplicarse directamente en humor vítreo (31).

Conclusiones

El humor, cuerpo, fluido vítreo o, simplemente, vítreo, ocupa casi 80% del globo ocular, constituyendo un gel que se sitúa en el espacio libre entre el cristalino y la retina. Contiene un pequeño número de células (hialocitos y fibroblastos) involucradas en la síntesis del colágeno, el cual define las propiedades viscoelásticas del vítreo. Su composición química incluye sodio, potasio, calcio, magnesio, cloro, lactato, glucosa, etc.

Se ha demostrado que el vítreo es particularmente útil en las autopsias, para el análisis *postmortem* de glu-

cosa, nitrógeno ureico, ácido úrico, creatinina, sodio y cloro. La determinación de estos analitos puede servir para documentar diabetes, nivel de hidratación, equilibrio electrolítico y estado de la función renal antes de la muerte.

El humor vítreo puede ser una muestra de colección y manipulación relativamente sencillas y, gracias a la localización aislada del ojo, sus condiciones físicas y químicas son altamente estables. Dicho aislamiento también es útil en la prevención de la contaminación o del acceso de microorganismos a esta matriz. Además, debido a que se encuentra en un compartimiento periférico, hay un retraso tanto en la captación de drogas y alcohol, como en el proceso de eliminación de los mismos.

Las drogas o medicamentos constituyen un tema de interés dentro de las investigaciones referentes al humor vítreo, lo cual está relacionado con la necesidad de analizar diferentes posibilidades para el monitoreo de drogas en casos de intoxicación y así, averiguar la manera (natural, accidental, homicidio, suicidio) y la causa (paro respiratorio, infarto de miocardio o síndrome serotoninérgico, etc.) de muerte. En la literatura se encuentran muy bien descritos los análisis de glucosa, electrolitos como el potasio o el sodio, y de determinadas drogas como la digoxina (un glucósido cardiotónico) en humor vítreo. Además de todo esto, es posible investigar drogas de abuso como la cocaína, heroína, marihuana, o bien, el abuso de medicamentos, como ser benzodiazepínicos, antidepresivos y antipsicóticos.

El análisis de alcohol en humor vítreo y su respectiva concentración en sangre es uno de los pasos importantes en la farmacología del humor vítreo, donde los metabolitos del etanol, como el etilglucuronido y el etilsulfato, son marcadores cruciales.

Una cuestión muy importante es el papel del vítreo en la estimación del intervalo *postmortem*. Su participación es significativa desde los años sesenta, cuando se comenzó a analizar potasio, calcio y magnesio vítreos, además de otros compuestos como la hipoxantina. La determinación de las concentraciones de potasio es de particular importancia, puesto que se presenta a este electrolito como la mejor opción dentro la bioquímica del humor vítreo para la estimación del IPM.

A pesar del uso y las investigaciones realizadas al respecto, aún se discute si el uso de niveles de potasio conserva la linealidad de manera suficiente como para poder correlacionarse adecuadamente con el tiempo de la muerte. Nuevas observaciones demostraron que hay constantes específicas de comportamiento no lineal del potasio. Sin embargo, la falta de linealidad no debe ser un factor limitante, sino una guía para mejorar la práctica clínica que trabaja de cerca con las evidencias de la investigación aplicada.

Este proceso llevó a la asociación de los biomarcadores mencionados con tipos de muerte muy específicas, como estrangulamiento o enfermedades cardíacas.

Para la determinación de *causa mortis*, el humor vítreo es ampliamente utilizado en la identificación de diabetes, deshidratación, desnutrición, insuficiencia renal, encefalopatías, etc., lo cual puede revelar datos interesantes dentro de la investigación de muertes súbitas, tanto en niños como en adultos.

La interpretación de los datos obtenidos a partir de la literatura y del análisis del humor vítreo puede ser muy problemática. La redistribución *postmortem* puede alterar factores como la dosis y las fases de distribución y eliminación, así como los hallazgos clínicos y el momento de la muerte.

En una reciente consulta al Instituto de Criminalística de la Policía Federal de Brasil, se constató que existen profesionales capacitados para el muestreo de vítreo pero que nunca lo han puesto en práctica, además de que los peritos del laboratorio nunca analizaron este tipo de matriz. Dicha negligencia puede ocasionar una pérdida de información crucial dentro de la toxicología forense. Además, esta falta de práctica debe eliminarse apropiadamente a medida que la carrera de perito forense se extiende y adapta a lo largo del territorio brasileiro.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Dra. Maria Paz Caballos y el Dr. Eloy Girela de la Universidad de Córdoba, y al Dr. Alexandre Quintas del Instituto Egas Moniz, por la supervisión, la colaboración en la revisión bibliográfica, las críticas y su gran ayuda en la estructuración de la idea del presente trabajo; a la M.Sc. Deisy Rocío Bocangel por la traducción; a la Comisión Europea de Educación y Cultura, por el apoyo financiero mediante la beca de estudios del Máster Erasmus Mundus en Ciencias Forenses; a toda la gente del curso de Especialización en Farmacología de la UFLA.

CORRESPONDENCIA

DRA. LUCIANA DE MATOS ALVES PINTO
Universidade Federal de Lavras
Departamento de Química
37200-000 - LAVRAS, MG - Brasil - Caixa Postal 3037
E-mail: luca@dqi.ufla.br

Referencias bibliográficas

1. Dimairo VJM. Gunshot Wounds: Practical Aspects of Firearms, Ballistics, and Forensic Techniques. 2nd. ed. Boca Raton (NY): CRC; 1999.
2. Society of Forensic Toxicologists. Forensic toxicology laboratory guidelines. Available from: URL: http://www.soft-tox.org/files/Guidelines_2006_Final.pdf. Fecha de acceso: 1 de marzo de 2013.
3. Seeley RR, Stephens TD, Tate P. Anatomy and Physiology. 7th. ed. New York: McGraw Hill; 2006.
4. Balazs EA. Functional anatomy of the vitreous. En: Duane TD, Jaeger EA, editors. Biomedical Foundations of Ophthalmology. Philadelphia: Harper and Row; 1984.

5. Ramalho A. Interface vítreo-retiniana. En: Dicionário de Oftalmologiar. 1st. ed. Lisboa: Lidel; 2013.
6. Saukko P, Knight B. Knight's Forensic Pathology. 3rd. ed. Londres: Hodder Arnold, 2004.
7. Heninger M. Postmortem vitreous beta-hydroxybutyrate: interpretation in a forensic setting. *J Forensic Sci* 2012 Sep; 57 (5): 1234-40.
8. Osuna E, García-Víllora A, Pérez-Cárceles M, Conejero J, María Abenza J, Martínez P, *et al*. Glucose and lactate in vitreous humor compared with the determination of fructosamine for the postmortem diagnosis of diabetes mellitus. *Am J Forensic Med Pathol* 2001; 22 (3): 244-9.
9. Oehmichen M, Auer RN, König HG. Forensic neuropathology and neurology. Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag; 2006.
10. Gregora Z, Kratochvíl J, Vavrova J, Oplistol L. Sodium and magnesium levels in the vitreous body. *Soudni Lekarstvi* 1979; 24: 51-4.
11. Devgun MS, Dunbar JA. Biochemical investigation of vitreous: applications in forensic medicine, especially in relation to alcohol. *Forensic Sci Int* 1986; 31 (1): 27-34.
12. Forman DT. Electrolytes of the vitreous humor as a measure of the postmortem interval. *Clin Chem* 1980; 26: 1042.
13. Choo-Kang E, McKoy C, Escoferry C. Vitreous humor analytes in assessing the postmortem interval and the antemortem clinical status. *West Ind M J* 1983; 32: 23-6.
14. McCoy MA, Bingham V, Hudson AJ, Cantley L, Hutchinson T, Davison G, Fitzpatrick DA, Kennedy DG. Postmortem biochemical markers of experimentally induced hypomagnesaemic tetany in sheep. *Vet Rec* 2001; 148: 233-7.
15. Mulla A. Role of vitreous humor biochemistry in forensic pathology [dissertation]. Saskatoon: University of Saskatchewan, Canada; 2005.
16. Jickells S, Negrusz A. Clarke's Analytical Forensic Toxicology. Londres: Pharmaceutical Press; 2008.
17. Thierauf A, Kempf J, Perdekamp MG, Auwarter V, Gnann H, Wohlfarth A, Weinmann W. Ethyl sulphate and ethyl glucuronide in vitreous humor as postmortem evidence. *Forensic Sci Int* 2011; 210: 63-8.
18. Jashnani KD, Kale SA, Rupani AB. Vitreous humor: biochemical constituents in estimation of postmortem interval. *J Forensic Sci* 2010; 55 (6): 1523-7.
19. Sturmer WQ, Gantner Ge Jr. The postmortem interval: A study of potassium in the vitreous humor. *Am J Clin Pathol* 1964; 42: 137-44.
20. Saugstad OD, Gluck L. Plasma hypoxanthine levels in newborn infants: a specific indicator of hypoxia. *J Neonatal Perinatal Med* 1982; 10: 266-72.
21. Madea B; Kaferstein H, Hermann N, Sticht G. Hypoxanthine in vitreous humor and cerebrospinal fluid--a marker of postmortem interval and prolonged (vital) hypoxia? Remarks also on hypoxanthine in SIDS. *Forensic Sci Int* 1994; 65: 19-31.
22. James RA, Hoadley PA, Sampson BG. Determination of postmortem interval by sampling vitreous humor. *Am J Forensic Med Pathol* 1997; 18 (2): 158-62.
23. Alves, SR. Toxicologia forense e saúde pública [dissertation]. Rio de Janeiro (RJ): Fundação Oswaldo Cruz; 2005.
24. McLaughlin P, Pounder D, Maskell P, Osselton D. Real-time near-body drug screening during autopsy I: use of the Radox biochip drugs of abuse DOA I and DOA II immunoassays. *Forensic Toxicol* 2013; 31: 113-8.
25. Karch SB. Drug Abuse Handbook. 2nd. ed. Boca Raton, Florida: CRC; 2007.
26. Pelander A, Ristimaa J, Ojanpera I. Vitreous humor as an alternative matrix for comprehensive drug screening in postmortem toxicology by liquid chromatography-time-of-flight mass spectrometry. *J Anal Toxicol* 2010; 34 (6): 312-8.
27. Zilg B, Bernard S, Alkass K, Berg S, Druid H. A new model for the estimation of time of death from vitreous potassium levels corrected for age and temperature. *Forensic Sci Int* 2015; 254: 158-66.
28. Holmgren P, Druid H, Holmgren A, Ahlner J. Stability of Drugs in Stored Postmortem Femoral Blood and Vitreous Humor. *J Forensic Sci* 2004; 49 (4): 820-5.
29. McKinney PE, Phillips S, Gomez HF, Brent J, MacIntyre M, Watson WA. Vitreous humor cocaine and metabolite concentrations: do postmortem specimens reflect blood levels at the time of death? *J Forensic Sci* 1995; 40 (1): 102-7.
30. Parsons MA, Start RD, Forrest ARW. Concurrent vitreous disease may produce abnormal vitreous humour biochemistry and toxicology. *J Clin Pathol* 2003; 56: 720 (Postscript correspondence).
31. Blana SA, Mushhof F, Hoeller T, Fimmers R, Madea B. Variations in vitreous humor chemical values as a result of pre-analytical treatment. *Forensic Sci Int* 2011; 210 (1-3): 263-70.
32. Passos EC, Andrade-Neto AV, Lemaire T. Comportamento ótico do olho humano e suas ametropias. *Caderno de Física da UEFS* 2008; 06 (1-2): 7-18.

Recibido: 17 de abril de 2015.

Aceptado: 17 de noviembre de 2015.