

## Determinación toxicológica de cocaína en humor vítreo

### Artículo de Revisión

Toxicological determination of cocaine in vitreous humor

Héctor García<sup>1</sup>; Guadalupe Melo-Santiesteban<sup>2</sup>; Andrés Hermida-Moreno<sup>3</sup>

#### RESUMEN

*La determinación toxicológica postmortem de cocaína y sus derivados tradicionalmente ha sido realizada en muestras de sangre y orina; sin embargo, en algunos casos no se cuenta con este tipo de sustratos, lo cual obliga al uso de sustratos alternativos; de ellos, en años recientes ha surgido interés en el uso del humor vítreo para determinación de cocaína y benzoilecgonina como su principal metabolito. En la presente revisión analizamos las características que hacen al humor vítreo un sustrato útil para el análisis toxicológico de cocaína y derivados, la metodología usada en la actualidad así como los resultados obtenidos en estudios recientes acerca de la sensibilidad y especificidad de su determinación.*

*Palabras clave: Cocaína, Benzoilecgonina, Humor vítreo, Cromatografía líquida.*

#### SUMMARY

*Postmortem toxicological analysis of cocaine and derivatives has usually been done in urine and blood samples. However, in some cases we do not have such samples, so it is imperative to use another kind of substrates. In recent years there has been an increasing interest in the utilization of, the methodology used at present as well as the results of recent studies on the sensitivity vitreous humor as a cocaine and benzoilecgonine analysis substrate. In this review we analyze the characteristics that make vitreous humor a useful substrate for toxicological analysis of cocaine and derivatives and specificity of this determination.*

*Keywords: Cocaine, benzoilecgonine, vitreous humor, liquid chromatography.*

---

Recibido: 13 Abril 2016; aceptado: 27 Abril 2016; Publicado: 15 Agosto 2016

<sup>1</sup> Médico Forense, Práctica Privada

<sup>2</sup> Patóloga Forense, Instituto de Medicina Forense, Universidad Veracruzana

<sup>3</sup> Pediatra, Servicio de Neonatología, IMSS

Corresponding author: Héctor García, revmforense@uv.mx

## INTRODUCCIÓN

La cocaína es un estimulante extremadamente adictivo que afecta directamente al cerebro. Es una de las drogas más antiguas; las hojas de coca, de donde se obtiene la cocaína, se han ingerido por miles de años, mientras que la sustancia pura, el clorhidrato de cocaína, se ha consumido por más de 100 años<sup>29</sup>.

Las principales vías de administración de la cocaína son la oral, nasal e intravenosa. Esta droga se asocia a una fuerte sensación de euforia, provocada por el incremento excesivo de la dopamina en las sinapsis cerebrales, ocasionada por la inhibición de la recaptura de dicho neurotransmisor.

La cocaína ha sido detectada tradicionalmente en muestras de sangre, orina y pelo. Sin embargo, tomando en cuenta que la cocaína tiene una semivida en sangre de entre 40 y 90 minutos, es necesario contar con tejidos o sustancias corporales que permitan un margen de detección más amplio<sup>25</sup>.

El humor vítreo es un gel acuoso situado en la cavidad posterior del ojo, entre el cristalino y la retina; se trata de un fluido limpio que contiene menor proteínas que la orina y que se puede recoger fácilmente por aspiración directa durante la autopsia. Dadas sus características, el humor vítreo es una matriz postmortem alternativa que puede utilizarse para la detección de diversas drogas de abuso, entre ellas la cocaína<sup>29</sup>.

A continuación haremos una revisión de las características propias del humor vítreo para su utilización

como matriz de estudio toxicológico y las evidencias actuales sobre la utilidad del humor vítreo para detectar cocaína.

## CARACTERÍSTICAS FORENSES DEL HUMOR VÍTREO

El humor vítreo consiste en una solución salina estéril con baja concentración de proteínas; por lo tanto, es un ambiente relativamente estable para las drogas y sus metabolitos durante el intervalo postmortem. Dadas sus características, el humor vítreo es una matriz postmortem alternativa útil que se puede utilizar para detectar drogas de abuso, en particular durante las investigaciones de la muerte, donde la sangre post mortem no está disponible o está limitada en términos de calidad o cantidad (por ejemplo, después del choque hemorrágico, quemaduras, embalsamamiento o procesos de descomposición)<sup>23</sup>.

El humor vítreo está compuesto en su mayor parte por agua, y por otros elementos como son el potasio, cloro, sodio, glucosa, proteínas, colágeno, y el ácido hialurónico. Carece de vascularización. No se renueva desde su formación durante la etapa embrionaria.

Recientemente, se ha propuesto como una matriz para detectar drogas de abuso. Una amplia variedad de sustancias, incluidos los opiáceos, se pueden determinar en este fluido biológico. De hecho, el humor vítreo puede ser una muestra útil, y en algunos casos, es la mejor o la única muestra disponible para el análisis toxicológico forense<sup>3</sup>.

El humor vítreo constituye una matriz relativamente simple en términos analíticos en comparación con la orina,

sangre o sus derivados (suero y plasma), y su uso ha sido recomendado para el análisis de varios xenobióticos de interés forense, principalmente en casos de análisis de cuerpos politraumatizados o cuerpos en avanzado estado de descomposición. El fluido permanece aislado en un compartimiento relativamente protegido de la contaminación externa y la invasión de microorganismos, constituyendo una muestra privilegiada cuando se encuentra en una etapa de putrefacción.

Sin embargo, la desventaja del humor vítreo se relaciona con su pequeño volumen: puede obtenerse un aproximado de 2 ml de humor vítreo en cada globo ocular, lo que puede limitar el número de estudios analíticos realizables<sup>28</sup>.

xenobióticos, incluyendo las drogas de abuso, llegan al humor vítreo por difusión simple a través de la barrera lipídica entre el compartimiento del humor vítreo y la sangre. Los fármacos con baja unión a proteínas plasmáticas y con liposolubilidad adecuada pueden cruzar las barreras biológicas, pero aún sustancias hidrosolubles, se pueden difundir directamente desde el torrente sanguíneo al humor vítreo. El humor vítreo contiene un alto porcentaje de agua (90-98%), que permite el intercambio de sustancias con la sangre; ello permite que exista una buena correlación entre los niveles de ciertos xenobióticos en ambos fluidos corporales<sup>3</sup>.

El humor vítreo resulta ideal para el análisis químico postmortem dado que además de su aislamiento del resto del cuerpo, no se ve afectado por algunos cambios postmortem, como la redistribución y la hemoconcentración. Además, resiste mejor el fenómeno de

la putrefacción en comparación a otros líquidos corporales, aunque no es enteramente inmune a ella. De hecho, el humor vítreo puede usarse para análisis toxicológicos en cuerpos previamente embalsamados. Un factor limitante, aunque raro, es la existencia de anomalías intrínsecas del globo ocular, que pueden afectar la utilidad toxicológica del humor vítreo<sup>9</sup>.

El humor vítreo se obtiene por medio de una aguja delgada con el bisel hacia arriba, introduciéndola en el ángulo externo del ojo, ya sea el derecho o el izquierdo. Se podrán extraer alrededor de 2 a 5 ml como máximo, aunque en un recién nacido la muestra rara vez supera 1 ml; debe realizarse la extracción lentamente y no utilizar tubos al vacío para no dañar la retina y alterar la muestra<sup>25</sup>; una vez obtenida se coloca en tubos de vidrio; si se desea hacer análisis toxicológicos es ideal que el tubo contenga fluoruro de sodio como conservador, idealmente almacenándolos a -20°C para su posterior análisis<sup>28</sup>.

La muestra obtenida debe ser clara y transparente, con composición viscosa, debido principalmente al contenido en ácido hialurónico; ese es el motivo por el que en ocasiones las muestras son pre tratadas con hialuronidasa para disminuir la viscosidad GARG. En caso de cuerpos embalsamados, la muestra puede ser de color rosado, lo cual significaría que el humor vítreo ya fue contaminado con el líquido de embalsamamiento, que puede contener formaldehído, glutaraldehído, EDTA, metanol y fenol<sup>19</sup>.

En el humor vítreo puede determinarse una gran cantidad de sustancias, en muestras tomadas incluso 4 días después de haber fallecido el

individuo; entre las sustancias analizadas en humor vítreo se encuentran: sodio<sup>18</sup>, potasio, cloro, glucosa, urea, creatinina, cetonas, insulina, péptido C, hierro, alcohol<sup>10</sup>, drogas, anticuerpos, DNA y ácido fórmico<sup>30</sup>. Por tal motivo, puede usarse en análisis toxicológico, detección de infecciones virales, estudio de metabolitos<sup>21</sup> y proteínas<sup>20</sup> así como detección de algunos metales pesados. Incluso, en algunas enfermedades (deshidratación, insuficiencia renal, vómito, diabetes mellitus, etc), pueden encontrarse ciertas características específicas en el humor vítreo, que permiten conocer si un individuo las padeció premortem<sup>26</sup>.

## ANÁLISIS TOXICOLÓGICO DEL HUMOR VÍTREO

Es posible que cualquier fármaco o droga de abuso que pueda ser detectada en sangre, también pueda serlo en el humor vítreo<sup>22</sup>.

Se han estudiado los niveles de diversas drogas en el humor vítreo, siendo importantes para su identificación y su correlación con las cifras premortem<sup>11</sup>. Sin embargo, la importancia del humor vítreo como matriz es algo cuestionable, dado que puede presentarse difusión postmortem de ciertas drogas desde el cerebro hacia el humor vítreo<sup>5</sup>; además, las sustancias hidrofílicas es más probable que tengan concentración vítreas más semejantes a las sanguíneas, en tanto que las sustancias lipofílicas (como las benzodiazepinas) o con mucha afinidad proteica (como los antidepresivos tricíclicos) pudieran tener concentraciones sanguíneas muy distintas a las encontradas en el humor vítreo<sup>16</sup>.

## MÉTODOS DE DETECCIÓN DE COCAÍNA EN HUMOR VÍTREO

En la investigación forense las técnicas más utilizadas para la búsqueda de drogas en humor vítreo son las siguientes: la cromatografía de gases, cromatografía líquida de alta resolución, la espectrometría de masas, la electroforesis capilar y el análisis inmunoenzimático<sup>7</sup>.

La cromatografía es un método físico de separación en el cual los componentes a separar se distribuyen entre dos fases<sup>14</sup>, una de las cuales constituye la fase estacionaria (puede ser un sólido o un líquido dispuesto sobre un sólido que actúa como soporte, de gran área superficial) y la fase móvil, puede ser gas o líquido que se usa como portador de la mezcla)<sup>13</sup>. Hay varios tipos de cromatografía; en el análisis toxicológico del humor vítreo se utilizan con mayor frecuencia las siguientes:

- a) La cromatografía de gases (GC) lleva a cabo la separación por medio del reparto de los componentes de una mezcla química, entre una fase gaseosa que fluye (móvil) y una fase líquida estacionaria sujeta a un soporte sólido.
- b) La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), que consiste en un proceso de separación en el que una muestra líquida se hace pasar a través de una fase estacionaria a alta presión<sup>15</sup>.

La espectrometría de masas se basa en la obtención de iones de masas orgánicas en fase gaseosa; una vez obtenido estos iones se separan de acuerdo a su masa y carga y finalmente se detectan por un dispositivo adecuado. Un espectro de masa, será entonces una información bidimensional, que representa un parámetro relacionado

con la abundancia de los diferentes tipos de iones en función de la relación masa/carga de cada uno de ellos. Se utiliza para el análisis simultáneo de diferentes drogas como cocaína (COC), anfetaminas (AMP), opiáceos, cannabinoides y sus metabolitos en el humor vítreo. Habitualmente se utiliza acoplada a la cromatografía de gases o líquida<sup>4</sup>.

La Electroforesis Capilar constituye una técnica de separación basada en la migración diferencial de moléculas (ADN, proteínas, iones inorgánicos, carbohidratos, esteroides, fármacos, etc.) sujetas a un campo eléctrico (de 100 a 500 V/cm) a través de un capilar de menos de 50 µm de diámetro. Los cationes fluyen hacia la terminal negativa, mientras que los aniones fluyen hacia la positiva. El tiempo de análisis es más corto y la resolución (sensibilidad de separación) es mayor<sup>8</sup>.

## COCAÍNA EN HUMOR VÍTREO

En el campo de la Toxicología Forense, las muestras sanguíneas (especialmente de la vena femoral) son las más útiles para la detección de diversas drogas de abuso, entre ellas cocaína. Sin embargo, en aquellos casos en los que no se tiene muestra de sangre, es necesario contar con tejidos o líquidos alternativos<sup>1, 24</sup>.

La primera interrogante que surge es determinar si las concentraciones de cocaína y sus derivados son similares o equivalentes en sangre y humor vítreo; en un estudio realizado al respecto, por medio de cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas, se encontró

una correlación del 100% entre muestras de sangre y humor vítreo, con cifras que oscilaban entre 30.81 ng/ml y 283.97 ng/ml (promedio 186.98 ng/ml). Una situación similar ocurrió con la benzoilecgonina y el cocaetileno<sup>27</sup>.

La segunda interrogante es determinar si la presencia de cocaína o sus derivados en humor vítreo o en otras muestras corporales es indicativo de que la muerte del individuo fue provocada por una sobredosis de cocaína. En relación con ello existe mucha controversia. En un estudio realizado por Duer et al<sup>12</sup>, se encontró una correlación del 88 al 94% entre las concentraciones de cocaína y sus derivados en sangre y humor vítreo, incluso en casos de intoxicación aguda. En los casos en los que se trata de un consumo moderado, las concentraciones de cocaína y benzoilecgonina son similares tanto en sangre como en cerebro y humor vítreo; sin embargo, en un estudio realizado por Carvalho et al<sup>6</sup> se observó que en los casos de sobredosis solo pueden apreciarse en muestras sanguíneas y de tejido cerebral (corteza prefrontal, ganglios basales y cerebelo) más no así en humor vítreo.

Fernandez et al<sup>13</sup> analizaron 15 muestras de humor vítreo provenientes de pacientes fallecidos por sobredosis de cocaína, detectando niveles elevados de cocaína en 14 de ellos, con concentraciones promedio de 81 ng/ml para cocaína y 126 ng/ml para benzoilecgonina. Antonides et al<sup>2</sup> encontraron que en casos de sobredosis de cocaína, las concentraciones en sangre eran más elevadas que en humor vítreo en el 72% de las muestras analizadas, con lo que se concluye que una concentración elevada de cocaína en humor vítreo no puede determinar con precisión si es un consumo elevado

crónico o se trata de una sobredosis reciente.

## CONCLUSIONES

Los análisis toxicológicos son esenciales en la medicina forense: aclaran las causas de muerte y ayudan a establecer si están relacionados con sobredosis, adicciones, accidentes o lesiones.

La cocaína es una droga de abuso frecuentemente analizada en el escenario forense. Las muestras de sangre y orina siguen siendo las más utilizadas en la práctica diaria; sin embargo, son frecuentes los casos en los que no se cuenta con muestras de este tipo.

Esto nos obliga a buscar fuentes alternativas para el análisis toxicológico. De ellas, el humor vítreo ha sido utilizado desde hace más de 20 años para determinación de diversas sustancias para fines toxicológicos y recientemente para la determinación del intervalo postmortem.

En la presente revisión analizamos las ventajas que representa el humor vítreo como fuente de análisis toxicológico: ambiente cerrado, facilidad de obtención, resistencia relativa a la distribución de fluidos postmortem y relativa resistente a la putrefacción.

Es evidente que el uso de la cromatografía líquida o de gases, acoplada a la espectrometría de masas, ha permitido la determinación específica de varias drogas de abuso, entre ellas la cocaína, con límites de precisión y sensibilidad superiores a técnicas previamente utilizadas, como la

electroforesis capilar o el inmunoensayo.

Aunque existe cierta discrepancia en los resultados obtenidos, los niveles de cocaína y benzoilecgonina son similares en humor vítreo y en sangre, más no así en orina. En casos de consumo crónico de cocaína pueden detectarse niveles de cocaína y benzoilecgonina hasta de 30 ng/ml; sin embargo, en casos de intoxicación aguda, el paso de la cocaína al humor vítreo parece ser algo más retardado, por lo que los niveles detectados en muestras sanguíneas suelen ser superiores en las primeras horas a los detectados en humor vítreo.

La determinación de cocaína en humor vítreo no parece ser un medio confiable para determinación de intoxicación por cocaína como causa de muerte; al parecer, la muestra de sangre o de ciertos tejidos, como el cerebral, son más confiables en ese sentido. Sin embargo, el humor vítreo ha demostrado ser una fuente confiable para detección de consumo crónico con capacidad de detección de niveles que pudieran ser indetectables en pruebas de inmunoensayo.

En la presente revisión evidenciamos uno más de los usos postmortem del humor vítreo en el área de toxicología forense. Se requieren estudios con un número mayor de muestras para estandarizar en forma apropiada y completa las concentraciones que permitan determinar consumo crónico y el tiempo necesario para que el consumo agudo se refleje en este tipo de sustrato biológico.



## REFERENCIAS

1. Alvear E, von Baer D, Mardones C (2014). Determination of cocaine and its major metabolite benzoylecgonine in several matrices obtained from deceased individuals with presumed drug consumption prior to death. *J Forensic Leg Med*, 23: 37-43.
2. Antonides HM, Kiely ER, Marinetti LJ. (2007). Vitreous fluid quantification of opiates, cocaine, and benzoylecgonine: comparison of calibration curves in both blood and vitreous matrices with corresponding concentrations in blood. *J Anal Toxicol*. 31(8):469-76.
3. Arora B, Velpandian T, Saxena R (2015). Development and validation of an ESI-LC-MS/MS method for simultaneous identification and quantification of 24 analytes of forensic relevance in vitreous humour, whole blood and plasma. *Drug Test Anal*. Epub ahead of print.
4. Baker JE, Jenkins AJ (2008). Screening for cocaine metabolite fails to detect an intoxication. *Am J Forensic Med Pathol*, 29(2): 141-4.
5. Cabarcos P, Taberero MJ, Álvarez I (2010). Analysis of Six Benzodiazepines in Vitreous Humor by High-Performance Liquid Chromatography-Photodiode-Array Detection. *J Anal Toxicol*, 34 (9): 539-542.
6. Carvalho VM, Fukushima AR, Fontes LR (2013). Cocaine postmortem distribution in three brain structures: a comparison with whole blood and vitreous humour. *J Forensic Leg Med*. 20(3): 143-5.
7. Chris W. Chronister E, Ansley L (2008). Rapid Detection of Opioids in Vitreous Humor by Enzyme Immunoassay. *J Anal Toxicol*, 32 (8): 601-604
8. Costa JL, Morrone AR, Resende RR (2014). Development of a method for the analysis of drugs of abuse in vitreous humor by capillary electrophoresis with diode array detection (CE-DAD). *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 15; 945-946:84-91.
9. Dadalto M, Souza F, Caleffi B (2013). Simultaneous Quantification of Cocaine, Amphetamines, Opiates and Cannabinoids in Vitreous Humor. *J Anal Toxicol* (epub ahead of print).
10. De Martinis BS, de Paula CM, Braga A (2006). Alcohol distribution in different postmortem body fluids. *Hum Exp Toxicol*. 25(2): 93-7.
11. Drummer OH (2007). Requirements for bioanalytical procedures in postmortem toxicology. *Anal Bioanal Chem*. 388(7): 1495-503.
12. Duer WC, Spitz DJ, McFarland S (2006). Relationships between concentrations of cocaine and its hydrolysates in peripheral blood, heart blood, vitreous humor and urine. *J Forensic Sci*. 51(2): 421-5.
13. Fernández P, Seoane S, Vázquez C (2013). Chromatographic determination of drugs of abuse in vitreous humor using solid-phase extraction. *J Appl Toxicol*. 33(8): 740-5.
14. Fernández P, Seoane S, Vázquez C (2011). A rapid analytical method based on microwave-assisted extraction for the determination of drugs of abuse in vitreous humor. *Anal Bioanal Chem*. 401(7): 2177-86.
15. Fernández P, Aldonza M, Bouzas A (2006). GC-FID determination of cocaine and its metabolites in human bile and vitreous humor. *J Appl Toxicol*. 26(3):253-7.
16. Fucci N, De Giovanni N, De Giorgio F (2006). An evaluation of the Cozart RapiScan system as an on-site screening tool for drugs of abuse in a non-conventional biological matrix: vitreous humor *Forensic Sci Int*. 27; 156(2-3):102-5.
17. Garg U, Althahabi R, Amirahmadi V (2004). Hyaluronidase as a liquefying agent

for chemical analysis of vitreous fluid. *J Forensic Sci.* 49(2): 388-91.

18. Ingham AI, Byard RW (2009). The potential significance of elevated vitreous sodium levels at autopsy. *J Forensic Leg Med.* 16(8): 437-40.

19. Kelly A, Rees P, Derrick J (2013). Distribution of opiates in femoral blood and vitreous humour in heroin/morphine-related deaths. 226 (1-3): 152–159.

20. Kumagai A, Nakayashiki N, Aoki Y (2007). Analysis of age-related carbonylation of human vitreous humor proteins as a tool for forensic diagnosis. *Leg Med (Tokyo).* 9(4): 175-80.

21. Jashnani KD, Kale SA, Rupani AB (2010). Vitreous humor: biochemical constituents in estimation of postmortem interval. *J Forensic Sci.* 55(6): 1523-7.

22. Madea B, Musshoff F. Postmortem biochemistry. *Forensic Sci Int.* Jan 17 2007; 165(2-3):165-71.

23. Margalho C, Franco C, Corte-Real F (2011). Illicit drugs in alternative biological specimens: a case report. *J Forensic Leg Med,* 18(3): 132-5.

24. McKinney PE, Phillips S, Gomez HF (1995). Vitreous humor cocaine and metabolite concentrations: do postmortem specimens reflect blood levels at the time of death? *J Forensic Sci.* 40(1): 102-7.

25. Ortega A (2003). Was this individual poisoned by cocaine? Estimations based on the pharmacokinetic of the drug. *Cuad Med Forense,* 33.

26. Parsons MA, Start RD, Forrest AR (2003). Concurrent vitreous disease may produce abnormal vitreous humour biochemistry and toxicology. *J Clin Pathol.* 56(9):720.

27. Peres MD, Pelicão FS, Caleffi B (2014). Simultaneous quantification of cocaine, amphetamines, opiates and cannabinoids in vitreous humor. *J Anal Toxicol.* 38(1): 39-45.

28. Rees KA, Jones NS, McLaughlin PA (2012). The effect of sodium fluoride preservative and storage temperature on the stability of cocaine in horse blood, sheep vitreous and deer muscle. *Forensic Sci Int.* 10; 217(1-3):182-8.

29. Stephens BG, Jentzen JM, Karch S (2004). Criteria for the interpretation of cocaine levels in human biological samples and their relation to the cause of death. *Am J Forensic Med Pathol,* 25(1):1-10.

30. Stolzyszewski I, Niemcunowicz-Janica A, Pepinski W (2007). Vitreous humour as a potential DNA source for postmortem human identification. *Folia Histochem Cytobiol.* 2007; 45(2):135-6.

