Bioquímica postmortem: comparación de tres métodos de análisis.

Post-mortem biochemistry: a comparison of three analytical methods.

A. Arroyo¹, MT. Carbone² y J. Ordóñez³

RESUMEN

La tanatoquímica es una rama auxiliar importante en medicina forense aunque tiene sus limitaciones. Se ha enfatizado el examen de fluidos que no se alteran con tanta rapidez como la sangre después de la muerte. El humor vítreo, líquido pericárdico, líquido cefalorraquídeo o líquido sinovial se han utilizado con estos fines.

Objetivos: comparar los valores de colesterol en sangre, glucosa y potasio en humor vítreo y creatinina en líquido pericárdico en tres analizadores y métodos diferentes a fin de validar dos de ellos para análisis postmortem. El tercero se tomó como método de referencia.

Material y Métodos: estudio observacional analítico de muestras procedentes de 55 cadáveres que ingresaron para autopsia judicial en el Instituto Anatómico Forense de Barcelona. Los análisis se realizaron en los analizadores Spotchem EZ (química seca) y Spotchem EL (potenciometría de electrodo ión selectivo, Menarini Diagnostics) y Reflotron (química seca, Roche Diagnostics). Como método de referencia se analizaron las muestras en varios multianalizadores: Hitachi 911, Cobas Integra 800 (ambos de Roche Diagnostic y Vitros 250 Johnson-Johnson).

Resultados: se hallaron diferencias significativas entre los valores de colesterol del método de referencia y los dos ensayados. Los valores de potasio presentaron diferencias significativas entre el método de referencia y el de Reflotron pero no entre el valor de referencia y el de Spotchem EZ con $r = 0,852$. No pudieron evaluarse los valores de glucosa ni de CK por dispersión de valores y dificultad de medición en los dos analizadores ensayados.

Conclusiones: los resultados obtenidos con estos dos métodos de química seca, no validados por el fabricante para ensayos postmortem, no permiten considerar su utilidad en el medio forense aunque su utilidad en la práctica clínica está ampliamente documentada.
Palabras clave: bioquímica postmortem; análisis postmortem; medicina forense.

ABSTRACT

Thanatochemistry is an important procedure in forensic medicine. Emphasis has been upon fluids that do not alter as quickly as blood, after death. Vitreous humor, spinal fluid, pericardic fluid and sinovial fluid have been used.

Aims: to compare values of cholesterol in blood, glucose and potassium in vitreous humor and creatinase in pericardial fluid. The data were obtained from three different methods and analyzers, the third of which was considered as the reference method.

Materials and methods: samples were obtained from 55 corpses in the Pathology department of the Legal Medicine Institute in Barcelona. Analyzers were: Spotchem EZ (Lab. Menarini) dry-chemistry method, Spotchem EL (Lab. Menarini) ion selective potentiometry for potassium and Reflotron (Lab. Roche) dry-chemistry method. The reference method analyzers were Hitachi 911, Cobas Integra 800 and Vitros 259.

Results: significative differences were found in cholesterol values between the dry chemistry methods and the reference method as well as potassium values between the dry chemistry method and the reference method. No differences were found between the potassium ion selective potentiometry method and the reference method. Glucose and creatinase results were not considered because of great dispersion values.

Conclusions: results obtained with the dry-chemistry methods do not allow consideration of its usefulness in forensic practice.

Key words: postmortem biochemistry, postmortem analysis, forensic sciences.

Fecha de recepción: 04.JUN.04

Fecha de aceptación: 15.DIC.04

Correspondencia: Dra. Amparo Arroyo Fernández. Telf. 93 453 26 99 e-mail : 8034aaf@comb.es

¹ Médico Forense. Instituto de Medicina Legal de Cataluña. Laboratorio de Barcelona.

² Bióloga. Instituto de Medicina Legal de Cataluña. Laboratorio de Barcelona.

³ Doctor en Medicina. Servicio de Bioquímica. Hospital de San Pablo de Barcelona.

INTRODUCCIÓN:

En medicina forense la determinación de la causa de la muerte requiere el conocimiento de distintas circunstancias y datos en el contexto de una determinada situación. La tanatoquímica es una ayuda importante aunque tiene sus limitaciones. Se conocen las alteraciones de los constituyentes bioquímicos en el periodo postmortem, especialmente en la sangre y los resultados de las investigaciones publicadas, en ocasiones están sujetos a controversia. Por esta razón se ha enfatizado el examen de fluidos que no se alteran o contaminan con tanta rapidez como la sangre después de la muerte. El humor vítreo (HV), el líquido cefalorraquídeo (LCR), el líquido pericárdico (LP) o el líquido sinovial (LS) se han utilizado con estos fines [1,2,3]. La revisión de Coe destaca estos aspectos y otros de la bioquímica postmortem [4].

El objetivo principal de este estudio fue comparar los resultados de colesterol, glucosa, potasio y creatinina en tres diferentes métodos y analizadores. Uno de estos métodos se tomó como método de referencia frente a los otros dos que se trataban de validar para muestras postmortem.

Los fluidos utilizados fueron: plasma para la determinación de colesterol, humor vítreo para glucosa y potasio y líquido pericárdico para las CK.

Objetivos secundarios fueron obtener cuanta información se derivara de los datos analizados y su aplicabilidad en medicina forense.

MATERIAL Y MÉTODOS:

El estudio se llevó a cabo en el Instituto Anatómico de Barcelona. Estudio observacional analítico de muestras procedentes de 55 cadáveres consecutivos que ingresan para la práctica de la autopsia judicial. Los criterios de exclusión fueron cadáveres en putrefacción o de más de 48 horas de la muerte.

Las muestras se obtuvieron simultáneamente de los fluidos sangre, HV y LP. La sangre para determinación de colesterol se recogió del sistema venoso o cavidad cardíaca. El HV se extrajo del ojo izquierdo mediante aspiración con aguja fina desde el epicanto externo. El LP se obtuvo por incisión del saco pericárdico, sin contaminación sanguínea y aspiración. Se deshechó el líquido que presentaba aspecto hemático.

Las muestras de sangre y LP se centrifugaron y se procedió al análisis. El HV se congeló previamente y se realizó el análisis acto seguido a la descongelación.

Los análisis se realizaron en los siguientes aparatos y metodologías:

- 1) Analizador Spotchem EZ (Menarini Diagnostics) que utiliza un sistema de química seca mediante tiras reactivas. En este analizador se determinó el colesterol en sangre, la glucosa en humor vítreo y las CK en líquido pericárdico. Analizador Spotchem EI que utiliza la potenciometría de ión selectivo para la determinación de potasio que se realizó en HV.
- 2) Analizador Reflotron (Roche Diagnostics), que también utiliza un sistema de química seca mediante tiras reactivas. En este analizador se determinó colesterol en sangre, glucosa y potasio en HV y CK en LP.
- 3) Métodos del laboratorio de referencia: se utilizaron métodos estandarizados adaptados a los analizadores Hitachi 911 (colesterol en sangre, método enzimático) Cobas Integra 800, Roche Diagnostics, para la medida de glucosa en humor vítreo (hexoquinasa) y potasio en humor vítreo (potenciometría con electrodo ion selectivo). Las CK en LP se midieron con un método de química seca en el Vitros 250 (Johnson-Johnson Company).

Los análisis con la metodología descrita en los apartados 1º y 2º se realizaron en el Instituto Anatómico Forense de Barcelona. Los análisis con las metodologías descritas en el apartado 3º se realizaron en el Servicio de Bioquímica del Hospital de San Pablo de Barcelona.

Estos últimos métodos se tomaron como referencia y comparación con los dos primeros métodos y analizadores Spotchem y Reflotron .

Las muestras se analizaron en el mismo día con los tres métodos a fin de no introducir sesgos o errores añadidos.

Los datos se procesaron en el paquete estadístico SPSS para Windows versión 11.5 . Se estableció la normalidad de los datos y la homogeneidad de las varianzas. Se compararon los valores medios mediante la prueba t de Student para datos apareados y se halló la correlación entre valores para establecer las diferencias existentes entre los resultados. Se aceptó un grado de significación estadística del 95%.

RESULTADOS:

Los resultados de colesterol y potasio se exponen en las tablas I-IV, así como los boxplots de distribución de los valores. Los valores medios de potasio fueron 9,539 mmol/L, 9,768 mmol/L y 7,883 mmol/L con el método de referencia, Spotchem EL y Reflotron respectivamente. Los valores medios de colesterol fueron 184 mg/dL, 142,1 mg/dL y 145,2 mg/dL con el método de referencia, Spotchem EZ y Reflotron respectivamente. Los valores de glucosa en los dos primeros métodos no pudieron compararse ya que el punto de corte inferior detectado para este constituyente en los analizadores Spotchem EZ (Menarini) y Reflotron (Roche) está en 20 mg/dL y 10 mg/dL respectivamente. Muchas de las muestras analizadas no alcanzaron estos valores.

Los resultados de las CK totales presentaron gran variabilidad y altos valores que sobrepasaron el límite superior detectado por los dos primeros analizadores. En varios casos se procedió a la dilución de la muestra. En el tercer método de referencia los resultados de las CK asimismo presentaron gran dispersión y requirieron sucesivas diluciones de la muestra. No se procedió a la comparación estadística por no considerarla fiable.

TABLA I: Valores medios de **potasio** en los tres métodos analizados

	X	SD
Método Referencia	9,539 mmol/L	1,85
Spotchem EL	9,768 mmol/L	1,76
Reflotron	7,883 mmol/L	1,49

X = media

SD = desviación estándar

TABLA II: Diferencias de valores medios de **potasio** entre métodos.

	X	SD	IC 95%	R	P
Método Referencia-Spotchem EL	-0,228	0,985	-0,528-0,070	0,852	0,131
Método Referencia-Reflotron	1,656	1,126	1,313-1,998	0,794	0,000
Método Spotchem EL Reflotron	1,885	0,895	1,612-2,157	0,861	0,000

X = media, SD = desviación estándar, IC = intervalo confianza, P = significación estadística, R = coeficiente de correlación

TABLA III: Valores medios de **colesterol** en los tres métodos.

	X	SD
Método Referencia	184,2 mg/dL	80,7
Spotchem EZ	142,1mg/dL	57,5
Reflotron	145,2 mgd/L	43,01

X = media

SD = desviación estándar

TABLA IV: Diferencias de valores medios de **colesterol** entre métodos.

	X	SD	IC	R	P
Método Referencia-Spotchem EZ	42,16 mg/dL	52,28	24,98-59,35	0,744	0,000
Método Referencia-Reflotron	39,06 mg/dL	58,01	19,99-58,13	0,674	0,000
Método Spotchem EZ Reflotron	3,11 mg/dL	33,36	-7,86-14,07	0,788	0,570

X = media, SD = desviación estándar, IC = intervalo confianza, P = significación estadística, R = coeficiente de correlación

DISCUSIÓN:

Los componentes bioquímicos analizados se eligieron por su interés y aplicabilidad en medicina forense. Dentro de nuestros objetivos primarios de obtener unos resultados y de los objetivos secundarios de evaluarlos u obtener información, en nuestro estudio se halló que los valores de glucosa en humor vítreo fueron muy bajos. El descenso rápido de la glucosa postmortem en sangre y HV es conocido de antiguo y solo cifras superiores a 200 mg/dl en el HV pueden indicar un estado anterior hiperglucémico [4]. En las muestras tratadas en ningún caso se obtuvieron cifras superiores a 100mg/dl. Más reciente es el estudio postmortem de la elevación de las CK en líquido pericárdico que puede relacionarse con muertes de origen cardíaco [5,6,7]. En nuestro estudio no se comparó el resultado con la causa de la muerte u otras variables que pudieran suponer un ascenso de las CK, al no ser el principal objetivo del estudio. No obstante la elevación sistemática en todas las muestras hace difícil esta interpretación, ya que no en todos los casos se correspondían con muertes cardíacas.

Otro constituyente de utilidad en bioquímica postmortem es el colesterol. Se considera estable postmortem en las primeras horas [8,9,10] y su valor puede relacionarse con estados patológicos previos de hiperlipemia que supongan un factor de comorbilidad en la causas de la muerte o un factor de riesgo familiar a valorar en la muerte súbita. Sin embargo no todos los métodos analíticos del colesterol aseguran unos resultados totalmente fiables. Hart y col en un estudio realizado con tecnología de química seca y reacción colorimétrica (Ektachem 700) cuestionan los resultados obtenidos [11]. Nuestros resultados presentan diferencias significativas entre los valores de los dos métodos ensayados y el de referencia ($p = 0,000$). No hay diferencias entre los dos primeros métodos a comparar ($p = 0,570$). En relación con el potasio, en medicina forense, su determinación en humor vítreo se realiza desde hace tiempo. Una de sus aplicaciones es valorar alteraciones de los electrolitos, en unión del cloro y el sodio, que puedan orientar a cuadros metabólicos, estados de deshidratación u otras patologías. Su principal estudio en medicina legal es la determinación de la data de la muerte. La metodología analítica del potasio se realiza por varios métodos, los más frecuentes son la potenciometría y la fotometría de llama. Según los métodos utilizados puede haber algunas diferencias en los resultados [12] Ferslew propuso el análisis por ion

capilar, electroforesis capilar con buena correlación con la potenciometría directa con ion selectivo [13]. Los valores de potasio con el método evaluado Spotchem EL no aportan diferencias significativas con el método de referencia ($p=0,131$) pero la correlación es de 0,852. La evaluación de la ecuación de regresión da un IC de la pendiente de 0,655-0,964 y un IC de intercepción de 0,541-3,546. La importancia de diferentes resultados analíticos va en función de la precisión que requiere el elemento de estudio. Pequeñas variaciones en cifras altas de glucosa o colesterol no tienen la relevancia que pueden tener en los valores de los electrolitos. Si el potasio se evalúa para determinar la data de la muerte, estas pequeñas variaciones pueden implicar aún mayor margen de error del que ya puede existir al aplicar las distintas fórmulas establecidas a este fin.

En conclusión los resultados obtenidos con estos sistemas de análisis de química seca, no validados para muestras postmortem, no permiten considerar su utilidad en el medio forense. No obstante su utilización y fiabilidad en la clínica viene avalada por una amplia difusión.

AGRADECIMIENTOS:

Nuestro agradecimiento a José Díaz y Agustina Castellvi por su colaboración en la realización del estudio. □

BIBLIOGRAFÍA:

- 1.- Jiménez G, Luna A, Villanueva E. Etude du comportement postmortem de catecholamines totales, adrenaline et noradrenaline dans le liquide pericardique, en relation avec la cause de decés et la durée de l'agonie. *J Medical Legal Droit Medical* 1988; 31: 251-259
- 2.- Meyer D, Meyers R, Prendegast T. The usefulness of diagnostic tests in pericardial fluid. *Chest* 1997; 111 (5): 1156-1157
- 3.- Perez Cárceles M, Osuna E, Viera D, Martínez A, Luna A. Biochemical assesment of acute myocardial ischemia. *J Clin pathol* 1995; 48 (2): 124-128.
- 4.- Coe J. Postmortem chemistry update. *Am J Forensic Med Pathol* 1993; 14 (2). 91-117
- 5.- Luna A, Villanueva E, Castellano M, Jimenez G. The determination of CK, LDH and its isoenzymes in periacrdial fluid and its application to the postmortem diagnosis of myocardial infarction. *Forensic Sci Int* 1982 Jan-Feb;19 (1):85-91
- 6.- Burns J, Milroy C, Hulewicz B, Walkley S, Robberts N. Necropsy study of association between sudden death and cardiac enzymes. *J Clin Pathol* 1992 Mar; 45 (3):217-20
- 7.- Osuna E, Pérez Cárceles M, Vieira D, Luna A. Distribution of biochemical markers in biologic fluids: application to the diagnosis of myocardial infarction. *Am J Forensic Med Pathol* 1998 Jun; 19 (2): 123-8
- 8.- Freedman D, Wattigney W, Srinivassan S, Newman W, Tracy R, Byerster T, Berenson G. The relation of atherosclerotic lesions to ante-mortem and postmortem lipid levels. The Bogalusa Heart Study. *Atherosclerosis* 1993 Dec; 104 (1-2):37-46
- 9.- Glanville J. Postmortem serum cholesterol levels. *Br Med J* 1960; 2: 1862.
- 10.- Honick C, Baker H, Malcom G, Newman W, Roheion P, Strong J. Lipoproteins and apolipoproteins in postmortem serum. *Mod Pathol* 1988; 1:480
- 11.- Hart A, Zunwalt R, Dasgupta A. Postmortem lipid levels for the analysis of risk factors of sudden death; usefulness of the Ektachem and Monarch analyzers. *Am J Forensic Med Pathol* 1997 Dec; 18 (4):354-9
- 12.- Métodos químicos para el cálculo de la data de la muerte. En Casas J, Rodríguez S. *Medicina Legal*. Ed Colex. Madrid 2000 : 1125
- 13.- Ferslew K, Hagardon A, Harrison M, Mc Cornuck W. Capillary ion analysis of potassium concentrations in human vitreous. *Electrophoresis* 1988; 19: 6-10.