

# A IMPORTÂNCIA DO HUMOR VÍTREO EM ANÁLISES POST-MORTEM

## THE IMPORTANCE OF VITREOUS HUMOR IN POST-MORTEM ANALYSIS

### **Autores**

Angela Carapito - Escola Superior de Saúde Dr. Lopes Dias – Instituto Politécnico de Castelo Branco, *MSc*

Francisco Rodrigues - Qualidade de Vida no Mundo Rural (QRural) | Sport, Health & Exercise Unit (SHERU), Instituto Politécnico de Castelo Branco, *PhD*

Patrícia Coelho - Sport, Health & Exercise Unit (SHERU) | Qualidade de Vida no Mundo Rural (QRural), Instituto Politécnico de Castelo Branco, *PhD*

### **Centro de execução do trabalho**

Escola Superior de Saúde  
Centro Hospitalar de Leiria

### **Conflitos de interesse**

A equipa de investigação declara a não existência de conflitos de interesse na realização do estudo.

### **Fontes de Financiamento**

Sem fonte de financiamento

### **Contacto do autor responsável**

Angela\_c\_carapito@hotmail.com

### **Tipo de artigo**

Artigo de Revisão

## Resumo

### Introdução

As análises bioquímicas realizadas ao humor vítreo constituem hoje uma mais valia para a toxicologia forense e em análises *post-mortem* ajudando a determinar a causa de morte e a estimar o intervalo *post-mortem*, assim como a elucidar casos forenses. O humor vítreo é uma substância gelatinosa contida na parte posterior do olho, constituído por 99% de água. Devido à sua composição e às suas características, é utilizado como matriz para diversas determinações analíticas *post-mortem* sendo considerada bastante útil em casos em que outros tipos de amostras não se encontram acessíveis, como é o caso do sangue ou da urina.

### Objetivo

Os objetivos desta revisão consistiram em realizar um levantamento dos conhecimentos presentes na literatura relativos às análises *post-mortem* realizadas ao humor vítreo; comparar o tipo de análises realizadas ao humor vítreo em relação a outros fluidos corporais e; determinar para quais os analitos as quantificações poderão ou não ser vantajosas.

### Materiais e Métodos

A pesquisa e recolha de informação foi realizada a partir de bases de dados como a *PubMed*, *b-on* e *ResearchGate* e a análise baseada em diversos artigos originais, de revisão e casos clínicos publicados entre 2000 e 2020.

### Discussão e Conclusão

As determinações analíticas efetuadas ao humor vítreo *post-mortem* têm demonstrado inúmeras vantagens em toxicologia forense. Estudos realizados neste âmbito têm mostrado que através de uma abordagem mais detalhada será possível obter um maior conhecimento acerca do intervalo *post-mortem*, determinar causas de morte ou ainda, identificar marcadores associados a determinadas patologias oculares. Diversos desafios ainda existem relativamente à interpretação das concentrações no humor vítreo, técnicas de amostragem e redistribuição *post-mortem* dos compostos a analisar. Mais estudos devem ser desenvolvidos tendo em vista análises comparativas entre técnicas, analitos, fluidos corporais e outras variáveis que possam influenciar os resultados das determinações analíticas.

### Palavras chave

humor vítreo (A09.371.714.500), *post-mortem* (C23.550.260.224.617), toxicologia forense (H01.158.891.424), análise quantitativa (SP4.016.172.893).

## Abstract

### Introduction

Biochemical analyses performed on vitreous humor are today an asset for forensic toxicology and in *post-mortem* analyses, helping to determine the cause of death and to estimate the *post-mortem* interval, as well as elucidating forensic cases. The vitreous humor is a gelatinous substance contained in the posterior part of the eye, consisting of 99% water. Due to its composition and characteristics, it is used as a matrix for several *post-mortem* analytical determinations and is considered quite useful in cases where other types of samples are not accessible, such as blood or urine.

### Aim

The aims of this review were to carry out a survey of the knowledge present in the literature regarding *post-mortem* analyses performed on vitreous humor; compare the type of analyses performed on the vitreous humor in relation to other body fluids and; determine for which analytes the quantifications may or may not be advantageous.

### Materials and Methods

The search and collect of information was performed from data bases like *PubMed*, *b-on* and *ResearchGate* and the analyses based on several original and review articles and case reports published from 2000 to 2020.

### Discussion/Conclusion

Analytical determinations performed on the *post-mortem* vitreous humor have demonstrated numerous advantages in forensic toxicology. Studies carried out in this context have shown that through a more detailed approach it will be possible to obtain greater knowledge about the *post-mortem* interval, determine causes of death or even identify markers associated with certain ocular pathologies. Several challenges still exist regarding the interpretation of vitreous humor concentrations, sampling techniques and *post-mortem* redistribution of the compounds to be analysed. More studies should be developed with a view to comparative analysis between techniques, analytes, body fluids and other variables that may influence the results of analytical determinations.

### Keywords

vitreous humor (A09.371.714.500), *post-mortem* (E01.370.060), forensic toxicology (H01.158.891.424), quantitative analysis (Q000032).

## Introdução

As análises bioquímicas realizadas ao humor vítreo (HV) têm revelado ser uma mais valia para a toxicologia forense e em análises *post-mortem* ajudando a determinar a causa de morte e a estimar o intervalo *post-mortem* (IPM), assim como a elucidar casos forenses <sup>(1)</sup>.

O HV é uma substância gelatinosa que preenche a cavidade posterior do globo ocular, tendo como função manter a estrutura e estabilidade do olho, tal como apoiar a retina, mantendo-se assim transparente de forma à luz poder difundir-se livremente atravessando-a<sup>(2)</sup>.

O volume total de HV no interior do globo ocular compreende aproximadamente 4 a 5 ml podendo variar consoante a idade do indivíduo e o tamanho do olho<sup>(2,3)</sup>. É constituído por 99% de água sendo que os restantes 1% dizem respeito a constituintes de alto e baixo peso molecular como por exemplo, alguns componentes glucídicos, colagénio, ureia, creatinina, ácido hialurónico e eletrólitos (cálcio, potássio, magnésio, cloro e sódio)<sup>(1)</sup>.

Apesar das diversas vantagens na utilização deste tipo de amostra é necessário ter em conta algumas das suas limitações. Em situações *post-mortem*, é possível que tanto o sangue como outros fluidos corporais possam não estar disponíveis, estar contaminados ou suscetíveis a alterações *post-mortem*, sendo por isso necessário que existam outras amostras alternativas para as análises toxicológicas. Tal como referido, as determinações analíticas ao HV são especialmente importantes quando o sangue e/ou a urina não estão disponíveis, quando o cadáver apresente sinais de desidratação, tenha sofrido um trauma e/ou tenha sido sujeito a exsanguinação ou a embalsamento<sup>(4-6)</sup>.

Embora o etanol represente a principal substância analisada em toxicologia *post-mortem*, existem outras substâncias que são quantificadas no HV, como é o caso de inúmeras drogas como cocaína, opiáceos, benzodiazepinas, entre outras<sup>(4,7)</sup>.

Este artigo tem como objetivo esclarecer, em que medida é que as análises realizadas ao HV podem ser efetivamente mais promissoras do que as realizadas a outros tipos de fluidos corporais e para

quais analitos as quantificações serão ou não mais vantajosas. Desta forma, será possível providenciar um melhor esclarecimento acerca das razões pelas quais se torna essencial estabelecer maior conhecimento acerca das vantagens e desvantagens das determinações ao HV após a morte e relacioná-lo com outros fluidos utilizados em análises forenses, como é o caso do sangue, da urina ou do fluido cerebrospinal na quantificação de diversas substâncias.

## Materiais e Métodos

Este trabalho teve por base a avaliação de diversos artigos de revisão, investigação e casos clínicos, publicados no período entre 2000 e 2020 (artigos publicados em 1969 e entre 1989-1999 foram utilizados para a contextualização da revisão), que se consideraram relevantes para uma melhor abordagem do tema e cumprimento dos objetivos propostos. O critério de inclusão dos artigos foi a abordagem sobre os diversos analitos quantificados no HV *post-mortem*, técnicas para a sua quantificação e variáveis que influenciam nos resultados.

A pesquisa e recolha de informação foi realizada a partir de bases de dados como a *PubMed*, *B-on* e *ResearchGate*. A pesquisa incluiu a combinação de palavras-chave como “vitreous humor”, “*post-mortem*”, “forensic toxicology” e “quantitative analysis”.

## O humor vítreo

As primeiras análises ao HV começaram a ser desenvolvidas em 1959 por Naumann, relativamente às quantificações de potássio *post-mortem*, gerando desta forma um aumento do interesse acerca das diversas aplicações e potenciais deste fluido na toxicologia forense<sup>(1,8)</sup>.

As vantagens da utilização do HV na toxicologia forense assentam nomeadamente no facto de: 1) Ser uma amostra que cuja obtenção não necessita da realização de uma necropsia completa; 2) O risco de contaminação da mesma é menor uma vez que se encontra mais isolado anatomicamente relativamente a outras amostras (como é o caso do sangue ou o do fluido cerebrospinal); 3) A distância relativamente ao intestino ser maior, diminuindo o risco de contaminação<sup>(1,5)</sup>. Desta

forma, a própria composição deste fluido biológico torna-o menos suscetível a alterações *post-mortem* relativamente aos restantes tipos de amostras<sup>(1)</sup>. Por outro lado, não é aconselhável ser utilizado em casos em que o corpo tenha sido incinerado ou apresente uma má decomposição, que tenha sofrido de alguma patologia ocular ou sido submetido a uma cirurgia oftalmológica, uma vez que existe uma elevada probabilidade de alterações na composição bioquímica e celular podendo assim conduzir a resultados erróneos<sup>(4,9)</sup>.

### Colheita, preparação e processamento da amostra

Para a recolha de HV na autópsia, o líquido deve ser aspirado com uma agulha hipodérmica fina e colhido do canto externo do olho afastando as pálpebras<sup>(1,2,7)</sup>. O processo deve ser realizado de forma lenta e a recolha deve ser feita de ambos os olhos podendo ou não, ser combinado numa única amostra<sup>(10)</sup>. A inserção da agulha no globo ocular deve ser o mais central possível, de forma a evitar que haja aspiração de material proveniente da retina ou da íris, cuja composição é muito variável em comparação com o HV<sup>(1,2,7)</sup>. Estudos em que foi realizado o doseamento de meprobamato, 3,4-metilenodioximetanfetamina (MDMA), fenitoína, barbitúricos e cocaína mostraram que o teor destes compostos é semelhante em ambos os olhos, podendo ser misturado o HV proveniente de ambos os olhos para constituição de uma amostra única<sup>(11-14)</sup>. No entanto, para outros compostos, como os glicosídeos cardiotónicos (ex: digoxina e digitoxina), cuja acumulação tende a ser elevada na retina, o processo de aspiração do HV pode afetar as concentrações, sendo aconselhado que as amostras sejam recolhidas dos dois olhos em separado<sup>(15,16)</sup>. Após a recolha, os olhos devem ser preenchidos com água ou solução salina de forma a manter a estrutura e melhorar a aparência dos mesmos<sup>(2,7)</sup>.

Para determinações de etanol e outras drogas, o HV retirado na colheita deve ser colocado num recipiente contendo um anticoagulante (fluoreto de sódio), por forma a evitar a coagulação do mesmo. Contudo é importante esclarecer o impacto do anticoagulante na determinação de analitos, uma vez que alguns estudos mostraram que a presença de diferentes anticoagulantes podem levar à formação ou degradação de certos xenobióticos<sup>(2,7,17)</sup>. O tubo/frasco em que se recolhe e armazena a amostra deve ter uma capacidade semelhante ao volume de amostra recolhida por forma a evitar a presença de ar no interior, facto que permite uma evaporação mais rápida de analitos voláteis, como o etanol<sup>(7)</sup>.

Quando se pretende realizar quantificações analíticas nas diferentes técnicas é necessário realizar um pré-tratamento da amostra para eliminar a natureza viscosa do HV, como por exemplo hidrólise enzimática (hialuronidase), aquecimento, diluição, microfiltração e/ou centrifugação<sup>(7)</sup>.

Após o pré-tratamento da amostra, existe uma variedade de técnicas aplicadas nas determinações analíticas ao HV entre as quais a cromatografia gasosa e cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa (GC-MS e LC-MS), cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detetores de arranjo de díodos (HPLC-DAD), eletroforese capilar, entre outras<sup>(2,7)</sup>. No entanto, existem poucas técnicas validadas para a quantificação de determinados analitos (ex: xenobióticos) quando comparado, por exemplo, com quantificações realizadas em amostras de sangue periférico ou urina<sup>(2)</sup>.

## Determinações analíticas

### Etanol

As determinações de etanol *post-mortem* constituem as análises mais frequentemente realizadas em toxicologia forense, especialmente em casos criminais em que os limites legais se demonstram altamente relevantes<sup>(18)</sup>.

As determinações de etanol são realizadas na maior parte das vezes no sangue. No entanto, determinados estudos mostraram que cerca de metade dos indivíduos alcoólicos morrem com concentrações negativas de álcool no sangue, enquanto os restantes apresentam níveis baixos dessas concentrações<sup>(1)</sup>. Por este motivo, diversos estudos têm utilizado biomarcadores de consumo de etanol como etil-glucoronídeo (EtG) como foi o caso de um estudo desenvolvido por Vezzoli et al. no qual, através da análise comparativa entre o sangue e o HV, os autores concluíram que existia a possibilidade de usar o HV para estimar o consumo de etanol<sup>(19)</sup>. Assim, estas análises demonstraram que a quantificação de EtG no HV representa um excelente parâmetro para diferenciar entre o consumo de etanol antes da morte e a sua formação *post-mortem* devido a fenómenos putrefativos<sup>(19)</sup>. Uma vez que o HV se trata de um espaço anatómico relativamente protegido de bactérias, a determinação de álcool no sangue e a sua ausência no HV é indicativo de

produção de etanol *post-mortem*. Se por outro lado, os níveis de álcool no HV e no sangue forem ambos elevados, então estes serão indicativos de uma ingestão *ante-mortem*<sup>(20)</sup>.

Relativamente às quantificações dos níveis de etanol no sangue, considera-se que o local da colheita deve ser feito da veia femoral, existindo estudos que demonstraram que as concentrações de etanol no sangue cardíaco são mais altas relativamente a veias periféricas<sup>(4)</sup>. Estas variações podem também existir em casos de inalação do conteúdo gástrico<sup>(21)</sup>.

Segundo diversos autores, o método mais aceite e utilizado para determinações quantitativas e qualitativas de etanol nos fluidos corporais e/ou tecidos é a cromatografia gasosa com detetor de ionização de chama, usando técnicas de injeção direta ou por amostragem *headspace*<sup>(4,22,23)</sup>.

Algumas discrepâncias entre estudos baseiam-se essencialmente no rácio HV/sangue do etanol, apresentando valores de 1,15-1,20:1 de acordo com Kugelberg e Jones, ou ainda de 1,1 a 1,3 num estudo de Singer et al., de 1,2: 1 num outro de Ioan et al., mas também de 1,19 segundo Jones e Holmgren<sup>(4-6,24)</sup>. Embora estas avaliações não sejam sempre concordantes, através da comparação entre a concentração de álcool no HV e a concentração de álcool no sangue, é possível estimar em que fase da absorção se encontra o indivíduo aquando da morte. Para isto, e sabendo que o HV tem uma quantidade de água superior ao sangue (1,3:1), após absorção e chegando ao estado de equilíbrio, essa razão mantém-se. Contudo, se a concentração de álcool no sangue for igual ou superior à concentração de álcool no HV, isto será indicativo de que o indivíduo ainda se encontra na fase de absorção<sup>(20)</sup>.

Em mortes em que o corpo esteve imerso em água, as concentrações de etanol podem variar<sup>(4)</sup>. Alguns autores concluíram que, durante os meses mais quentes, a produção de etanol pode iniciar-se após 12 a 24 horas após a imersão do mesmo em água<sup>(4)</sup>. Para além disso, tempos de imersão mais longos foram associados a maiores concentrações de etanol no sangue<sup>(4)</sup>. Outros estudos reportaram ainda que o etanol pode atravessar para o interior do olho por difusão através da esclerótica, levando

ao aumento dos níveis de etanol. Foi ainda concluído que períodos de imersão de 6 semanas resultaram em valores de etanol no HV mais baixos quando comparados com os do sangue<sup>(24)</sup>.

O HV pode ainda apresentar vantagens relativamente ao sangue em situações em que existiu perfuração do estômago (ex: enforcamentos, ferimentos por bala, acidentes de aviação), no qual o líquido gástrico, altamente concentrado em álcool, se mistura com o sangue<sup>(21)</sup>.

### Drogas

As determinações de drogas no HV têm sido menos estudadas devido, em parte, à dificuldade no estabelecimento e interpretação de resultados quantitativos pela barreira hemato-retiniana<sup>(7)</sup>.

A urina apresenta-se como a principal amostra na quantificação de drogas devido à janela temporal ser mais ampla para a deteção de compostos exógenos em relação a outras amostras. No entanto, esta nem sempre se encontra disponível, como é descrito por Pelander et al. no qual a urina se encontra acessível apenas em 15% dos casos<sup>(25)</sup>.

Num estudo realizado por Scott e Oliver, com base em 20 casos mortais causados por heroína, os autores reportaram concentrações de morfina (proveniente da metabolização da heroína no fígado) mais baixos no HV do que no sangue. Posto isto, os autores consideraram o HV uma matriz de grande importância para as determinações de morfina quando não existe presença de sangue<sup>(7,26)</sup>. Num outro estudo desenvolvido por Rees et al., os autores salientaram que embora exista efetivamente níveis mais baixos no HV do que no sangue, é importante ter em consideração que esses valores podem sofrer alterações dependendo do intervalo de tempo entre a toma de morfina e o momento da morte, assim como das diferentes formas de consumo/administração (ex: injetável ou administração oral)<sup>(27)</sup>. Ainda no mesmo estudo, os autores sugeriram que a maior lipofilia da codeína (proveniente da metilação da morfina), habitualmente utilizada para fins terapêuticos, pode levar a que, contrariamente à morfina, as concentrações de codeína no HV sejam mais elevadas do que no sangue<sup>(27)</sup>. Pelo contrário, num outro estudo desenvolvido por Wyman e Bultman, os autores demonstraram que

as concentrações de codeína parecem apresentar valores equivalentes nos dois locais<sup>(7,28)</sup>.

Diversos estudos têm-se focado no doseamento de 6-monoacetilmorfina (6-MAM) (metabolito da heroína) em diferentes matrizes biológicas como o sangue, urina e HV, por forma a detetar um consumo de heroína<sup>(26-30)</sup>. Para além disso, estes estudos demonstram que a heroína é mais facilmente detetada no HV do que no sangue, sendo que existem casos em que é apenas identificada no HV<sup>(26-30)</sup>.

Certos autores utilizaram também o rácio de concentrações codeína/morfina no HV por forma a distinguir uma toma de codeína ou de morfina<sup>(21)</sup>. Num estudo de Wyman e Bultman, todos os casos estudados apresentaram valores significativamente mais elevados no HV do que no sangue femoral podendo este fator estar associado às diferenças lipofílicas da codeína e da morfina<sup>(28)</sup>.

No que diz respeito ao estudo da cocaína, Antonides *et al.* detetaram que em 72% dos casos analisados, as concentrações de cocaína no HV eram mais elevadas do que no sangue, ao contrário das concentrações de benzoilecgonina (metabolito da cocaína), que apresentaram valores mais elevados no sangue do que no HV em 78% dos casos analisados, o que pode ser justificado através da existência de uma atividade enzimática mais baixa do que no sangue, levando a que a cocaína sofra uma degradação mais gradual<sup>(1,30)</sup>. Contrariamente a este, Metushi *et al.* avaliaram 51 casos, no qual puderam identificar 71 compostos no sangue total e 60 no HV, concluindo assim que algumas drogas são mais difíceis de identificar no HV do que no sangue total (trazodona no sangue:  $42 \pm 0.57$ ; trazodona no HV:  $0.15 \pm 0.05$  mg/L)<sup>(31)</sup>.

No estudo de Carvalho *et al.* os autores sugerem que o rácio cocaína/benzoilecgonina pode ajudar a determinar se a morte foi acidental ou devido a uma overdose, uma vez que este rácio tende a ser mais elevado em casos de overdose (na maioria dos casos maior que 1) nas várias matrizes biológicas como HV, sangue total e tecido cerebral<sup>(32)</sup>. No entanto, foi observado que o rácio cocaína/benzoilecgonina tende a ser mais elevado no HV do que no sangue total, uma vez que existe uma atividade enzimática mais diminuída no HV comparativamente ao sangue e consequentemente uma menor degradação de cocaína nesta matriz<sup>(32)</sup>.

O tetra-hidrocanabinol (THC), principal componente psicoativo da cannabis, é uma molécula altamente lipofílica e que se liga a proteínas plasmáticas, o que limita bastante a sua difusão no HV. Por este motivo, foi demonstrado em diversos estudos que esta amostra não é recomendada para a pesquisa de cannabis e seus derivados<sup>(21,33)</sup>.

### Glucose e lactato

Após a morte os níveis de glucose no organismo diminuem, levando a um processo de glicólise anaeróbia *post-mortem*. Este processo origina a formação de piruvato e consequentemente a produção de lactato que tende a sofrer um aumento<sup>(34)</sup>.

As concentrações de glucose e lactato no HV têm sido estudadas e utilizadas como indicadores de hiperglicemia *ante-mortem* podendo até indicar se o indivíduo sofria de diabetes, condição que pode não ter sido detetada em vida<sup>(1,3)</sup>. Esta hipótese foi formulada em 1969 por Traub que estabeleceu uma fórmula a partir da qual uma molécula de glucose daria origem a duas moléculas de ácido láctico através do processo de glicólise *post-mortem*<sup>(35)</sup>. Posteriormente, outros autores desenvolveram estudos combinando as determinações de lactato e glucose em simultâneo<sup>(36-38)</sup>.

Num trabalho realizado por Zilg, 76 casos apresentavam valores de glucose no HV superiores a 10 mmol/L, sendo que em muitos destes casos estes valores elevados estavam presentes em indivíduos sem histórico de diabetes (ex: morte por asfixia, hemorragia cerebral, hipotermia, após reanimação cardiopulmonar)(39). Noutros casos, valores moderadamente elevados foram verificados em indivíduos sujeitos a alto stress fisiológico, como é o caso de situações de morte por hipotermia<sup>(3,40)</sup>. Para além disso, foi demonstrado que os níveis de glucose no HV decrescem numa primeira fase após a morte (cerca de 24 horas), mantendo-se estáveis após outras 24 horas. A razão associada a esta diminuição deve-se ao facto de que após a morte o corpo passa a estar privado de oxigénio, fazendo com que as células realizem um processo de glicólise anaeróbia convertendo desta forma a glucose a lactato<sup>(3,40)</sup>. Por isto, alguns estudos aconselham a que a determinação de lactato seja realizada simultaneamente com a de glucose. No entanto, este estudo veio demonstrar que a quantificação de glucose isoladamente aparenta ser o marcador mais apropriado para determinar hiperglicemia *ante-mortem*<sup>(3,40)</sup>.

Para além disso, é essencial que se tenha em conta outros processos metabólicos naturais que ocorrem após a morte, nomeadamente o processo de glucogenólise que acontece no fígado e que tende a aumentar a difusão de glucose na veia cava e no ventrículo direito do coração<sup>(2)</sup>. Para além disso, a presença de glucose em determinados fluidos intravenosos utilizados na reanimação também pode elevar as concentrações da mesma no sangue. Neste sentido, concentrações elevadas de glucose no sangue podem não corresponder à concentração real aquando da morte<sup>(2)</sup>.

No HV, a glucose também tende a diminuir nos primeiros instantes após a morte, contudo, a diminuição é menos acentuada, nunca chegando a exceder os 200 mg/dL. Deste modo, casos de cetoacidose metabólica podem ser detetados num curto período de tempo após a morte (em média 16 horas) através da deteção de níveis elevados de glucose e cetonas no HV<sup>(2,20)</sup>.

Contudo, num trabalho de revisão elaborado em 2011 por Hess et al. os autores restabeleceram o interesse em avaliar o metabolismo da glucose através da combinação entre as somas das concentrações de glucose e lactato (mg/dL) no HV ou no fluido cerebrospinal<sup>(38,41)</sup>.

### Sódio e cloro

Num estudo de Zilg, foi demonstrado que os níveis de cloro e sódio sofrem um ligeiro decréscimo com o aumento do IPM. Este decréscimo dos níveis de cloro e sódio no HV *post-mortem* estão associados à difusão destes eletrólitos para as células circundantes da retina e da coróide<sup>(3)</sup>. Quando avaliados 46 casos, os níveis séricos de sódio *ante-mortem* apresentaram uma correlação muito concordante com os níveis de sódio no HV *post-mortem*, especialmente em casos com IPMs curtos<sup>(3)</sup>. Uma vez que os níveis de sódio tendem a diminuir após a morte, é possível deduzir que níveis elevados deste eletrólito podem ser mais significativos, auxiliando a determinar casos de desidratação<sup>(1)</sup>.

Para além disso, quando foram estudados casos de morte por afogamento, verificou-se que nos casos em que ocorreu em água doce, apresentavam níveis significativamente mais baixos do que os encontrados em afogamentos ocorridos no Mar Báltico (baixas concentrações de sal) ou casos de morte não relacionados a afogamentos<sup>(3)</sup>. Este estudo demonstrou ainda que os níveis reduzidos

de sódio encontrados nos casos de afogamento em água doce estavam claramente ligados com o tempo de imersão<sup>(3)</sup>. Outros estudos anteriores verificaram que os níveis de sódio e cloro estão aumentados em casos de afogamentos em água salgada e reduzidos em afogamentos em água doce<sup>(42)</sup>. Contudo, existem diferentes opiniões sobre se este fenómeno é resultante do próprio processo de afogamento ou do mecanismo de difusão *post-mortem* para o interior do olho através da água envolvente<sup>(3)</sup>.

Num estudo de Garland *et al.* os autores demonstraram que os níveis elevados de sódio e cloro podem também ajudar a distinguir entre afogamentos em água salgada e mortes cujo corpo esteve imerso em água mas não associado a afogamento<sup>(43)</sup>. Através da comparação da permeabilidade entre olhos humanos e de bovinos, concluíram que a elevação dos níveis de sódio e cloro *post-mortem* em mortes em água salgada, com tempos de imersão inferiores a uma hora, estariam associados a situações de imersão e não de afogamento<sup>(43)</sup>.

### Potássio

Diversos estudos desenvolvidos ao longo dos anos têm trabalhado no estudo da determinação do IPM através da quantificação de potássio. Vários modelos estatísticos e equações para estimar o IPM são baseados no facto de que, o aumento do potássio no HV segue um crescimento linear ao longo do tempo<sup>(1)</sup>. Porém, num estudo de Zilg, este crescimento seguiu uma curva exponencial que eventualmente tende a equilibrar após aproximadamente uma semana<sup>(3)</sup>.

Outro dos fatores estudados por alguns autores como podendo ter influência nos níveis de potássio no HV é a idade do indivíduo, sendo que, estas alterações podem estar associadas ao tamanho do globo ocular e à composição bioquímica e celular do HV, levando à hipótese de que, quanto mais jovem for o indivíduo maior será o aumento<sup>(3,10)</sup>. Estes resultados parecem estar em desacordo com os de Ahi e Garg, no qual a idade não apresentou qualquer influência nos níveis de potássio no HV<sup>(44)</sup>. Num estudo de Tumram *et al.*, os autores verificaram que climas mais quentes parecem influenciar nas concentrações de potássio, uma vez que os corpos estão mais sujeitos a deterioração<sup>(45)</sup>. Estas afirmações estão em concordância com os de Zilg, demonstrando que, quanto maior a temperatura ambiente, mais acentuado é o aumento das

concentrações de potássio<sup>(3)</sup>. Por outro lado, no estudo de Ahi e Garg, tanto a temperatura como a humidade não apresentaram qualquer tipo de efeito nos níveis de potássio<sup>(44)</sup>. De acordo com inúmeros investigadores, a utilização de um eléctrodo seletivo de iões com auxílio de fotometria de chama, é o método de escolha para reduzir erros analíticos<sup>(45)</sup>.

### Ácido desoxirribonucleico

Poucos estudos têm sido desenvolvidos acerca da deteção de ácido desoxirribonucleico (DNA) no HV como forma de identificação de cadáver. Baseado nisto, Soltyszewski *et al.* afirmam que os resultados obtidos apenas do HV não são suficientes como fonte de DNA. Para além disso, reconhecem que a fiabilidade destes resultados variam muito consoante a técnica de deteção utilizada, sendo que o DNA encontrado pode resultar apenas de contaminação microbiana<sup>(46)</sup>.

### Discussão

Embora existam diversas vantagens na utilização do HV, como ficou patente e demonstrado ao longo do ponto anterior deste trabalho, existem ainda algumas discordâncias entre estudos, quando considerado por exemplo a tendência de crescimento dos níveis de potássio *post-mortem*, o doseamento de glucose e lactato em conjunto ou separadamente, ou ainda na capacidade de estabelecer correlações entre os níveis de determinados analitos (ex: fármacos que se ligam facilmente a proteínas plasmáticas ou que são mais lipofílicas) comparativamente a outros fluidos biológicos (ex: sangue ou urina)<sup>(1,2)</sup>.

Uma das dificuldades na utilização do HV deve-se ao facto das técnicas atualmente utilizadas apenas estarem validadas e calibradas para amostras como urina e sangue<sup>(2)</sup>. Outro fator deve-se à própria consistência viscosa do líquido, o que apresenta pouca repetibilidade para o mesmo analito<sup>(2)</sup>. Algumas diferenças podem estar associadas a métodos e técnicas de instrumentação distintas entre estudos, assim como da própria aspiração e manuseamento da amostra<sup>(47-49)</sup>. Num dos exemplos referido numa revisão de Baniak *et al.*, os autores referem que o líquido deve ser aspirado no seu todo para que haja uma representação mais precisa das concentrações de todos os solutos. Outros

autores mencionados num trabalho de Bévalot *et al.*, pelo contrário, afirmam que deve ser aspirado apenas 2 mL de HV por cada olho por forma a evitar a aspiração de células epiteliais da retina e da íris<sup>(1,7)</sup>. Para além disso, Milló *et al.*, referem que o mesmo deve ser colhido de ambos os olhos e posteriormente separado em tubos/frascos de 10 mL, comparativamente a Hilal *et al.* que, embora assumam existirem opiniões divergentes entre estudos, afirmam que as amostras recolhidas dos dois olhos possam ser combinadas num mesmo tubo<sup>(50,51)</sup>.

Outra controvérsia está associada à determinação de glucose em simultâneo ou não, com lactato. Num estudo de Zilg, esta afirma que a quantificação de glucose, deve ser realizada isoladamente para diagnosticar quadros de hiperglicemia *ante-mortem*, uma vez que a formação de lactato pode ocorrer por outros processos para além da glicólise *post-mortem* (ex: processos de autólise, derivados do metabolismo bacteriano, alcoolismo, existência de tumores malignos, entre outros), o que pode conduzir a falsas conclusões<sup>(3,52,53)</sup>. Por outro lado, autores como Hess *et al.*, salientaram a importância de realizar estas quantificações tendo em conta a soma conjunta entre os níveis de glucose e de lactato no HV ou no fluido cerebrospinal<sup>(38,41)</sup>.

O estabelecimento de métodos para correlacionar os valores das concentrações dos analitos no sangue e no HV, pode afigurar-se relevante quando se suspeita de alterações *post-mortem* no sangue ou quando o HV não pode ser recolhido<sup>(6)</sup>.

Num estudo de Tumram *et al.* os autores afirmam que os corpos expostos a temperaturas mais baixas estão menos sujeitos a deterioração do que aqueles expostos a temperaturas superiores, podendo desta forma afetar as determinações de potássio<sup>(45)</sup>. Em contrapartida, um outro estudo realizado por Ahi e Garg comprovou que entre os 21-35°C as variações nos níveis de potássio não foram significativas tendo assim concluído que a humidade e a temperatura entre os mesmos valores não têm influência significativa nos níveis de potássio no HV<sup>(44)</sup>.



## Conclusão e perspectivas futuras

Desta forma é possível concluir que a utilização do HV pode contribuir positivamente na elucidação de casos forenses nomeadamente na estimativa do IPM, hiperglicemia/cetoacidose diabética, afogamentos, ou ainda em casos judiciais para determinações de álcool ou drogas. O HV apresenta uma ampla variedade de vantagens quanto à sua composição e propriedades bioquímicas, uma vez que se encontra anatomicamente preservado dos processos de decomposição e contaminação bacteriana quando comparado a outros fluidos corporais como sangue ou urina. No entanto é necessário ter sempre em consideração todas as variáveis que possam desta forma afetar a obtenção de resultados fiáveis e rigorosos de modo a minimizar a ocorrência de erros analíticos e pós-analíticos.

Relativamente às drogas/fármacos, as moléculas mais lipofílicas ou fortemente ligadas a proteínas plasmáticas podem estar quase ausentes no HV pelo que a sua determinação/análise neste tipo de amostra deve ser realizada com precaução.

Ao longo dos anos, têm sido desenvolvidos uma série de algoritmos e análises estatísticas para estimar o IPM. Estas equações têm sido aplicadas por forma a perceber por exemplo, o aumento do potássio *post-mortem* ou ainda a relação entre os níveis de etanol no sangue e o HV, no entanto, é importante que se estabeleçam correlações e algoritmos mais consensuais de maneira a proceder a uma correta realização e interpretação dos achados laboratoriais.

Futuramente, é importante que sejam realizados mais estudos acerca dos fenómenos de redistribuição e biotransformação *post-mortem* de variados analitos (ex: benzodiazepinas, antidepressores cíclicos, drogas de abuso, entre outros), nomeadamente em relação aos diferentes compartimentos oculares considerando estudos com um maior número de casos.

Para além disso é essencial que haja um desenvolvimento de métodos de validação e uniformização para técnicas como GC ou LC para a utilização de HV, assim como a otimização dos métodos de colheita e extração.

Apesar das possíveis desvantagens e/ou limitações das determinações analíticas ao HV *post-mortem*, esta amostra apresenta diversas oportunidades no futuro da toxicologia forense e na elucidação de casos *post-mortem*.

## Referências Bibliográficas

1. Baniak N, Campos-Baniak G, Kalra J. Vitreous Humor: A Short Review on Post-mortem Applications. *J Clin Exp Pathol.* 2015;05(01):1-7.
2. Montefusco-Pereira CV, Pinto L de MA. El humor vítreo como fluido biológico de importancia clínica en ciencias forenses. *Acta Bioquím Clín Latinoam.* 2016;50(1):17-35.
3. Zilg B. Postmortem analyses of vitreous fluid [Internet]. Karolinska Institutet; 2015. Available from: <https://openarchive.ki.se/xmlui/handle/10616/44849>
4. Kugelberg FC, Jones AW. Interpreting results of ethanol analysis in postmortem specimens: A review of the literature. *Forensic Sci Int.* 2007;165(1):10-29.
5. Jones AW, Holmgren P. Uncertainty in estimating blood ethanol concentrations by analysis of vitreous humour. *J Clin Pathol.* 2001;54(9):699-702.
6. Ioan BG, Jitaru V, Damian R, Damian SI. Study on the relationship between the concentration of ethanol in the blood, urine and the vitreous humour. *Rom J Leg Med.* 2015;23(3):211-6.
7. Bévalot F, Cartiser N, Bottinelli C, Fanton L, Guitton J. Vitreous humor analysis for the detection of xenobiotics in forensic toxicology: a review. *Forensic Toxicol.* 2016;34(1):12-40.
8. Hayman J, Marc O. Human body decomposition. 1st ed. Press A, editor. 2016.
9. Parsons MA, Start RD, Forrest ARW. Concurrent vitreous disease may produce abnormal vitreous humour biochemistry and toxicology. *J Clin Pathol.* 2003;56(9):720.
10. McCleskey BC, Dye DW, Davis GG. Review of Postmortem Interval Estimation Using Vitreous Humor: Past, Present, and Future. *Acad Forensic Pathol.* 2016;6(1):12-8.
11. Bévalot F, Gustin MP, Cartiser N, Le Meur C, Malicier D, Fanton L. Interpretation of drug concentrations in an alternative matrix: The case of meprobamate in vitreous humor. *Int J Legal Med.* 2011;125(3):463-8.
12. De Letter EA, De Paepe P, Clauwaert KM, Belpaire FM, Lambert WE, Van Bocxlaer JF, et al. Is vitreous humour useful for the interpretation of 3,4-methylenedioxyamphetamine (MDMA) blood levels? Experimental approach with rabbits. *Int J Legal Med.* 2000;114(1-2):29-35.
13. Logan BK, Stafford DT. Direct analysis of anticonvulsant drugs in vitreous humour by HPLC using a column switching technique. *Forensic Sci Int.* 1989;41(1-2):125-34.
14. Rees KA, Seulin S, Yonamine M, Leyton V, Munoz DR, Gianvecchio VAP, et al. Analysis of skeletal muscle has potential value in the assessment of cocaine-related deaths. *Forensic Sci Int [Internet].* 2013;226(1-3):46-53. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.forsciint.2012.12.005>
15. Ritz S, Harding P, Martz W, Schütz HW, Kaatsch HJ. Measurement of digitalis-glycoside levels in ocular tissues: -A way to improve postmortem diagnosis of lethal digitalis-glycoside poisoning? I. Digoxin. *Int J Legal Med.* 1992;105(3):149-54.
16. Dinis-Oliveira RJ, Carvalho FD, Bastos M de L. *Toxicologia Fundamental.* Iidel, editor. 2018.
17. 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.
18. Athanaselis S, Stefanidou M, Koutselinis A. Interpretation of postmortem alcohol concentrations. *Forensic Sci Int.* 2005;149(2-3):289-91.
19. Vezzoli S, Bernini M, Ferrari F De. Ethyl glucuronide in vitreous humor and blood postmortem specimens: analysis by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry and interpreting results of neo-formation of ethanol. *Ann Ist Super Sanità.* 2015;51(1):17-27.
20. Gill JR. From Death to Death Certificate: What do the Dead say? *J Med Toxicol.* 2017;13(1):111-6.
21. Brunet B, Mura P. L'humeur vitrée en toxicologie médico-légale: Revue de la littérature et applications. *Ann Toxicol Anal.* 2012;24(1):9-15.
22. Chun HJ, Poklis JL, Poklis A, Wolf CE. Development and validation of a method for alcohol analysis in brain tissue by headspace gas chromatography with flame ionization detector. *J Anal Toxicol.* 2016;40(8):653-8.
23. Iskierka M, Zawadzki M, Szpot P, Jurek T. Comparison of post-mortem ethanol level in blood and bone marrow. *J Forensic Leg Med [Internet].* 2019;61:65-8. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jflm.2018.11.003>
24. Singer PP, Jones GR, Lewis R, Johnson R. Loss of ethanol from vitreous humor in drowning deaths. *J Anal Toxicol.* 2007;31(8):522-5.
25. Pelander A, Ristimaa J, Ojanperä 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.
26. Scott KS, Oliver JS. Vitreous humor as an alternative sample to blood for the supercritical fluid extraction of morphine and 6-monoacetylmorphine. *Med Sci Law.* 1999;39(1):77-81.
27. Rees KA, Pounder DJ, Osselton MD. Distribution of opiates in femoral blood and vitreous humour in heroin/morphine-related deaths. *Forensic Sci Int [Internet].* 2013;226(1-3):152-9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.forsciint.2013.01.002>
28. Wyman J, Bultman S. Postmortem Distribution of Heroin Metabolites in Femoral Blood, Liver, Cerebrospinal Fluid, and Vitreous Humor. *J Anal Toxicol.* 2004;28(4):260-3.
29. Pragst F, Spiegel K, Leuschner U, Hager A. Detection of 6-acetylmorphine in vitreous humor and cerebrospinal fluid - Comparison with urinary analysis for proving heroin administration in opiate fatalities. *J Anal Toxicol.* 1999;23(3):168-72.
30. Antonides HM, Kiely ER, Marinetti LJ. Vitreous fluid quantification of opiates, cocaine, and benzoyllecgonine: Comparison of calibration curves in both blood and vitreous matrices with corresponding concentrations in blood. *J Anal Toxicol.* 2007;31(8):469-76.

31. Metushi IG, Fitzgerald RL, McIntyre IM. Assessment and comparison of vitreous humor as an alternative matrix for forensic toxicology screening by GC-MS. *J Anal Toxicol*. 2016;40(4):243–7.
32. Carvalho VM, Fukushima AR, Fontes LR, Fuzinato D V., Florio JC, Chasin AAM. Cocaine postmortem distribution in three brain structures: A comparison with whole blood and vitreous humor. *J Forensic Leg Med* [Internet]. 2013;20(3):143–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jflm.2012.06.006>
33. Saenz SR, Lewis RJ, Angier MK, Wagner JR. Postmortem fluid and tissue concentrations of THC, 11-OH-THC and THC-COOH. *J Anal Toxicol*. 2017;41(6):508–16.
34. Kumari A. Chapter 1 – Glycolysis. *Sweet Biochem*. 2018;1–5.
35. F. T. Methode zur Erkennung von tödlichen Zuckerstoffwechselstörungen an der Leiche (Diabetes mellitus und Hypoglykämie). *Zentrabl Allg Pathol*. 1969;112:390–9.
36. Osuna E, García-Víllora A, Pérez-Cárceles M, Conejero J, Abenza JM, 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.
37. De Letter EA, Piette MHA. Can routinely combined analysis of glucose and lactate in vitreous humor be useful in current forensic practice? *Am J Forensic Med Pathol*. 1998;19(4):335–42.
38. Palmiere C, Sporkert F, Vaucher P, Werner D, Bardy D, Rey F, et al. Is the formula of Traub still up to date in antemortem blood glucose level estimation? *Int J Legal Med*. 2012;126(3):407–13.
39. Pigaiani N, Bertaso A, De Palo EF, Bortolotti F, Tagliaro F. Vitreous humor endogenous compounds analysis for post-mortem forensic investigation. *Forensic Sci Int* [Internet]. 2020;310:110235. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2020.110235>
40. Zilg B, Alkass K, Berg S, Druid H. Postmortem identification of hyperglycemia. *Forensic Sci Int* [Internet]. 2009;185(1–3):89–95. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.forsciint.2008.12.017>
41. Hess C, Musshoff F, Madea B. Disorders of glucose metabolism-post mortem analyses in forensic cases: Part I. *Int J Legal Med*. 2011;125(2):163–70.
42. Byard RW, Summersides G. Vitreous humor sodium levels in immersion deaths. *J Forensic Sci*. 2011;56(3):643–4.
43. Garland J, Tse R, Oldmeadow C, Attia J, Anne S, Cala AD. Elevation of post mortem vitreous humor sodium and chloride levels can be used as a reliable test in cases of suspected salt water drowning when the immersion times are less than one hour. *Forensic Sci Int* [Internet]. 2016;266:338–42. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.forsciint.2016.06.001>
44. Ahi RS, Garg V. Role of vitreous potassium level in estimating postmortem interval and the factors affecting it. *J Clin Diagnostic Res*. 2011;5(1):13–5.
45. Tumram NK, Ambade VN, Dongre AP. Thanatochemistry: Study of vitreous humor potassium. *Alexandria J Med* [Internet]. 2014;50(4):365–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajme.2013.12.002>
46. Soltyszewski I, Niemcunowicz-Janica A, Pepinski W, Spólnicka M, Zbiec R, Janica J. Vitreous humor as a potential DNA source for postmortem human identification. *Folia Histochem Cytobiol*. 2007;45(2):135–6.
47. Blana SA, Mußhoff F, Hoeller T, Fimmers R, Madea B. Variations in vitreous humor chemical values as a result of pre-analytical treatment. *Forensic Sci Int* [Internet]. 2011;210(1–3):263–70. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.forsciint.2011.03.023>
48. Mulla A, Massey KL, Kalra J. Vitreous humor biochemical constituents: Evaluation of between-eye differences. *Am J Forensic Med Pathol*. 2005;26(2):146–9.
49. Madea B, Musshoff F. Postmortem biochemistry. *Forensic Sci Int*. 2007;165(2–3):165–71.
50. Millo T, Jaiswa A, Behera C. Collection, preservation and forwarding of biological samples for toxicological analysis in medicolegal autopsy cases: A review. *J Indian Acad Forensic Med*. 2008;30(2):96–100.
51. Hilal M, Abdullah E, El Sayed R, Salman H. Review on Collection, Preservation and Forwarding of Biological Samples for Toxicological Analysis. *Sohag Med J*. 2018;22(1):431–8.
52. Keltanen T, Nenonen T, Ketola RA, Ojanperä I, Sajantila A, Lindroos K. Post-mortem analysis of lactate concentration in diabetics and metformin poisonings. *Int J Legal Med*. 2015;129(6):1225–31.
53. Holstein A, Titze U, Hess C. Postmortem Analysis of Vitreous Humor For Detection of Antemortem Disorders in Glucose Metabolism. An Old Method Revisited. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2018;