



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Matemáticas y de la
Especialización en Estadística Aplicada**

**ANÁLISIS ESTADÍSTICO Y DE CORRELACIÓN DE CONCENTRACIÓN DE ETANOL EN
FLUIDOS BIOLÓGICOS POST-MORTEM**

TESINA QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
Especialista en Estadística Aplicada

PRESENTA

M. en C. Carlos Alejandro Díaz Tufinio

TUTOR PRINCIPAL

Dra. Silvia Ruiz-Velasco Acosta

Instituto de Investigaciones en Matemáticas Aplicadas y Sistemas, UNAM



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**PROGRAMA DE MAESTRIA Y DOCTORADO EN
CIENCIAS MATEMATICAS Y DE LA
ESPECIALIZACION EN ESTADISTICA APLICADA
No. Oficio. PCM/SRVA/E.E.A./037/2016.**

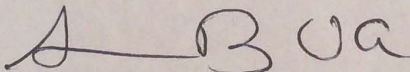
**M. en C. CARLOS ALEJANDRO DIAZ TUFINIO
PRESENTE.**

Por medio del presente me permito informar a usted, que el Comité Académico del Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Matemáticas y de la Especialización en Estadística Aplicada, aprobó su propuesta de tema de trabajo final titulado "Análisis estadístico y de correlación de concentración de etanol en fluidos biológicos post-mortem", bajo la dirección de la Dra. Silvia Ruiz-Velasco Acosta, con el jurado integrado por:

PRESIDENTE:	M. EN E. PATRICIA ISABEL ROMERO MARES
VOCAL:	DRA. SILVIA RUIZ-VELASCO ACOSTA
SECRETARIO:	DR. EN C. ELIAS MIRANDA GONZALEZ
SUPLENTE:	M. EN C. ANTONIO SORIANO FLORES
SUPLENTE:	M. EN C. ERNESTO BERNAL MORALES

Sin otro particular de momento, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"
Ciudad Universitaria D.F., a 29 de junio del 2016.
LA COORDINADORA DEL PROGRAMA


DRA. SILVIA RUIZ-VELASCO ACOSTA

Dedicatoria

A Cinthya, mi compañera y cómplice de locuras profesionales, académicas, personales y de vida. Gracias por todo el amor, cariño, apoyo y esfuerzo en periodos tan determinantes para nuestras vidas... ¡y vamos por más juntos!

A mis padres, por su ejemplo personal y académico, porque cada pequeño paso que doy es un triunfo de su labor para conmigo a lo largo de todos estos años.

A mi hermano Manuel, mis abuelas, y a toda mi familia materna y paterna, que en los momentos buenos y en los momentos malos, demuestra lo importante que es estar unidos.

A los amigos, y a esas reuniones y charlas apasionadas de temas y excentricidades diversas, las cuales siempre enriquecen mis componentes humano, filosófico, social y científico. Aquellos amigos se pueden contar con una mano, y cada uno de ustedes sabe quiénes son.

A los que han creído y creen en mí, ya que desarrollan mi potencial para ser cada día un mejor profesional y ser humano íntegro. Esto último no podría ser posible tampoco sin aquellos sinsabores y obstáculos que día a día hay que sortear, analizar y aprender de ellos.

Y finalmente va por todos aquellos placeres culposos y actividades *off-science* que me complementan y me permiten comprender mejor al mundo y a la naturaleza.

Agradecimientos

A los técnicos César Estrada, Saúl González y Andrés Carrillo, por su apoyo para las tomas de muestra para realizar este proyecto.

A mi colega y colaborador M. en C. Carlos Enrique Díaz Otáñez, por la disposición para la colección de muestras y el análisis por HS-GC de las concentraciones de etanol en los fluidos y tejidos biológicos.

Al personal administrativo del posgrado en Ciencias Matemáticas del IIMAS, Sr. Alfredo Hernández de la Luz y Sra. Noemí González, por la guía en trámites y apoyo con los trámites administrativos antes, durante y al finalizar la especialización.

A la Dra. Silvia Ruiz-Velasco y al jurado en la defensa de esta tesis, M. en C. Ernesto Bernal Morales, M. en E. Antonio Soriano Flores, M. en E. Patricia Romero Mares, Dr. en C. Elías Miranda González, y al Q.F.B. Adrián Waldo Capetillo, por sus valiosos comentarios, revisión y mejoras a este trabajo.

Resumen

La muestra hemática es el estándar por excelencia en Toxicología para confirmar con precisión la ingesta o intoxicación alcohólica en casos forenses, con el fin de establecer la influencia de esta sustancia al momento de la muerte. Sin embargo, en ocasiones el cadáver tiene escaso o nulo contenido sanguíneo, su toma de muestra es complicada, o hay sospecha de contaminación de ésta por otros compartimentos fisiológicos, por lo que es necesario recurrir a un fluido o tejido biológico alternativo. En estas situaciones, el profesional de las ciencias forenses se enfrenta a cuestionamientos de índole científico para la selección de la mejor muestra biológica para el análisis químico y la defensa del dictamen.

Por la razón anterior, en el presente trabajo se realizó un estudio estadístico de las concentraciones de etanol en fluidos (orina, humor vítreo, líquido sinovial y bilis) y tejidos (hígado, músculo-esquelético y pulmón) *post-mortem*, con respecto a la concentración de etanol en sangre, a partir de muestras de cadáveres desconocidos recibidos en el Instituto de Ciencias Forenses (InCiFo) de la Ciudad de México. Con el uso de técnicas estadísticas (análisis de concordancia de métodos, regresión, correlación y ecuaciones estructurales) fue posible el estudio y la obtención de modelos matemáticos significativos y explicativos para estimar la alcoholemia a partir de la cuantificación de etanol de otros fluidos o tejidos.

A través de este proyecto fue posible una aportación al campo de la Toxicología Forense, con el fin de resolver situaciones prácticas reales mediante el conocimiento aplicado de la Estadística.

Palabras clave:

Etanol; Fluidos biológicos; Análisis post-mortem; Regresión; Correlación; Ecuaciones estructurales.

Abstract

Blood samples are the gold standard in Toxicology to confirm precisely alcohol intake or intoxication in forensic cases, in order to establish the influence of this substance at the time of the death. However, there are cases where the corpse has little or no blood content, sampling is difficult, or contamination from other physiological compartments is suspected, so it is required to use an alternative biological fluid or tissue. In these circumstances, the forensic scientists face questions of scientific nature for the best biological sample selection for the chemical analysis and during the legal defense in the Justice System.

Based on the described situation, in this work a statistical study of *post-mortem* concentrations of ethanol in fluids (urine, vitreous humor, synovial fluid and bile) and tissues (liver, skeletal muscle and lung) were performed, in reference to the concentration of ethanol in blood from samples of unknown corpses received at the Mexico City Institute of Forensic Sciences (InCiFo). With the implementation of statistical techniques (methods agreement analysis, regression, correlation and structural equations), it was possible to assess and obtain meaningful and explanatory mathematical models to estimate blood alcohol content from the ethanol quantification of other fluids or tissues.

With this project, a contribution to the field of Forensic Toxicology was possible, in order to solve real practical situations through the applied knowledge of Statistics.

Keywords:

Ethanol; Biological fluids; Post-mortem analysis; Regression; Correlation; Structural equations.

Contenido	Página
Dedicatoria	3
Agradecimientos	4
Resumen.....	5
Abstract	6
Lista de figuras	8
Lista de tablas.....	11
Abreviaturas	12
1. Introducción.....	13
a. Etanol	13
i. Contexto social.....	13
ii. Contexto toxicológico.....	14
iii. Contexto forense.....	17
b. Modelos estadísticos y su aplicación en ciencias biológicas	17
2. Justificación e hipótesis	25
a. Objetivos	27
3. Materiales y métodos.....	27
a. Toma de muestra biológica	27
b. Análisis cuantitativo de etanol por HS-GC.....	28
c. Análisis estadístico	29
4. Resultados y discusiones.....	31
a. Estadísticas descriptivas y análisis exploratorio de los datos.....	31
b. Correlación y regresión de concentración de fluidos en muestras biológicas	36
c. Modelos estructurales (SEM)	63
5. Conclusiones y perspectivas	69
6. Referencias	71

Lista de figuras

Fig. 1. Estructura química del etanol.....	13
Fig. 2. Cinética de eliminación de etanol de tipo Michaelis-Menten.	16
Fig. 3. Relación lineal entre la $C_{m\acute{a}x}$ y la dosis de etanol administrada.	16
Fig. 4. Cromatógrafo de gases (GC).....	29
Fig. 5. Histogramas de frecuencias relativas de las variables peso [kg] (a) y edad [años] (b) de los sujetos incluidos en el análisis, con una gráfica de distribución normal sobrepuesta.	32
Fig. 6. Concentración de cada fluido o tejido cuantificado para este estudio +/- <i>s.d.</i>	33
Fig. 7. Diferencias de la concentración de cada fluido o tejido menos la concentración de etanol en sangre.....	34
Fig. 8. Cociente de las concentraciones de cada fluido o tejido entre la concentración de etanol en sangre.....	35
Fig. 9. Cocientes de concentraciones de etanol de diferentes tejidos con respecto a la alcoholemia reportada en referencias bibliográficas (Calabuig & Villanueva Cañadas, 2004) y en esta investigación.....	35
Fig. 10. Correlación de la concentración de alcohol en sangre [mg/100 mL] con el peso corporal del individuo [kg].....	37
Fig. 11. a) Gráfica de las diferencias de concentración de orina y sangre vs. promedio de ambas concentraciones. b) Gráfica de las diferencias de los logaritmos naturales de las concentración de orina y sangre vs. promedio de los Ln de ambas concentraciones.	39
Fig. 12. a) Gráfica de las diferencias de concentración de bilis y sangre vs. promedio de ambas concentraciones. b) Gráfica de las diferencias de los logaritmos naturales de las concentración de bilis y sangre vs. promedio de los Ln de ambas concentraciones.	40
Fig. 13. a) Gráfica de las diferencias de concentración de hígado y sangre vs. promedio de ambas concentraciones. b) Gráfica de las diferencias de los logaritmos naturales de las concentración de hígado y sangre vs. promedio de los Ln de ambas concentraciones.....	41
Fig. 14. a) Gráfica de las diferencias de concentración de pulmón y sangre vs. promedio de ambas concentraciones. b) Gráfica de las diferencias de los logaritmos naturales de las concentración de orina y sangre vs. promedio de los Ln de ambas concentraciones.	42

Fig. 15. a) Gráfica de las diferencias de concentración de músculo y sangre vs. promedio de ambas concentraciones. b) Gráfica de las diferencias de los logaritmos naturales de las concentración de músculo y sangre vs. promedio de los Ln de ambas concentraciones.	43
Fig. 16. a) Gráfica de las diferencias de concentración de humor vítreo y sangre vs. promedio de ambas concentraciones. b) Gráfica de las diferencias de los logaritmos naturales de las concentración de humor vítreo y sangre vs. promedio de los Ln de ambas concentraciones.....	44
Fig. 17. a) Gráfica de las diferencias de concentración de líquido sinovial y sangre vs. promedio de ambas concentraciones. b) Gráfica de las diferencias de los logaritmos naturales de las concentración de líquido sinovial y sangre vs. promedio de los Ln de ambas concentraciones...	45
Fig. 18. Gráfica de correlación mediante regresión lineal de las variables concentración de alcohol en orina [mg/100 mL] vs. concentración en sangre [mg/100 mL].....	47
Fig. 19. Gráfica de correlación mediante regresión lineal de las variables concentración de alcohol en bilis [mg/100 mL] vs. concentración en sangre [mg/100 mL].....	48
Fig. 20. Gráfica de correlación mediante regresión lineal de las variables concentración de alcohol en hígado [mg/100 g] vs. concentración en sangre [mg/100 mL].	48
Fig. 21. Gráfica de correlación mediante regresión lineal de las variables concentración de alcohol en pulmón [mg/100 g] vs. concentración en sangre [mg/100 mL].....	49
Fig. 22. Gráfica de correlación mediante regresión lineal de las variables concentración de alcohol en músculo-esquelético [mg/100 g] vs. concentración en sangre [mg/100 mL].....	49
Fig. 23. Gráfica de correlación mediante regresión lineal de las variables concentración de alcohol en humor vítreo [mg/100 mL] vs. concentración en sangre [mg/100 mL].....	50
Fig. 24. Gráfica de correlación mediante regresión lineal de las variables concentración de alcohol en líquido sinovial [mg/100 mL] vs. concentración en sangre [mg/100 mL].	50
Fig. 25. Análisis de residuales obtenidos de la regresión lineal simple de las variables concentración de alcohol en orina vs. concentración en sangre.	52
Fig. 26. Análisis de residuales obtenidos de la regresión lineal múltiple de las variables explicativas de concentración de etanol en sangre, humor vítreo e hígado vs. concentración de etanol en orina.	60

Fig. 27. Gráfica de correlación mediante regresión lineal de las variables concentración de alcohol en humor vítreo [mg/100 mL] vs. concentración en orina [mg/100 mL].62

Fig. 28. Diagrama de senderos para SEM con un escenario planteado sobre el impacto de las variables demográficas en la alcoholemia, y a su vez ésta impactando la concentración en orina y humor vítreo.....64

Fig. 29. Diagrama de senderos para SEM con un escenario planteado sobre el impacto de las variables demográficas y la alcoholemia en la concentración de etanol en orina, humor vítreo y líquido sinovial.66

Fig. 30. Diagrama de senderos para SEM con un escenario planteado sobre el impacto de las variables demográficas y la alcoholemia en una variable latente que explica la concentración de etanol en orina.68

Lista de tablas

Tabla 1. Relación del fluido o tejido con el número de observaciones colectadas	31
Tabla 2. Estadísticas descriptivas de las concentraciones de etanol en cada tejido o fluido muestreado	33
Tabla 3. Resumen de los coeficientes de regresión lineal y de correlación de las concentraciones de etanol en las muestras biológicas contra alcoholemia.....	51
Tabla 4. Resumen de los coeficientes de regresión del ajuste robusto de las concentraciones de etanol en las muestras biológicas contra alcoholemia.....	53

Abreviaturas

ADH	Alcohol deshidrogenasa
AIC	Criterio de Información de Akaike
ANCOVA	Análisis de Covarianza
ANOVA	Análisis de Varianza
$C_{m\acute{a}x}$	Concentración máxima
DW	Estadístico de Durbin-Watson
GABA	Ácido gamma-aminobutírico
GABA _A	Receptor de GABA tipo A
GC	Cromatografía de gases
HS-GC	Cromatografía de gases con <i>Headspace</i>
IC	Intervalo de Confianza
IIMAS	Instituto de Investigaciones en Matemáticas Aplicadas y Sistemas
InCiFo	Instituto de Ciencias Forenses
LCR	Líquido cefalorraquídeo
Ln	Logaritmo Natural
<i>log</i>	Logaritmo
m	Pendiente
MEOS	Sistema Microsomal Oxidante de Etanol
NMDA	N-metil-D-aspartato (NMDA)
<i>p-value</i>	Valor de probabilidad <i>p</i>
Q-Q	Cuantil-cuantil
RMSEA	Error Medio Cuadrático de Aproximación (<i>Root Mean Square Error of Approximation</i>)
RSDR	Desviación Estándar Robusta de los Residuales
<i>s.d.</i>	Desviación estándar
<i>s.e.</i>	Error estándar
SEM	Modelamiento de Ecuaciones Estructurales (<i>Structural Equation Modelling</i>)
SNC	Sistema Nervioso Central (SNC)
$t_{m\acute{a}x}$	Tiempo para alcanzar la concentración máxima

1. Introducción

a. Etanol

i. Contexto social

El alcohol etílico o etanol (*Figura 1*) es la sustancia de abuso más ampliamente usada y en prácticamente todas las culturas alrededor del mundo es la droga de abuso de mayor

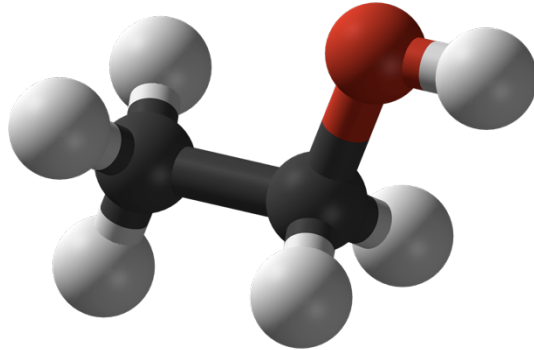


Fig. 1. Estructura química del etanol.

aceptación social (Kent, 2012). En México, es la sustancia que, por su consumo, dependencia y situaciones asociadas, genera la mayor problemática social (INPRFM, 2012).

Según estadísticas en nuestro país (Instituto Nacional de Salud Pública, 2012), de la población adulta (mayores a 20 años), el 53.9% refiere consumir alcohol, ya sea diariamente o de manera ocasional, siendo un 67.8% del total de la población

adulta masculina y el 41.3% de la población adulta femenina. Respecto a la población adolescente (10 a 19 años), 25% confirmaron consumo de alcohol, siendo 28.8% de hombres y 21.2% de mujeres. Adicionalmente, el alcohol es la droga más usada y ha sido con la que debutan en el consumo de sustancias en la región norcentral, nororiental, occidental, centro, centro sur, sur y en la Ciudad de México (INPRFM, 2012); siendo la marihuana la droga de inicio sólo en la región noroccidental (Baja California), seguida del alcohol y el tabaco. Asimismo, en las mismas regiones el alcohol es la primera droga de impacto por la cual han solicitado tratamiento contra la adicción.

Su uso crónico se asocia a múltiples problemas de salud, donde está implicado como un factor causal en más de 200 condiciones patológicas (World Health Organisation, 2014). Entre ellas, se enlistan múltiples condiciones neuropsiquiátricas, como ansiedad, depresión y ataques epilépticos; enfermedades gastrointestinales, como cirrosis hepática, pancreatitis aguda y crónica; cáncer, con relación en el desarrollo de la patología en boca, faringe, laringe, esófago, colon, recto, hígado, páncreas y mama; daños intencionales asociados al consumo de alcohol, como suicidio y violencia; daños no intencionales, como caídas y accidentes; efectos

cardiovasculares con consumos elevados, como enfermedad cardíaca isquémica, infartos, hipertensión, fibrilación atrial y hemorragias; complicaciones durante la gestación, como abortos y síndrome alcohólico fetal; y se ha encontrado una asociación entre los patrones de ingesta excesiva de alcohol con la exacerbación de los efectos de la diabetes *mellitus* y de otras enfermedades infecciosas, como neumonía o tuberculosis, por la depresión del sistema inmune de los bebedores. Con todo lo anterior, alrededor del mundo se cuentan 3.3 millones de personas que mueren cada año a causa del consumo de alcohol (World Health Organisation, 2014).

Sin embargo, en diversos estudios - y muchas veces de manera paradójica -, el consumo de alcohol ha sido identificado también como una sustancia benéfica y con efectos protectores cuando se consume en cantidades bajas y moderadas. Entre las bebidas alcohólicas con las bondades mejor estudiadas se encuentra el vino tinto, por sus propiedades protectoras metabólicas y cardiovasculares. Desafortunadamente, los patrones de consumo inciden directamente en los efectos que tiene el etanol sobre el organismo, siendo la ingesta episódica, más que el consumo crónico moderado, la más perjudicial para la salud, debido a que el 16% de los consumidores a nivel mundial suelen tener ingestas episódicas fuertes (World Health Organisation, 2014).

En México, el consumo de alcohol es la cuarta causa de muerte en todas las edades y estratos sociales por cualquiera de las razones de salud relacionadas con su ingesta, incluidos los accidentes de tránsito. En esta cuestión, se sabe que la primer causa de accidentes automovilísticos es la conducción de vehículos en estado de ebriedad, reportándose que el 11.6% de los jóvenes entre 15 y 29 años han tenido accidentes de tránsito en estas condiciones (CECA, 2012), siendo la primera causa de muerte entre ellos. Se estima que anualmente mueren 24 mil personas por algún tipo de accidente en el país, en una proporción de 3 hombres por cada mujer (CEVECE, 2012).

ii. Contexto toxicológico

El etanol es una sustancia psicoactiva con características que propician el desarrollo de dependencia (World Health Organisation, 2014), y cuyo efecto en el organismo es complejo,

demostrándose que interactúa con múltiples blancos moleculares biológicos (Hodgson, 2004). La toxicodinámica exacta de cada uno de estos blancos es aún poco conocida y es tema de múltiples investigaciones (Fernandez & Doty, 2015). Sin embargo, se sabe que el alcohol etílico ejerce su acción tóxica por mecanismos como la unión y estimulación del receptor del ácido gamma-aminobutírico (GABA) tipo A ($GABA_A$) en el Sistema Nervioso Central (SNC), lo cual causa efectos sedativos similares a los de las benzodiazepinas, además de ser inhibidor del receptor de N-metil-D-aspartato (NMDA) glutamato en el mismo sitio anatómico, teniendo efecto directo sobre el músculo cardiaco, tejido tiroideo y hepático (Harris, Trudell, & Mihic, 2008).

Respecto a la toxicocinética del etanol, se sabe que su absorción se lleva a cabo a través de la pared intestinal siguiendo un modelo de primer orden limitado por difusión; sin embargo, es poco común que el consumo de alcohol etílico se realice en un bolo instantáneo, por lo que el modelo se complica por los patrones de ingesta a tragos cortos distribuido a lo largo de minutos u horas. En este sentido, la administración de una bebida alcohólica se describe mejor como un modelo cinético de orden cero, con una tasa constante de consumo. Adicionalmente, el vaciado gástrico es una situación fisiológica importante de tomar en cuenta en el consumo de alcohol, ya que la absorción se lleva a cabo principalmente en el intestino delgado, el cual también es descrito con un modelo de primer orden. Es por eso que el consumo de alimentos retrasa la $t_{máx}$ y repercute en $C_{máx}$ y ABC menores. Este efecto también se puede modelar con un parámetro adicional/alternativo de tiempo de retardo (*lag-time*), el cual puede definirse como el tiempo de tránsito de la sustancia activa desde el sitio de ingesta vía oral hasta el sitio de absorción preferencial, en el intestino delgado, el cual ya incluye el tiempo de vaciado gástrico (Holford, 1987).

La biodisponibilidad del alcohol etílico es típicamente de alrededor del 80% para un consumo típico, aunque esta depende fuertemente de la dosis administrada de la molécula (Holford, 1987), así como del efecto de primer paso en el hígado, el cual depende a su vez del flujo sanguíneo hepático y el tiempo de tránsito del etanol en el órgano. Su eliminación está limitada por capacidad, debido a su metabolismo enzimático principalmente, ya que es saturable, concentración-dependiente, no lineal y sigue un modelo cinético de Michaelis-Menten (*Figura 2*), donde $V_{máx}$ es la capacidad máxima de eliminación y K_m la concentración de

etanol al 50% de $V_{máx}$. Por su forma hiperbólica cuadrada, a concentraciones altas de etanol, la tasa de eliminación de la droga es prácticamente constante, por lo que se considera una cinética de eliminación de orden cero (Gordon, 2015), ya que se sabe que las concentraciones de etanol en sangre típicas después de una ingesta moderada son más grandes que la K_m de la ADH (Holford, 1987).

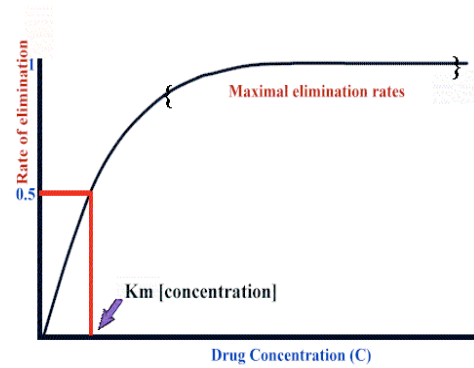


Fig. 2. Cinética de eliminación de etanol de tipo Michaelis-Menten.

Su distribución por todo el cuerpo es explicado por un modelo de dos compartimentos, pasando extensivamente de la sangre hacia los tejidos, ya que no presenta unión a proteínas plasmáticas, como se ha confirmado en diversos estudios por la medición de la sustancia en líquido cefalorraquídeo (LCR), cuyo coeficiente de partición suero/LCR es aproximadamente 0.9. Su tiempo en alcanzar la concentración máxima ($t_{máx}$) es de entre 0.33 y 1 h, ya que el $t_{máx}$ tiende a incrementar con la dosis administrada (Holford, 1987; Wilkinson, 1980). Dependiendo de la dosis, la $C_{máx}$ es directamente proporcional, y se puede calcular como $C_{máx} [mg/L] = 20 \times \text{dosis} [g/70kg]$ (Figura 3) (Holford, 1987).

El metabolismo ocurre principalmente en los hepatocitos, mediante sistemas enzimáticos bien descritos y conocidos, que son la enzima alcohol deshidrogenasa (ADH), la catalasa y el sistema microsomal oxidante de etanol (MEOS). Mediante la ADH, más del 95% del

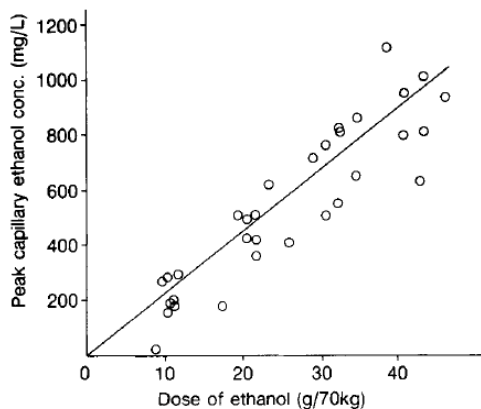


Fig. 3. Relación lineal entre la $C_{máx}$ y la dosis de etanol administrada.

etanol consumido se oxida a acetaldehído, el que a su vez se metaboliza a ácido acético por la aldehído deshidrogenasa (Helander, Bottcher, Fehr, Dahmen, & Beck, 2009). Se ha estimado una vida media de entre 4 y 4.5 h después de una sobredosis de etanol, con lo que se calcula un aclaramiento de entre 5.5 y 6 L/h/70 kg. Sobre la influencia genética del metabolismo y la eliminación del etanol, a pesar de existir resultados contrastantes, esta aporta hasta un 46% de variabilidad (Holford, 1987).

La eliminación se efectúa por orina, aliento y sudor, detectándose en estos fluidos tanto la sustancia original como los productos de su metabolismo. Entre estos metabolitos, uno de los de mayor interés es el metabolito conjugado etil glucurónico (EtG) (Thermo-Scientific, 2012). Menos del 0.1% del etanol consumido se conjuga con el ácido glucurónico, mediante una reacción enzimática del metabolismo tipo II, para generar este metabolito (Helander et al., 2009). El alcohol puede detectarse por varias horas en orina después del consumo, sin embargo el EtG puede detectarse hasta algunos días posteriores. Por otro lado, se sabe que en el sudor, cuando se encuentran en equilibrio el sistema, la concentración de etanol es similar a la de la sangre (Holford, 1987).

iii. Contexto forense

En 2009, según datos de 20 entidades federativas de México de la Encuesta Nacional de Adicciones del 2011 (INPRFM, 2012), se reportaron 18,724 defunciones remitidas a los Servicios Médicos Forenses (SEMEFO), donde el 24.4% del total ocurrieron bajo la influencia de alguna droga de abuso. De estas, en el 92.1% de los casos los involucrados fueron del sexo masculino. Las causas más comunes de defunción fueron ocasionadas por arma de fuego (33.3%), accidentes de tránsito (17.2%) y asfixia (10.22%), ocurriendo tanto en la calle (50.4%) como en el hogar (22.4%).

De manera convencional, el análisis de los niveles de alcohol etílico en sangre es usado como evidencia criminal y para juicios civiles. La toxicología forense en este sentido ha aportado estudios donde se relaciona el nivel de alcoholemia con la cantidad de etanol ingerida antes de la muerte. Con esto, los sistemas de justicia a nivel mundial, incluido el de México, han considerado como una referencia el análisis de etanol en sangre por la facilidad de la toma de muestra en cadáveres, la certeza de no tener contaminación cruzada de otro compartimento biológico durante la toma de muestra y su extenso estudio en relación con su toxicología.

b. Modelos estadísticos y su aplicación en ciencias biológicas

El análisis de regresión simple es una técnica estadística para establecer modelos con fines predictivos entre dos variables, es decir, para inferir causalidad de una variable independiente

en una dependiente. Para ello, se debe definir una ecuación que relacione linealmente ambas variables, ya que la ecuación es aditiva, con la siguiente forma:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X + \varepsilon$$

donde:

Y : Variable dependiente o de respuesta

X : Variable independiente

β_0 y β_1 : Coeficientes del modelo

$\varepsilon = Y_i - \hat{Y}_i$ = Error del modelo poblacional, que en la muestra se define como residual r

En términos estadísticos, el análisis de regresión es una técnica multivariada, cuyo objetivo es desarrollar un modelo matemático lineal, que describa la relación entre una variable a pronosticar con variables independientes explicativas. Dicho modelo aditivo es el siguiente (de la Garza Garcia, Morales Serrano, & González Cavazos, 2013):

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \dots + \beta_k X_k + \varepsilon$$

donde:

Y : Variable dependiente o de respuesta

X_i : Variable independiente i o explicatoria

β_i : Coeficiente del modelo para cada X_i

ε : Error aleatorio

Los estimadores puntuales de los coeficientes de regresión β se calculan por el método de mínimos cuadrados ordinarios de manera matricial a través de la siguiente expresión:

$$\hat{\beta} = (X^T X)^{-1} (X^T Y)$$

que surge a partir de la expresión de minimización de errores, o residuales, hecha en forma matricial para regresión múltiple:

$$\min(\varepsilon) = \min (Y - \hat{Y})$$

Respecto a la evaluación de la colinealidad, que es cuando dos variables independientes se relacionan entre sí, linealmente o no, es posible analizar la correlación de estas mediante el coeficiente de correlación R , también llamado de Pearson para un ejemplo bivariado. Este coeficiente mide la fuerza de asociación de dos variables, que en términos porcentuales indica qué tan relacionadas están ambas variables linealmente. Se define, en términos de las varianzas y covarianzas, como sigue:

$$R_{X_A, X_B} = \frac{\sum_{i=1}^n X_{Ai} X_{Bi} - n \bar{X}_A \bar{X}_B}{\sqrt{\sum_{i=1}^n X_{Ai}^2 - n \bar{X}_A^2} \sqrt{\sum_{i=1}^n X_{Bi}^2 - n \bar{X}_B^2}}$$

R puede tomar valores de $[-1,1]$ y del análisis se obtiene que valores cercanos a 1 o -1 indican respectivamente relación directa o inversa, mientras que valores cercanos a 0 significan que las variables no tienen una asociación lineal (de la Garza Garcia et al., 2013).

Adicionalmente, el coeficiente de determinación R^2 mide la asociación en términos de la variabilidad de la variable dependiente y el porcentaje de ésta que es explicada por las variables independientes del modelo. Su fórmula es:

$$R^2 = 1 - \frac{SSE}{SST} = \frac{SSR}{SST}$$

donde:

SSE = Variación no explicada por la ecuación de regresión

SSR = Variación explicada por la ecuación de regresión

SST = Variación total

R^2 puede tomar valores entre $[0,1]$ y del análisis se obtiene que valores cercanos a 1 indican que prácticamente toda la variabilidad se explica por el modelo (de la Garza Garcia et al., 2013), mientras que valores cercanos a 0 significan que variabilidad de la variable dependiente no se describe por las independientes.

A partir de R^2 es posible el cálculo del coeficiente de correlación múltiple $R_{Y|X_1, X_2, \dots, X_k}$, el cual se aplica con el mismo significado e interpretación que el coeficiente de correlación de Pearson R , descrito previamente, pero para un modelo de regresión múltiple con más de dos variables:

$$R_{Y|X_1, X_2, \dots, X_k} = \sqrt{R^2}$$

Existen posteriores ajustes al coeficiente de determinación que penalizan el número de grados de libertad del sistema, para poder evaluar dos modelos diferentes con distinto número de variables y observaciones. Dicha corrección se aplica como sigue:

$$R_{Adj}^2 = \bar{R}^2 = 1 - \left[(1 - R^2) \frac{n - 1}{n - p} \right] = 1 - \frac{\frac{SSE}{n - p}}{\frac{SST}{n - 1}} = \left[R^2 - \frac{k}{n - 1} \right] \left[\frac{n - 1}{n - p} \right]$$

donde:

R^2 = Coeficiente de determinación

n = Número de datos

$p = k + 1$ = Número de parámetros en el análisis

k = Número de variables independientes

R_{Adj}^2 sólo puede ser menor o igual a R^2 y no necesariamente tiene el mismo significado que R^2 , ya que este parámetro se corrige por el número de variables y observaciones integradas al modelo. Es por eso que este coeficiente es ampliamente utilizado para la selección de modelos con número desigual de observaciones y/o variables.

En términos de la estadística aplicada en las ciencias naturales, el análisis de regresión es una herramienta esencial para el análisis de información biológica, especialmente la regresión no lineal, siempre y cuando se tenga la certeza de que el ajuste de los datos a un modelo de este tipo es adecuado para la interpretación biológica de los parámetros a partir de la información. Sin embargo, existen ciertos ajustes que linealizan los datos experimentales; no obstante, estos modelos se deben usar con precaución, ya que los supuestos de un modelo de regresión lineal se pueden violar y se tiende a distorsionar el error experimental (Motulsky & Christopoulos, 2003).

Dentro de estas transformaciones conocidas comúnmente aplicadas para datos obtenidos de mediciones biológicas o químicas, el suavizamiento de las curvas no se recomienda, pues no hace los parámetros estimados más precisos, si no que reduce la dispersión y el error, haciendo al intervalo y al error estándar incorrectos (Motulsky & Christopoulos, 2003). Por otro lado, la multiplicación de la variable dependiente Y por una constante es permitida y correcta, con el fin de convertir las unidades a valores más convenientes. Con este cálculo no se modifica el ajuste, el error o los intervalos, simplemente transformará los datos para facilitar su lectura e interpretación.

Adicionalmente, se han realizado estudios estadísticos para establecer comparaciones con diferentes métodos de medición, con el fin de establecer concordancia entre los valores obtenidos por los distintos medios. Para esto, los ajustes logarítmicos usados para variables clínicas son útiles, así como los acercamientos generales de regresión, los cuales pueden ser corroborados gráficamente (Bland & Altman, 1999). Estos errores inter-método son problemas latentes en cualquier ciencia, para lo cual se puede cuantificar su sesgo (*bias*), que se representa por una diferencia aritmética entre ambos métodos, lo cual demostrará una tendencia consistente de un método por exceder el otro en cierto intervalo.

Para este efecto, en el ámbito médico-clínico se ha establecido el intervalo de confianza al 95% como el estándar de oro para aceptar una diferencia entre mediciones, considerando que en este intervalo se encontrarán la mayoría de las diferencias entre las mediciones de ambos métodos. Si se parte del supuesto de normalidad de los datos, es entonces que se espera que el 95% de las observaciones caerán dentro del $\pm 1.96s_d$ (Bland & Altman, 1999). Es

entonces donde experimentalmente se convierte en un factor indispensable el análisis del sesgo, la variabilidad, el intervalo de medición y la distribución de los datos y sus métodos de medición para considerar este posible factor de error adicional, ya que es posible que, en caso de un sesgo consistente, simplemente se ajuste este error restando el promedio de la diferencia de ambos valores cuantificados.

Por otro lado, el modelamiento por ecuaciones estructurales (*SEM* por sus siglas en inglés, *Structural Equation Modelling*) es una técnica estadística multivariada usada ampliamente en investigación médico-biológica, especialmente en ciencias del comportamiento y psicología. Esta técnica se considera una combinación de análisis factorial con métodos de regresión, que permiten un análisis tanto confirmatorio como exploratorio de los datos. El interés en estos modelos de ecuaciones estructurales se basa en constructos teóricos, representados por factores latentes, cuya relación se encuentra descrita por coeficientes de regresión o de senderos (*path analysis*) entre factores (Hox & Bechger, 2007).

Los modelos de ecuaciones estructurales implican una estructura de covarianzas entre variables observadas con la construcción de las variables o factores latentes, los cuales no son medidos directamente, pero son estimados a partir de las covarianzas de las variables cuantificadas, asumiendo causalidad entre factores. Es por eso que múltiples procedimientos multivariados como el análisis factorial, de discriminantes, de senderos, correlación canónica y la regresión lineal son casos especiales del SEM.

Las ecuaciones estructurales a menudo se pueden representar como diagramas gráficos, o senderos, los cuales son traducidos a ecuaciones en forma matricial. Según el planteamiento original del análisis de senderos por el genetista Sewall Wright, en 1921, las variables medidas u observadas son representadas por rectángulos, mientras que las variables latentes o no medidas son representadas por círculos. Todas ellas se interconectan por flechas, donde las flechas unidireccionales indican que la variable de la cola causa la de la cabeza, mientras que las flechas de dos direcciones indican covarianza o correlación, sin una interpretación causal clara (Hox & Bechger, 2007). Es por eso que las flechas de una cabeza representan estadísticamente un coeficiente de regresión, o carga del factor si es que la flecha va de un factor latente a una

variable, mientras que las de dos cabezas indican una covarianza. Como parte del modelo, no se asume que los factores latentes explican completamente la variación de los datos, por lo que cada variable observada está asociada a un término de error residual, que no es medido y que se representa por un círculo también.

Las ecuaciones anteriormente descritas se resuelven para ajustar el modelo planteado, mediante el modelo clásico en Estadística: “Datos = Modelo + Error”, con el fin de estimar los parámetros. Dicha estimación en los modelos por ecuaciones estructurales se realiza habitualmente mediante los estimadores por máxima verosimilitud (*Maximum Likelihood, ML*), que asume datos multivariados distribuidos normalmente con un tamaño de muestra suficiente.

El modelamiento estadístico para SEM, como se ha comentado anteriormente, parte de los modelos de regresión, empleándose específicamente el método de Bentler-Weeks, el cual es diferente de los otros modelos en que permite la posibilidad de tener variables latentes como variables dependientes y predictores, así como la posibilidad de que variables dependientes sean predictores de otras variables dependientes. En este método, cada variable del modelo, ya sea latente o medida, es una variable dependiente o independiente. Los parámetros a estimar son los coeficiente de la regresión, y las varianzas y covarianzas de las variables independientes. Expresado en forma matricial, el modelo de Bentler-Weeks se describe como: (Ullman, 2006)

$$\eta = \beta\eta + \gamma\xi$$

donde:

q es el número de variables dependientes

r es el número de variables independientes

η es un vector $q \times 1$ de variables dependientes

β es una matriz $q \times q$ de coeficientes de regresión entre variables dependientes

γ es una matriz $q \times r$ de coeficientes de regresión entre variables dependientes e independientes

ξ es un vector $r \times 1$ de variables independientes

Por lo general, las técnicas de SEM buscan responder tres aspectos básicos de la investigación: si el modelo es adecuado, la significancia de los parámetros estadísticos, y la comparación de modelos anidados (Ullman, 2006). Respecto al primer punto, lo que se mide es si el modelo produce una matriz de covarianzas que es consistente con la matriz de la muestra observada. En el aspecto de la significancia de los parámetros estadísticos, estos son generados bajo el supuesto implícito de que el ajuste del modelo es bueno, por lo que se tiene que analizar primeramente el ajuste. Finalmente, el análisis de sub-modelos es posible por SEM, por lo que se pueden probar hipótesis diferentes a partir de sub-grupos de datos alimentados al modelo ajustado.

Respecto al ajuste de los datos en SEM, hay diversas medidas para cuantificar la bondad del ajuste de los modelos de ecuaciones estructurales, las cuales también cuantifican y dan preferencia a la simplicidad del modelo, y no sólo miden el grado de ajuste del modelo a los datos provistos. Dichos índices de bondad de ajuste se basan o están en función de la prueba estadística χ^2 , con una segunda función que penaliza la complejidad del modelo. De manera habitual, si el *p-value* para la prueba χ^2 del modelo resulta mayor a 0.05, el modelo es aceptado. Sin embargo, la χ^2 depende fuertemente del tamaño de muestra empleado y de la distribución de los datos, la cual se ha disminuido en los índices empleados para el SEM (Hox & Bechger, 2007). Entre estos índices se destacan el Criterio de Información de Akaike (AIC) y el Error Medio Cuadrático de Aproximación (RMSEA, por las siglas en inglés para *Root Mean Square Error of Approximation*), el cual suele ser pequeño si la estimación es buena, habitualmente menor a 0.05.

Si la aproximación del modelo no es buena, se puede recurrir al cálculo e interpretación de índices de modificación, como la prueba de multiplicadores de Lagrange. Esta prueba para cada factor indica el mínimo valor en el que se reducirá la prueba estadística de χ^2 si el factor es eliminado, lo cual se puede emplear para mejorar el modelo de manera secuencial y disminuir los grados de libertad para los modelos. Adicionalmente, se pueden evaluar el error del modelo mediante la interpretación del error estándar. El cociente del estimador entre el error estándar es llamado cociente crítico (*critical ratio, C.R.*), el cual es denominado prueba de Wald en SEM. Con esta prueba, las cargas de cada factor son consideradas significativas cuando toma valores

mayores a +1.96 o menores a -1,96, por el 5% de significancia en una prueba doble unilateral para datos distribuidos normalmente (Hox & Bechger, 2007).

2. Justificación e hipótesis

Como ya se ha comentado previamente, la muestra hemática es el estándar por excelencia para determinar con precisión el contenido alcohólico en casos forenses para establecer influencia de esta sustancia al momento de la muerte (Pounder & Paul, 1998). Sin embargo, hay ciertos casos donde el cadáver tiene escaso o nulo líquido sanguíneo o su toma de muestra es complicada, por lo que es necesario recurrir a un fluido o tejido alternativo. Es en estas situaciones donde el profesional de las ciencias forenses se enfrenta a diversos cuestionamientos durante el proceso y al momento de defender el dictamen.

Entre los diversos fluidos biológicos posibles para toma de muestra forense se encuentran el contenido estomacal y la orina. Sin embargo, estos fluidos presentan ciertas desventajas por múltiples interferencias y una posible sobre-estimación de la concentración de etanol por fermentación alcohólica en caso de haber microorganismos en las vías urinarias; por glucosuria en caso de personas con diabetes (Alexander, 1998); por la fermentación de los alimentos en el estómago en contacto con la flora gastrointestinal; o por el tiempo transcurrido entre el último consumo de la bebida alcohólica y la muerte (Pounder & Paul, 1998).

Adicionalmente, la concentración en orina no es un indicador confiable de la concentración de etanol en sangre (Robertson, 2005). Para establecer una relación exacta de la concentración de etanol en orina con la de sangre es indispensable conocer el tiempo transcurrido entre el último consumo de alcohol y la muerte, así como el patrón de consumo de la bebida alcohólica, entre otros factores fisiológicos, como la depuración renal, retención de orina o vaciamiento previo de la vejiga (Papierz, Berent, Markuszewski, & Szram, 2004). Sin embargo, como parte de las desventajas en el análisis de casos forenses, esta información es escasa, imprecisa o no se puede obtener, por lo cual se vuelve necesario recurrir a estimadores de contenido etílico en sangre a través de modelos predictivos.

Respecto a concentraciones de etanol en múltiples tejidos (riñón y músculo), se ha demostrado que, en casos de muerte accidental con trauma severo, una cantidad considerable

de este compuesto es producido por contaminación bacteriana, principalmente por *Candida albicans* (Johnson, Lewis, Angier, & Vu, 2004), lo cual convierte a este tipo de muestras en indicadores toxicológicos imprecisos para casos legales, ya que se requieren métodos adicionales de preservación de la muestra para detener la descomposición microbiana. Sin embargo, existen algunos otros fluidos estudiados para aspectos toxicológicos que podrían representar una buena alternativa para la toma de muestra y análisis de concentración de etanol para situaciones legales y forenses, como el humor vítreo en ojos o el líquido sinovial de las rodillas (Alvarado Guevara, Raudales García, & Vega Ramirez, 2008), los cuales tienen poca posibilidad de contaminación cruzada con otros compartimentos y ante la muerte, preservan de manera fidedigna el estado alcohólico del individuo previo al deceso.

En el presente trabajo, para la cuantificación de las relaciones entre concentraciones de etanol en distintos tejidos o fluidos, se han estudiado distintos ajustes y modelos estadísticos (Bland & Altman, 1999; Hox & Bechger, 2007; Motulsky & Christopoulos, 2003) para establecer la concordancia entre las mediciones realizadas. Esto se realizó con el fin de estudiar y poder proponer muestras biológicas para una cuantificación certera de etanol alternativa a la muestra hemática tradicional y de primera elección en casos de índole forense. Lo anterior se deriva de las preguntas metodológicas de investigación de este trabajo sobre si ¿será posible establecer una relación de concentraciones de etanol entre fluidos y tejidos? ¿Podremos sustituir con confianza estadística la muestra hemática en caso de escasez o contaminación por algún otro tejido o fluido?

La relevancia del presente trabajo es que a pesar de que hay múltiples estudios donde se reporta y analiza la concentración de etanol en sangre, fluidos o distintos tejidos (Cox, Sadler, & Pounder, 1997; Ferrari, 2008; Johnson et al., 2004; Robertson, 2005), incluyendo múltiples sitios de muestreo de un mismo fluido (De Martinis, de Paula, Braga, Moreira, & Martin, 2006; Özgür Can, Özkara, Salaçin, & Gümüştekin, 2012) y estimaciones de la variabilidad del sitio de muestra hemática (Sylvester, Wong, Warren, & Ranson, 1998), en pocos estudios se reporta una correlación con rigor estadístico y un análisis exhaustivo del contenido alcohólico en diversos fluidos y tejidos, con referencia al contenido de etanol en sangre empleado de manera estándar

para la determinación de intoxicaciones. Asimismo, existen escasos estudios en México sobre el tema tan relevante de la toxicocinética del alcohol etílico, el cual ya se ha justificado que tiene una relevancia más allá de científica y toxicológica, si no social, forense y legal también, por lo que es relevante la contribución al conocimiento mediante este estudio.

a. Objetivos

El objetivo general del presente proyecto es realizar un análisis estadístico observacional comparativo de la concentración de alcohol etílico en diferentes tejidos y fluidos biológicos en cadáveres.

Los objetivos específicos del proyecto son:

1. Analizar las concentraciones de etanol por HS-GC en diferentes fluidos y tejidos biológicos de cadáveres con presencia de etanol.
2. Determinar la correlación de la concentración de etanol en sangre con los diferentes fluidos y tejidos biológicos post-mortem.
3. Establecer las bases para sugerir un modelo de varios componentes o una muestra alternativa a la sangre, en ausencia de ésta, para la determinación de intoxicación alcohólica.

3. Materiales y métodos

a. Toma de muestra biológica

El material biológico de estudio fue colectado de cadáveres desconocidos recibidos en el Instituto de Ciencias Forenses (InCiFo), instancia gubernamental dependiente del Tribunal Superior de Justicia del Distrito Federal (Poder Judicial del D.F.). Las muestras de fluidos y tejidos fueron tomadas por técnicos especializados en el anfiteatro del InCiFo durante el procedimiento de necropsia médico-legal requerida por la ley, bajo las más estrictas condiciones éticas y de respeto al individuo. Asimismo, en todo momento se guardó la

confidencialidad de los datos obtenidos de los expedientes de cada sujeto incluido en la presente investigación.

Las muestras *post-mortem* fueron colectadas de individuos no identificados con sospecha de alcoholemia. Los fluidos biológicos muestreados fueron orina, sangre, humor vítreo, líquido sinovial y/o bilis, dependiendo de la presencia del material o de la posibilidad de toma de muestra, obtenidos mediante aspiración directa con jeringa desechable y se colocaron en tubos plásticos limpios para el traslado al laboratorio en condiciones de refrigeración para su posterior análisis químico. A pesar de que existen diversos sitios anatómicos de donde se puede obtener una muestra hemática, como la vena femoral, cava, subclavia, axilar, entre otras (De Martinis et al., 2006; Özgür Can et al., 2012), en apego a los procedimientos del instituto y según la necropsia de ley, la muestra de sangre se tomó de la calota una vez realizada la apertura del cráneo, por considerarse ésta la sangre con menor probabilidad de contaminación cruzada por otros tejidos y compartimentos corporales, como el estómago, intestino, hígado o vejiga, los cuales pueden tener una incidencia directa significativa sobre las concentraciones cuantificadas de etanol. La orina fue colectada mediante punción directa en la vejiga. El humor vítreo fue obtenido por punción directa y aspiración en el globo ocular. El líquido sinovial se obtuvo por punción directa y aspiración en la zona media justo bajo la rótula, obteniendo alrededor de 0.5 mL de líquido aproximadamente (Winek, Bauer, Wahba, & Collom, 1993).

Respecto a los tejidos colectados, estos consistieron en hígado, encéfalo, músculo esquelético, pulmón, lengua y páncreas, dependiendo de la presencia del material o de la posibilidad de toma de muestra, de los cuales fue seccionada directamente del cadáver con escalpelo una superficie de 1 cm³ aproximadamente y estos fueron colocados en tubos plásticos limpios para el traslado al laboratorio en condiciones de refrigeración para su posterior análisis químico.

b. Análisis cuantitativo de etanol por HS-GC

De los fluidos colectados, se colocó 1 mL en viales para *headspace* (HS) de 20 mL sellados con sello de goma. Respecto a los tejidos, se colocó 1 cm³ en viales para HS de 20 mL sellados, lo que correspondió aproximadamente a 1 g de cada uno de los materiales biológicos sólidos.

Se analizó el contenido de etanol mediante cromatografía de gases con la técnica de *headspace* (HS). Dicha cuantificación se realizó en un cromatógrafo de gases *Perkin Elmer Clarus 580* en el Laboratorio de Química Forense de la Procuraduría General de Justicia del Distrito Federal (PGJDF) (*Figura 4*), con un método previamente validado para el análisis de elementos volátiles alcohólicos en muestras biológicas.



Fig. 4. Cromatógrafo de gases (GC)

El método consiste en el calentamiento de la muestra biológica, contenida en un vial sellado, a 50°C en el dispositivo acoplado HS, para volatilizar los componentes con bajo punto de ebullición (Tiscione, Alford, Yeatman, & Shan, 2011). 100 µL del vapor obtenido del vial se inyectan en un puerto del GC a 180°C, el cual se analiza en una columna capilar ELITE 5 de 30 m, con un flujo de 12.9 mL/min de N₂ como gas de arrastre. El programa del horno, en una corrida de 4 min de duración total, consta de una temperatura inicial de 60°C por 2 min, posteriormente una rampa de temperatura de 30°C/min hasta los 90°C, la cual se mantiene por 1 min. La detección se lleva a cabo mediante ionización a la flama (FID) a 200°C. Se usó como estándar interno etanol grado reactivo, el cual se adicionó directamente a la muestra al ponerla en el vial del HS.

c. Análisis estadístico

El análisis realizado se basó en un estudio observacional, donde los datos de los sujetos ingresados sólo fueron seleccionados basados en la alcoholemia positiva, y no por algún otro criterio de inclusión/exclusión, por lo que no se controlaron las variables demográficas de los sujetos tomados en cuenta para el análisis de su concentración etílica en los fluidos o tejidos biológicos.

La captura de los datos, el análisis estadístico descriptivo, los gráficos de barras y de regresión fueron realizados en el software Microsoft® Excel para Mac, versión 15.23 (Microsoft, 2016). Los análisis de regresión múltiple y el cálculo de intervalos de confianza para los

parámetros de la regresión fueron ejecutados en el programa GraphPad® Prism versión 7.0 para Mac (GraphPad® Software, La Jolla California USA). El modelamiento por ecuaciones estructurales fue realizado en el programa estadístico especializado EQS, Versión 6.1 (Multivariate Software®, Inc. Copyright P.M. Bentler, 1985 – 2006).

Para evaluar los modelos de regresión y determinar su utilidad, se analizaron los siguientes parámetros (de la Garza Garcia et al., 2013), la mayoría de los cuales fueron descritos en la sección 1.b del presente trabajo:

- Coeficiente de determinación (R^2)
- Coeficiente de determinación ajustado o corregido (R^2_{Adj})
- Coeficiente de correlación (R)
- Coeficiente de correlación múltiple ($R_{Y|X_1, X_2, \dots, X_k}$)
- Error estándar del estimado (S_E)
- Varianza de los residuales (S^2_E)
- Estadístico de Durbin-Watson (DW), el cual cuantifica la auto-correlación entre las variables, por lo tanto implica que sus residuos en un periodo específico están relacionados con los residuos en otro periodo, es decir, la correlación de los errores en el tiempo. Su estadístico de prueba está definido como:

$$DW_c = \frac{\sum_{t=2}^n (\varepsilon_t - \varepsilon_{t-1})^2}{\sum_{t=1}^n (\varepsilon_t)^2}$$

donde:

ε_t = Error organizado cronológicamente en el tiempo t

ε_{t-1} = Error ordenado cronológicamente en el tiempo $t-1$

El valor del estadístico oscila entre 0 y 4, donde un valor cercano a 0 indica que existe una auto-correlación positiva, mientras que un valor cercano a 4 indica auto-correlación negativa entre las variables. Un valor cercano a 2 (habitualmente $1.5 < DW < 2.5$) implica que la hipótesis nula no fue rechazada, por lo que no existe auto-correlación (de la Garza Garcia et al., 2013), y por lo tanto se confirma la independencia de la variable aleatoria “residuos” para los datos analizados.

Por otra parte, el ajuste robusto (*Robust fit*) en los modelos de regresión, realizado con el programa estadístico GraphPad® Prism versión 7.0, consta en un modelo de regresión que deja fuera del análisis a los valores extremos, ya que asume que la distribución de residuales sigue una distribución normal o Gaussiana y elimina los valores que salen de esta o la influyen (Motulsky & Christopoulos, 2003). Posterior a la identificación y exclusión de estos valores, los cuales se contabilizan en los resultados, se procede a efectuar la suma de mínimos cuadrados para establecer la regresión de los datos alimentados.

4. Resultados y discusiones

a. Estadísticas descriptivas y análisis exploratorio de los datos

Se tomaron muestras biológicas, fluidos y tejidos *post-mortem* de 67 cadáveres desconocidos, 63 masculinos y 4 femeninos, los cuales fueron seleccionados por presentar alcoholemia positiva. Se registraron las variables demográficas de peso y edad, donde los promedios (\pm s.e.) de los occisos incluidos en el análisis estadístico fueron de 82.5 ± 2.2 kg y 35 ± 2 años. Las frecuencias relativas se muestran en la *figura 5*.

De cada muestra biológica obtenida de los cadáveres, dependiendo de la presencia del material o de la posibilidad de toma de muestra, se resumen los conteos totales de observaciones por fluido y tejido muestreado en la tabla 1.

Tabla 1. Relación del fluido o tejido con el número de observaciones colectadas

	Muestra biológica (Fluido o tejido)	Conteo (n)
1	Sangre	67
2	Orina	52
3	Humor	66
4	Hígado	66
5	Cerebro	40
6	Pulmón	35
7	Sinovial	26
8	Músculo	27
9	Lengua	22

10	Bilis	14
11	Páncreas	13
12	Tejido Adiposo	1
13	Corazón	1

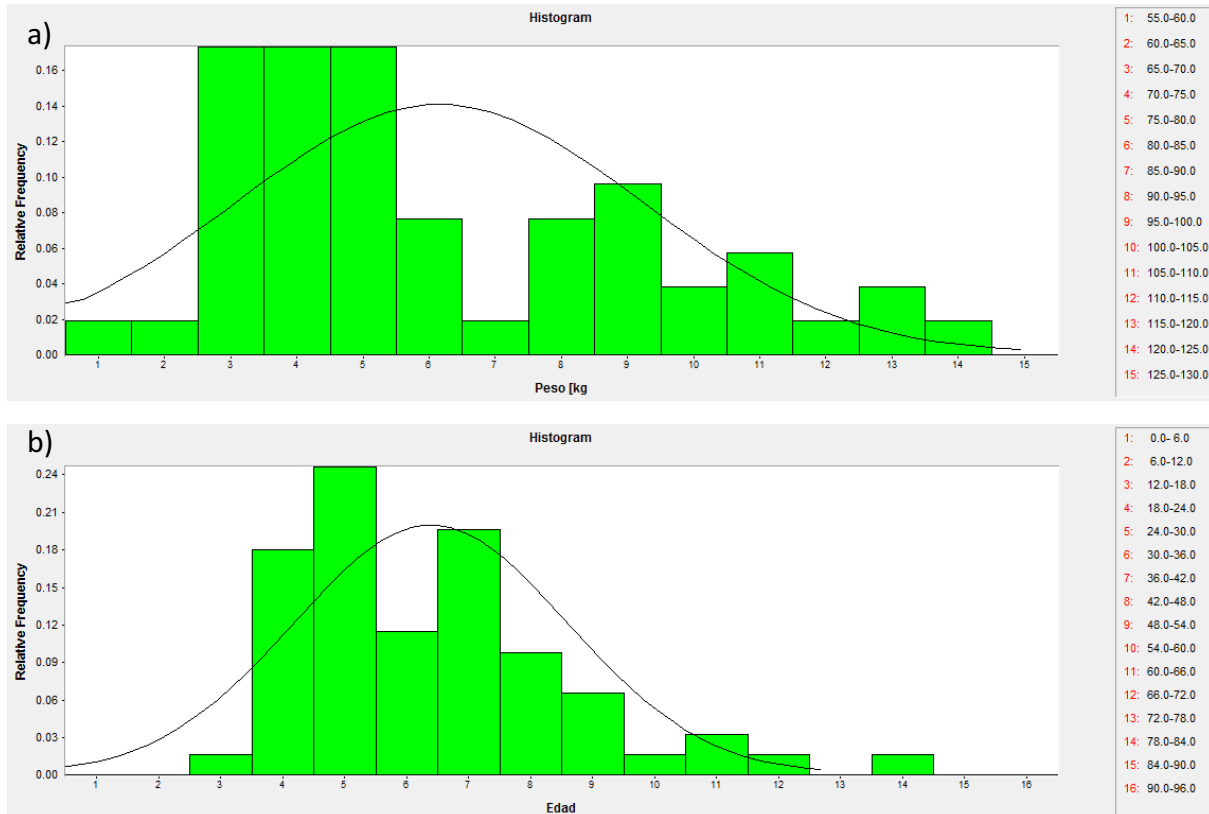


Fig. 5. Histogramas de frecuencias relativas de las variables peso [kg] (a) y edad [años] (b) de los sujetos incluidos en el análisis, con una gráfica de distribución normal sobrepuesta.

Dependiendo de la cantidad de observaciones obtenidas por fluido y tejido fue posible hacer los análisis estadísticos subsecuentes, siendo los datos más completos los de los fluidos sangre, orina y humor vítreo, y de los tejidos el hepático, seguido por cerebro y pulmón. En la *figura 6* se presenta un resumen de las concentraciones de cada fluido o tejido cuantificado para este estudio con más de dos observaciones. Dicha gráfica es de utilidad para los aspectos descriptivos y exploratorios preliminares, como para confirmar la variabilidad calculada y reportada en la *tabla 2*. A partir de estos datos, por ejemplo, son destacables los altos coeficientes de variación para las concentraciones de los tejidos Hígado y Páncreas.

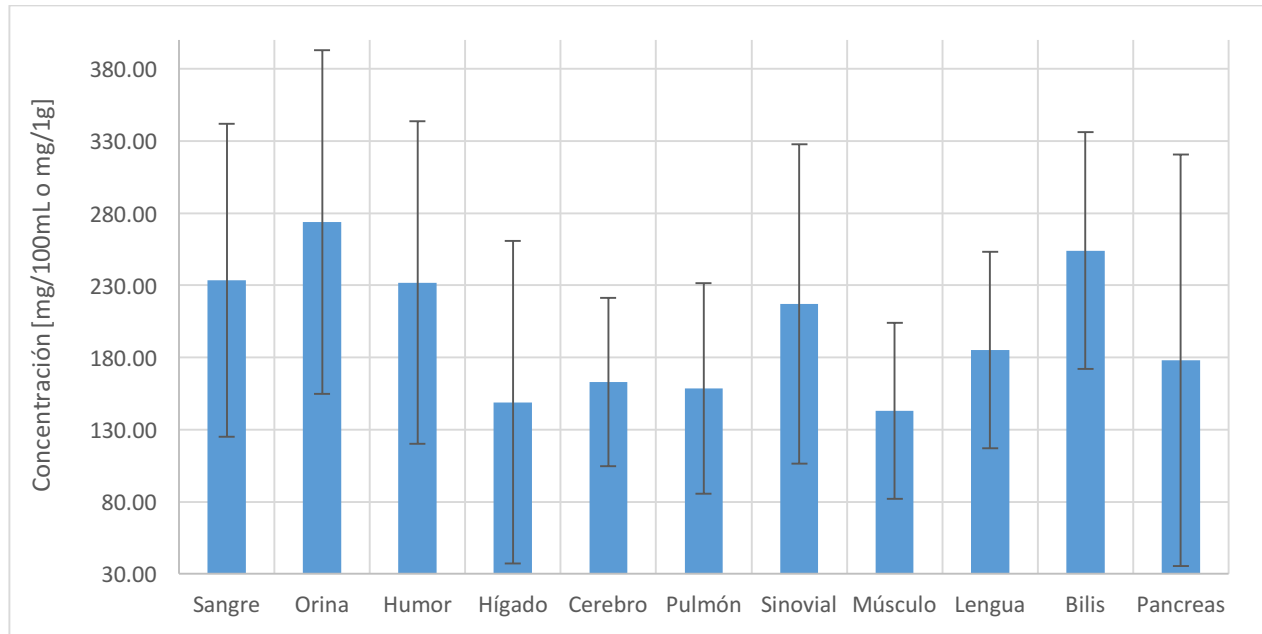


Fig. 6. Concentración de cada fluido o tejido cuantificado para este estudio +/- *s.d.*

Se hicieron los análisis estadísticos y de correlación con los tejidos o fluidos que contaban con al menos dos observaciones, por lo que con los datos de tejido adiposo y corazón no se realizó ningún análisis posterior, ya que sólo se logró recabar una medición de estos tejidos. A continuación se resumen las estadísticas descriptivas de las concentraciones de etanol en cada tejido o fluido muestreado. Con fines de estandarización, las unidades reportadas son mg/100 mL para el caso de fluidos y mg/100 g para el caso de tejidos sólidos (*Tabla 2*).

Tabla 2. Estadísticas descriptivas de las concentraciones de etanol en cada tejido o fluido muestreado

Muestra	[mg/100mL o mg/100g]						CV [%]
	Media	<i>s.d.</i>	<i>s.e.</i>	Mínimo	Mediana	Máximo	
Sangre	233.44	108.35	13.24	27.68	199.26	538.17	46.4%
Orina	273.97	119.05	16.51	3.50	261.12	539.02	43.5%
Humor	231.89	111.77	13.76	7.58	215.31	552.68	48.2%
Hígado	148.89	111.76	13.76	27.25	116.05	688.70	75.1%
Cerebro	163.11	58.32	9.22	31.65	153.75	290.64	35.8%
Pulmón	158.55	72.86	12.32	39.36	138.64	340.55	46.0%
Sinovial	217.12	110.54	21.68	0.00	221.63	496.82	50.9%
Músculo	142.80	60.99	11.74	15.87	146.96	277.87	42.7%
Lengua	185.15	67.88	14.47	88.36	182.71	344.58	36.7%
Bilis	253.91	82.04	21.93	158.95	241.14	454.12	32.3%
Páncreas	178.19	142.59	39.55	15.36	151.82	619.01	80.0%

Como parte del análisis exploratorio de datos, se calcularon las diferencias de las concentraciones individuales de cada tipo de muestra con respecto a la sangre, y se obtuvieron la media, desviación estándar (*s.d.*) y error estándar (*s.e.*), el cual se graficó. En la *Figura 7* se pueden observar dichos resultados, de los cuales podemos comentar que, como era de esperar por la toxicocinética del etanol (ver *sección 1.a.ii* del presente trabajo), en fluidos de excreción, como es la orina y la bilis se detecta una concentración mayor respecto a la sangre. Por otro lado, en los tejidos hígado, pulmón y músculo se detectaron las menores concentraciones respecto a la sangre, ya que se sabe que en dichos tejidos se presenta actividad metabólica por los mecanismos de ADH y MEOS (Lieber, 1977), además de por el menor contenido acuoso de estos tejidos sólidos en comparación con las otras muestras biológicas líquidas analizadas. Finalmente, el líquido sinovial, cerebro y humor vítreo presentan una diferencia pequeña, e incluso se incluye el 0 en el intervalo de la media \pm *s.e.* en los primeros dos mencionados.

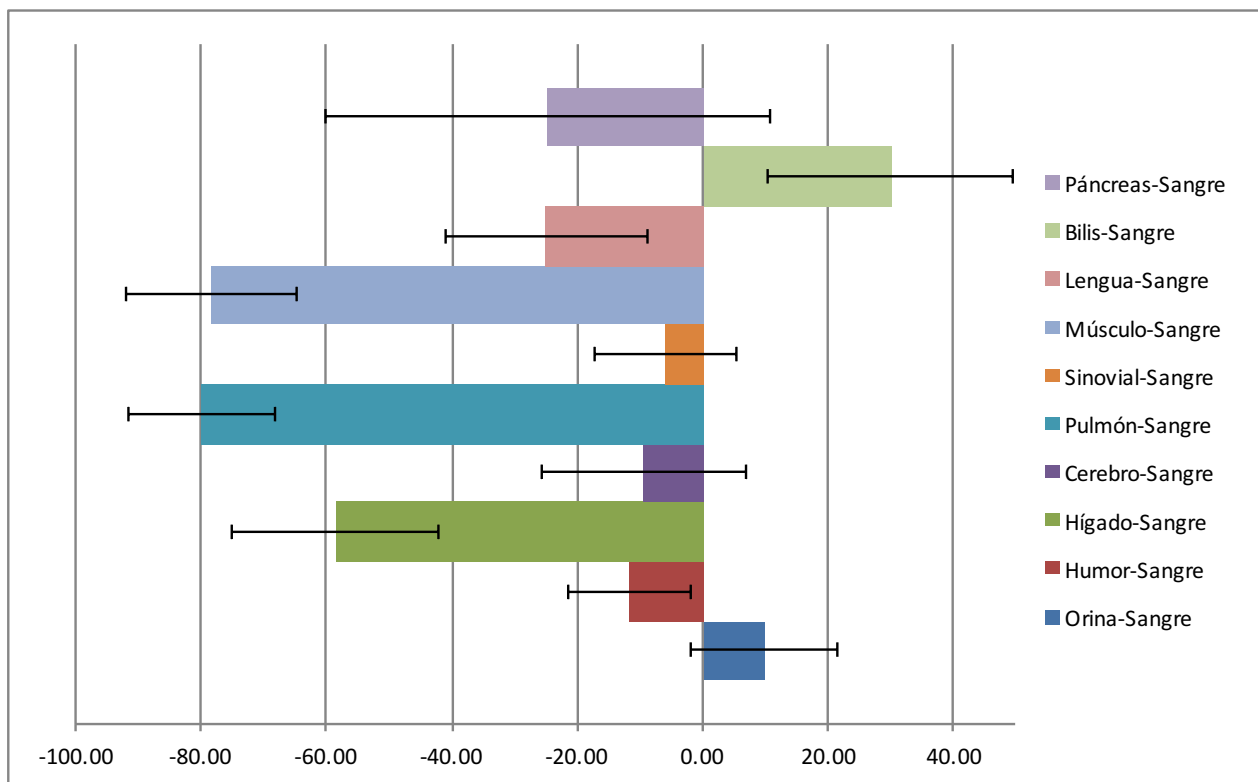


Fig. 7. Diferencias de la concentración de cada fluido o tejido menos la concentración de etanol en sangre.

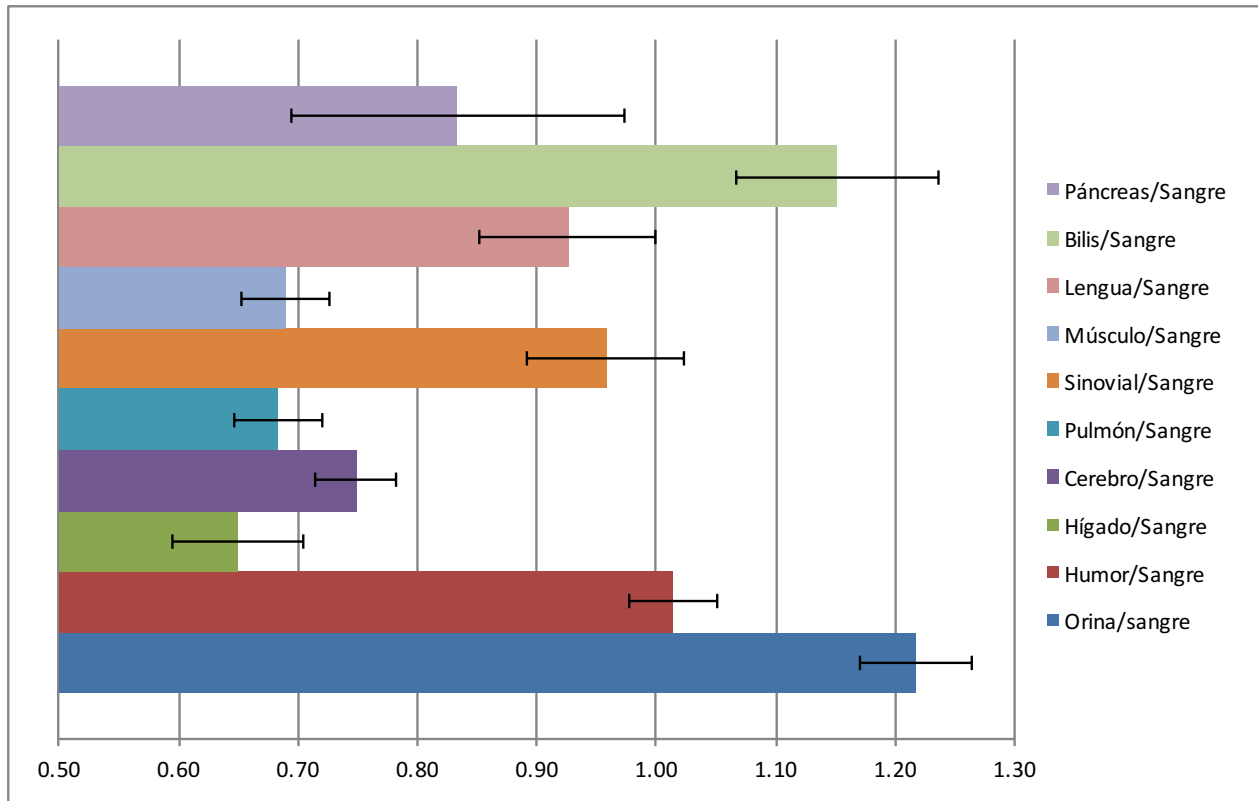


Fig. 8. Cociente de las concentraciones de cada fluido o tejido entre la concentración de etanol en sangre.

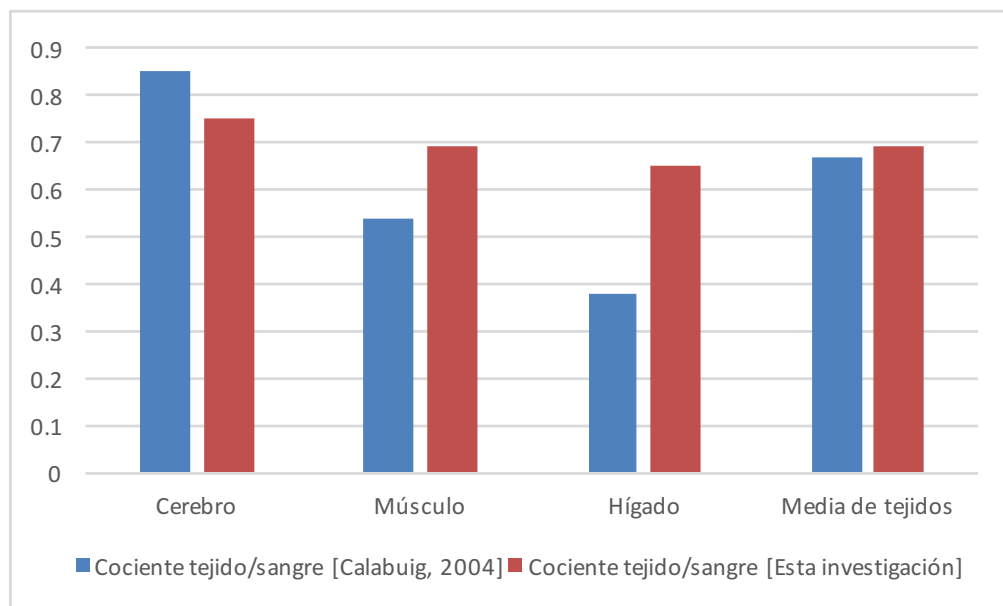


Fig. 9. Cocientes de concentraciones de etanol de diferentes tejidos con respecto a la alcoholemia reportada en referencias bibliográficas (Calabuig & Villanueva Cañadas, 2004) y en esta investigación.

En la *figura 8* se graficaron las medias \pm s.e. de los cocientes de las concentraciones por espécimen biológico entre la concentración en sangre, lo cual confirma el cociente mayor a 1 para la orina y la bilis (una concentración de etanol mayor en dichos fluidos) por la razón de eliminación toxicocinética explicada arriba. Además, se confirman los menores cocientes para las concentraciones de hígado, pulmón y músculo, así como un cociente de prácticamente 1 en humor vítreo, mientras que en líquido sinovial el error estándar incluye la unidad del cociente.

Tras el análisis exploratorio anterior, se identificaron como muestras biológicas de interés en este estudio toxicocinético de etanol la orina y la bilis, con el objetivo de cuantificar la repercusión de excreción del tóxico. Además, se consideraron los tejidos que demostraron una alta tasa de degradación de etanol, por sus concentraciones menores que en sangre, que son hígado, pulmón y músculo esquelético. Finalmente, por su equivalencia en concentraciones con respecto a la sangre, se identificaron el humor vítreo y el líquido sinovial como posibles muestras alternativas a la hemática, cuyos datos serán analizados a manera de equivalencia con respecto a las concentraciones sanguíneas.

Con la intención de buscar una validez externa para el presente estudio con lo reportado en la literatura, se encontró en la bibliografía que ya se han descrito previamente los cocientes de las concentraciones de etanol de diferentes tejidos, como cerebro, músculo e hígado, con respecto a la concentración de etanol sanguínea (Calabuig & Villanueva Cañadas, 2004). Por lo tanto, se compararon dichos valores (*Figura 9*) encontrando un valores muy cercanos para los cocientes puntuales de cerebro y del promedio de los tejidos, dentro de los cuales sólo se consideró hígado, cerebro, pulmón y músculo para ser equivalente a las condiciones de estudio reportadas por Calabuig (2004). Respecto a los cocientes tejido/sangre para músculo e hígado, se encontró una supra-estimación en los valores de este estudio. Esto puede deberse principalmente a la etapa de la muerte y el tipo de muestreo realizado en los distintos estudios, así como las condiciones de consumo de etanol previo al deceso.

b. Correlación y regresión de concentración de fluidos en muestras biológicas

Primeramente, se estudió la relación de la alcoholemia con variables demográficas como el peso corporal, mediante una regresión lineal simple, en la cual se encontró un coeficiente de

correlación negativo, aunque con una bondad de ajuste bastante baja ($R^2 = 0.03$) (Figura 10). La aparente relación inversa entre ambas variables, aunque probablemente resulte no significativa, se puede explicar desde la perspectiva fisiológica, ya que a mayor peso, - y por lo tanto, mayor superficie y volumen de líquido corporal -, la distribución del tóxico en el cuerpo es mayor y muy rápida, sin presentar unión a proteínas plasmáticas (Jones & Holmgren, 2001) como se ha comentado previamente en el marco teórico, por lo que la concentración en sangre podría ser ligeramente menor que en sujetos con menor peso-superficie corporal.

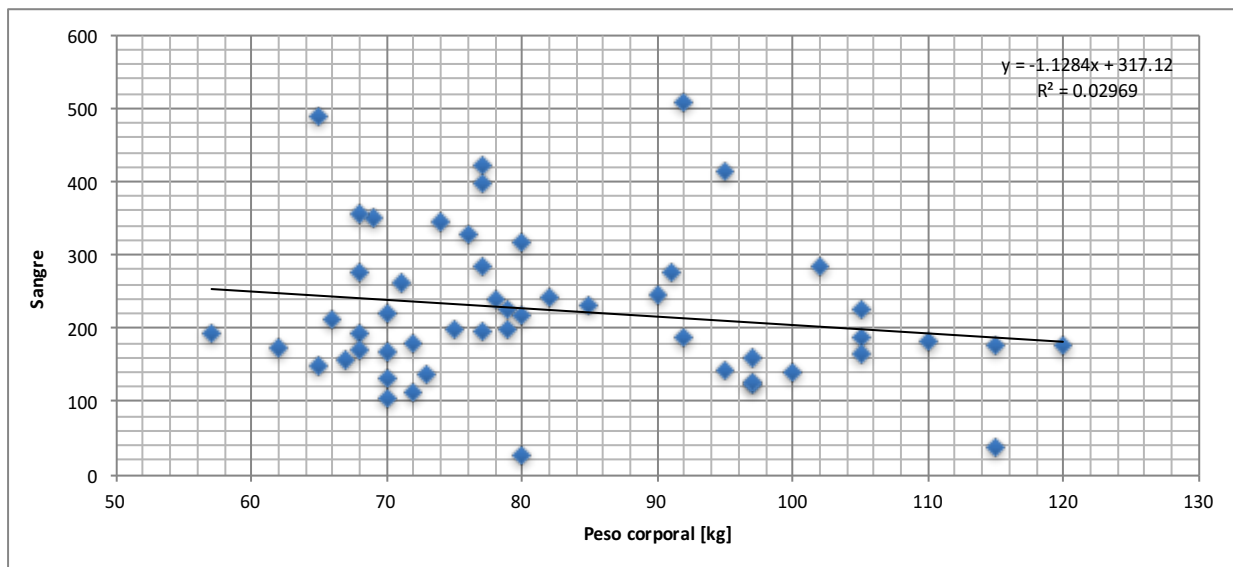


Fig. 10. Correlación de la concentración de alcohol en sangre [mg/100 mL] con el peso corporal del individuo [kg].

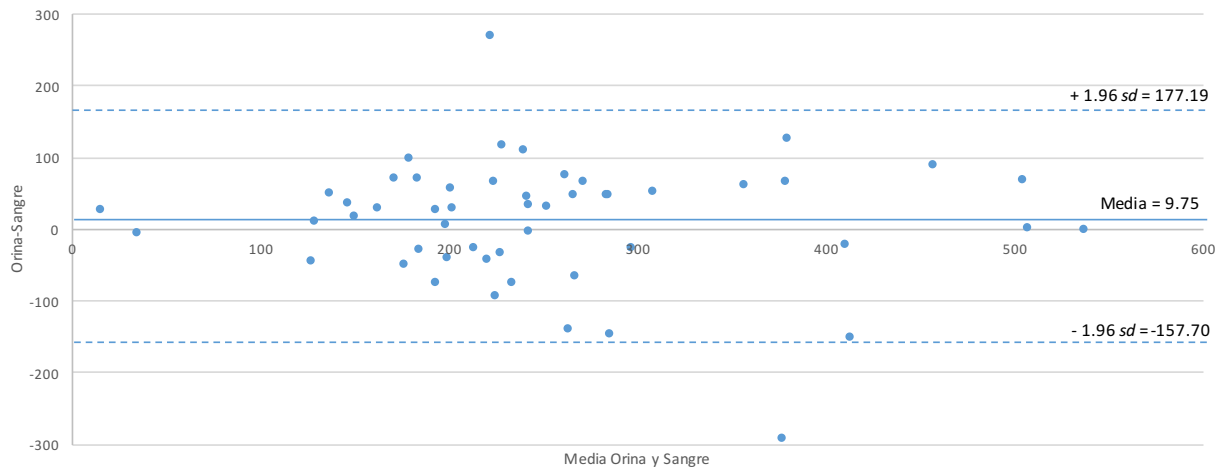
Por otro lado, de acuerdo con los estudios realizados por Jones y colaboradores sobre la concentración de etanol entre sangre venosa y humor vítreo (Jones & Holmgren, 2001), basados en los modelos estadísticos de análisis de datos clínicos propuestos previamente por Bland y Altman (1999), se realizó el análisis de concordancia entre las concentraciones aritméticas de etanol de las diferentes muestras biológicas con respecto a la sangre (Figuras 11 - 17) sólo de variables seleccionadas como relevantes tras el análisis exploratorio de los datos (*paneles a*). Esta propuesta estadística (Bland & Altman, 1999), especialmente utilizada en ciencias médicas y biológicas, parte del supuesto que la concordancia entre métodos no debe ser probada respecto a si existe o no, si no que debe ser cuantificada mediante las diferencias individuales de las observaciones. Es así que dichos investigadores discuten y justifican que los métodos

estadísticos comunes de prueba de hipótesis, correlación, regresión y comparación de medias son tendenciosos e inapropiados, mientras que la cuantificación del sesgo es la interpretación más correcta para la práctica clínica.

En dichas gráficas se identifica la media de la diferencia (sesgo) en la línea sólida central, y en líneas punteadas se indican los límites de referencia para la concordancia a 95% (± 1.96 s.d.) (Bland & Altman, 1999). Asimismo, se incluyen en los análisis de las *figuras 11 a 17* las diferencias vs. promedios de los datos de concentración de etanol transformados a logaritmo natural (*paneles b*).

A continuación se anexan las gráficas en orden de acuerdo con el sub-grupo planteado anteriormente en el análisis exploratorio: primeramente la orina y la bilis, por su interés en la eliminación del etanol; posteriormente se mencionarán los tejidos hepático, pulmonar y muscular, por su evidencia metabólica al encontrar menor concentración en dichos tejidos que en sangre; y finalmente se mencionarán los fluidos humor vítreo y líquido sinovial, como posibles muestras alternativas a la hemática por su equivalencia en concentración de etanol en cadáveres.

a)



b)

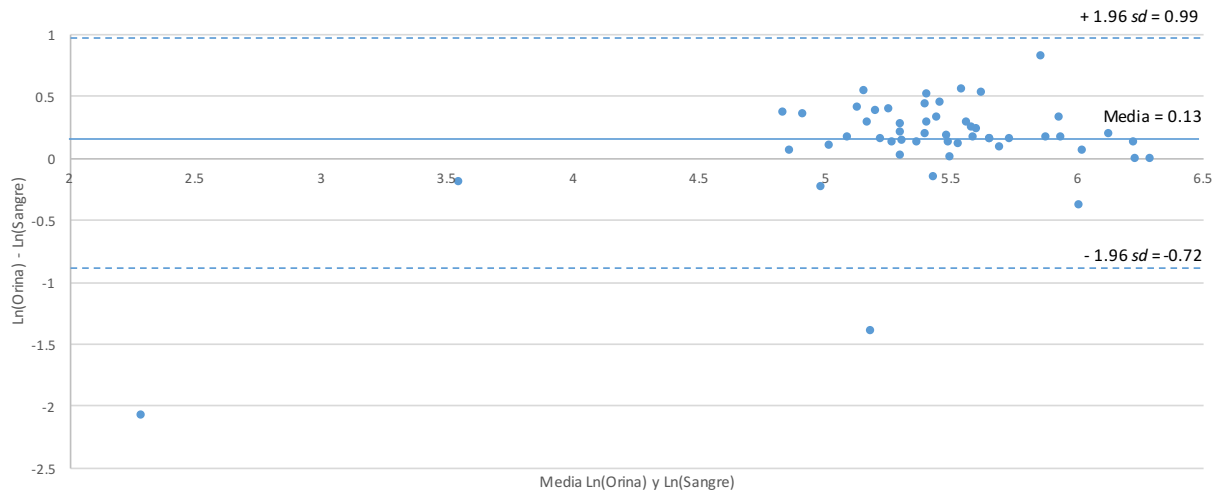
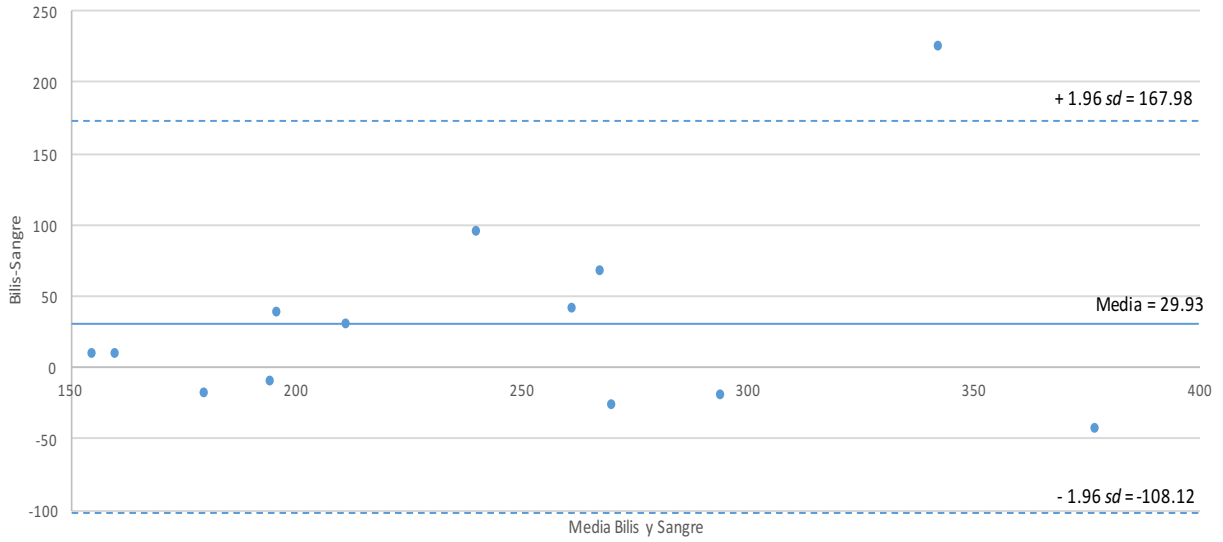


Fig. 11. a) Gráfica de las diferencias de concentración de orina y sangre vs. promedio de ambas concentraciones.
b) Gráfica de las diferencias de los logaritmos naturales de las concentración de orina y sangre vs. promedio de los Ln de ambas concentraciones.

a)



b)

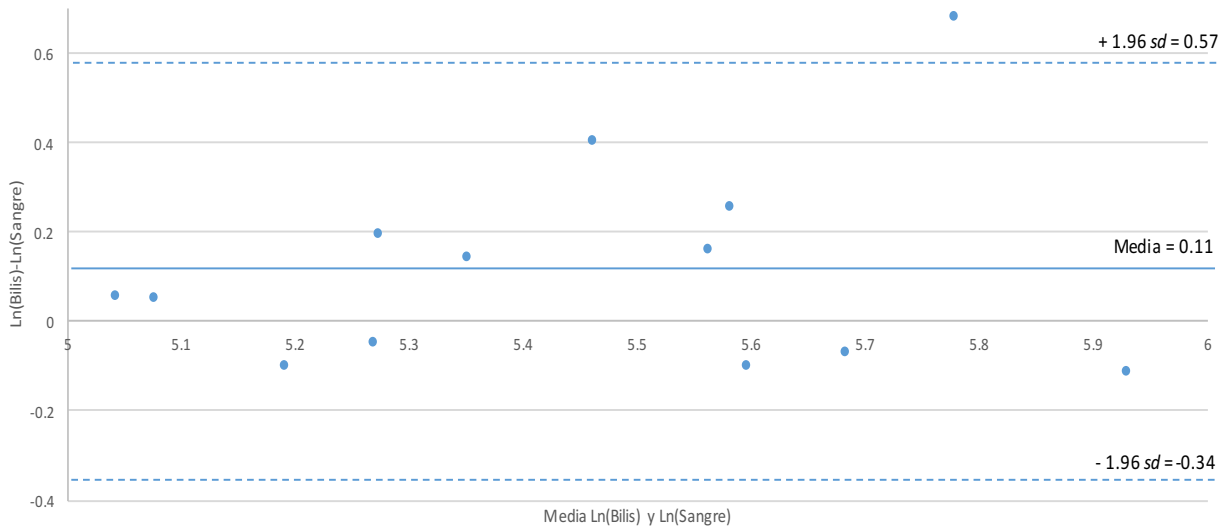
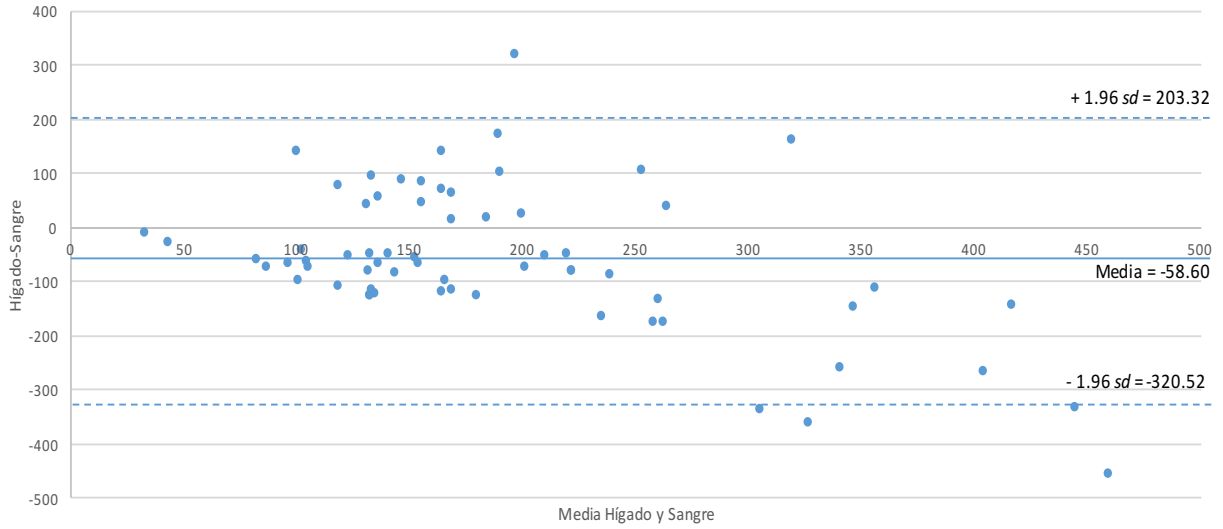


Fig. 12. a) Gráfica de las diferencias de concentración de bilis y sangre vs. promedio de ambas concentraciones. b) Gráfica de las diferencias de los logaritmos naturales de las concentración de bilis y sangre vs. promedio de los Ln de ambas concentraciones.

a)



b)

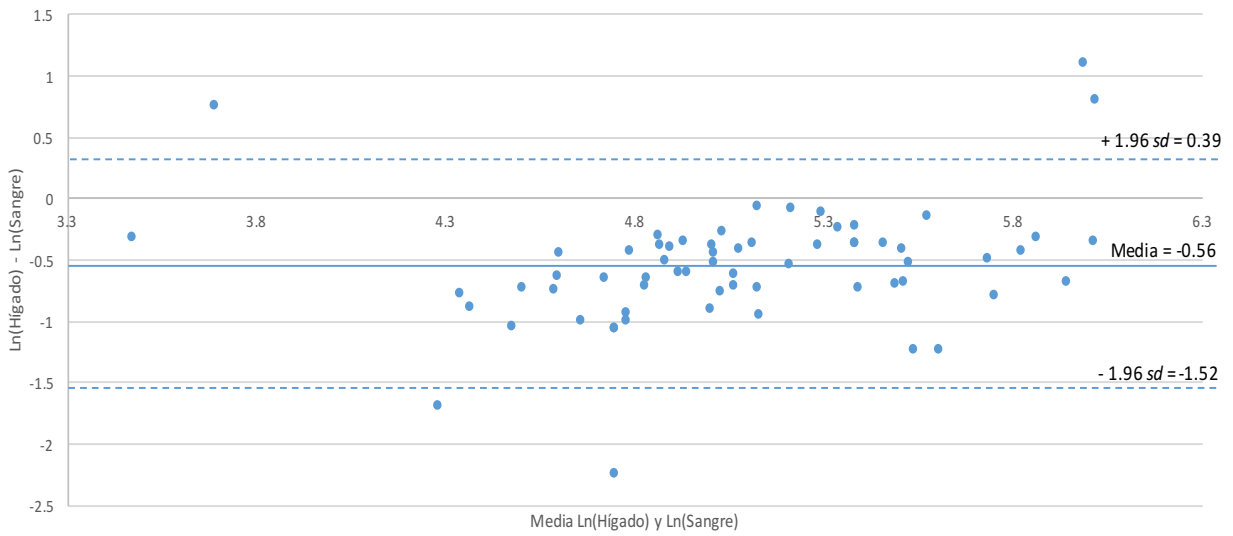
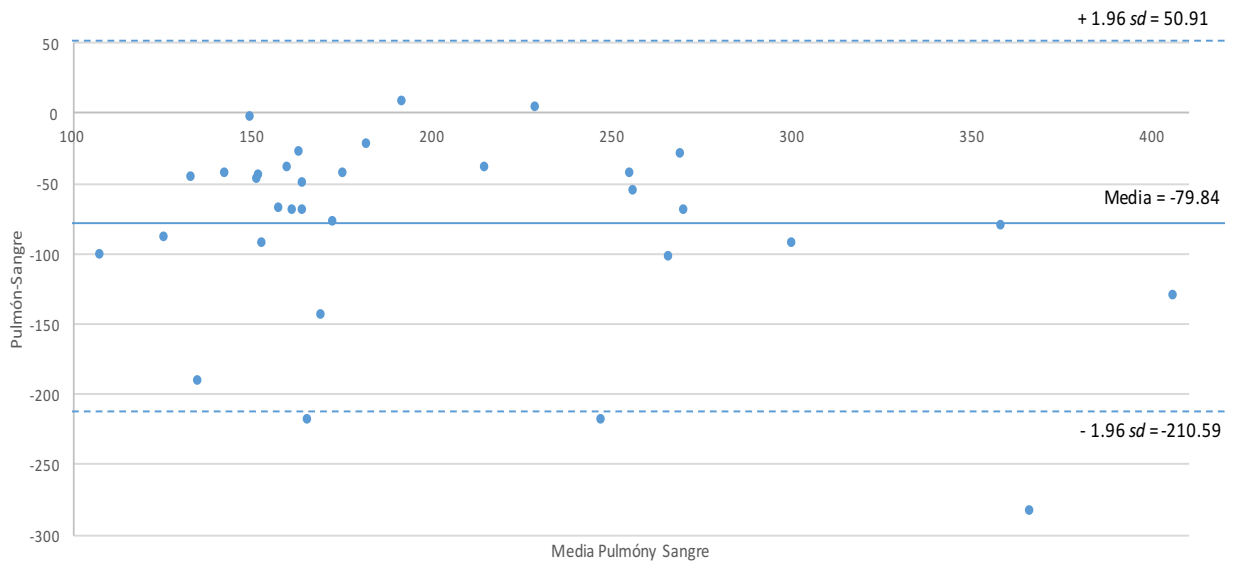


Fig. 13. a) Gráfica de las diferencias de concentración de hígado y sangre vs. promedio de ambas concentraciones.
b) Gráfica de las diferencias de los logaritmos naturales de las concentración de hígado y sangre vs. promedio de los Ln de ambas concentraciones.

a)



b)

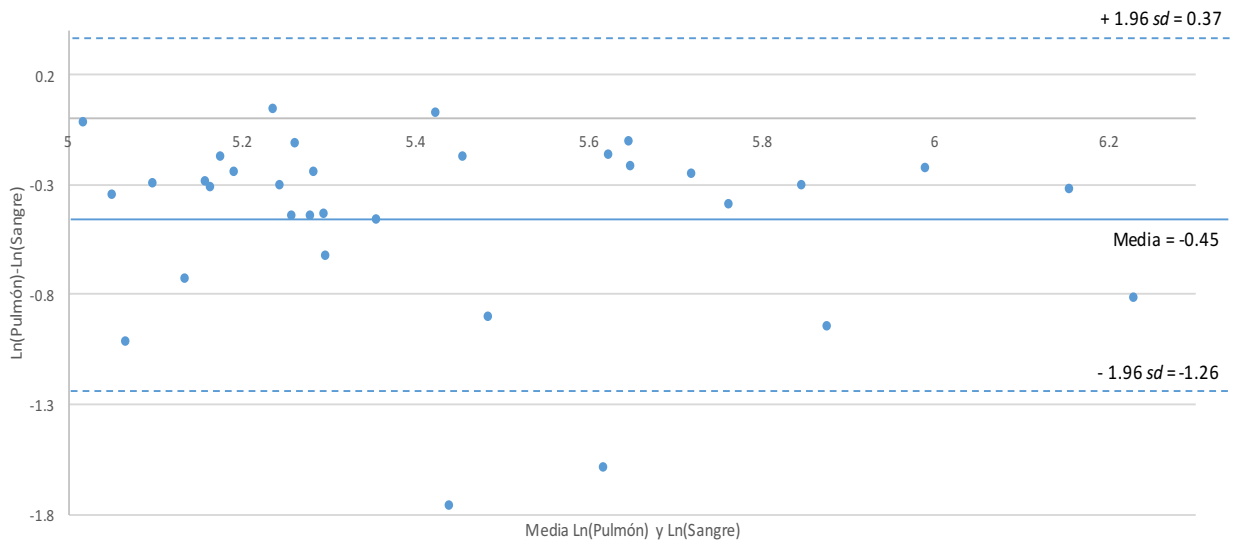
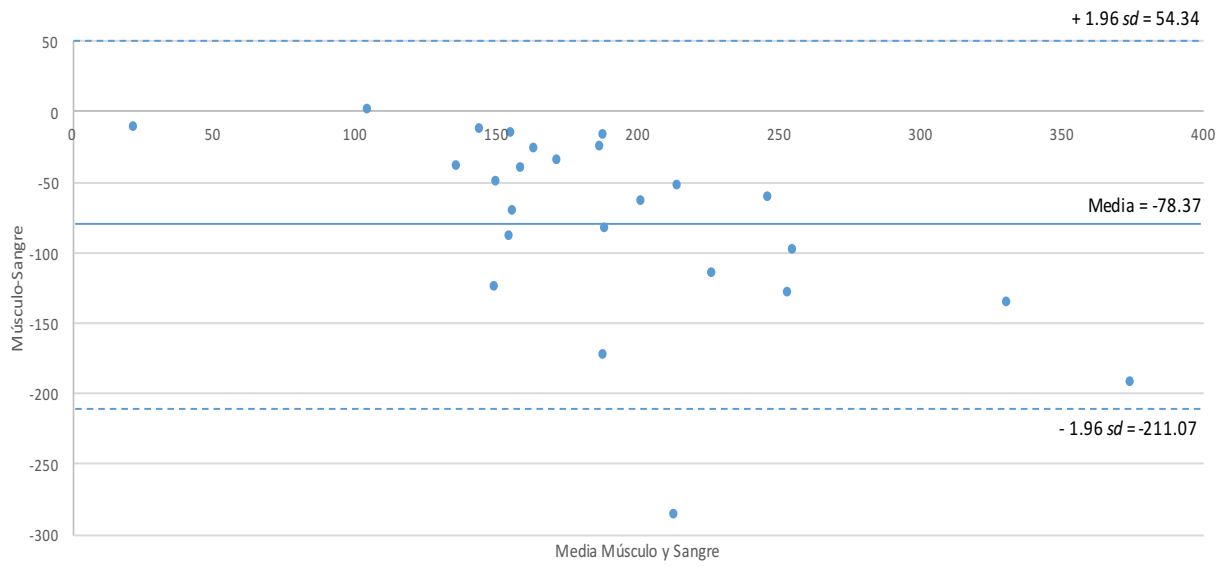


Fig. 14. a) Gráfica de las diferencias de concentración de pulmón y sangre vs. promedio de ambas concentraciones.
 b) Gráfica de las diferencias de los logaritmos naturales de las concentración de orina y sangre vs. promedio de los Ln de ambas concentraciones.

a)



b)

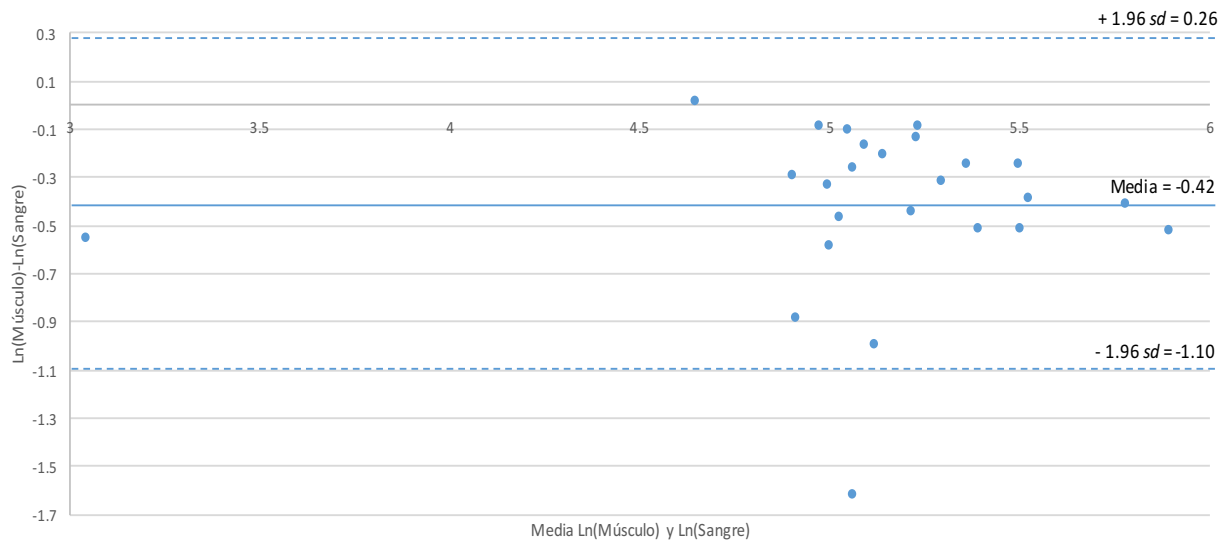
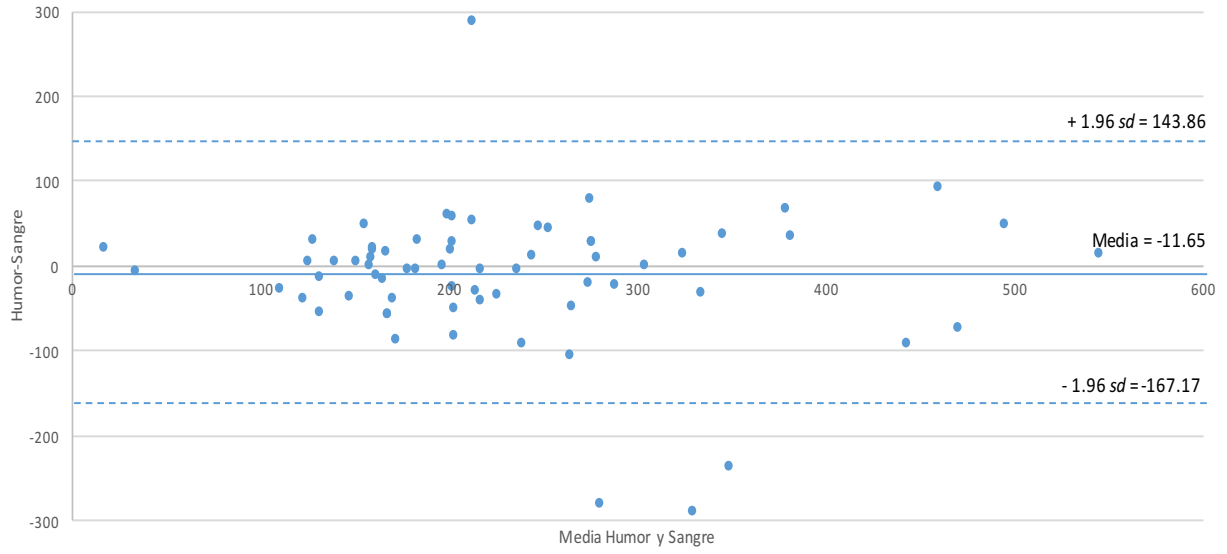


Fig. 15. a) Gráfica de las diferencias de concentración de músculo y sangre vs. promedio de ambas concentraciones.
b) Gráfica de las diferencias de los logaritmos naturales de las concentración de músculo y sangre vs. promedio de los Ln de ambas concentraciones.

a)



b)

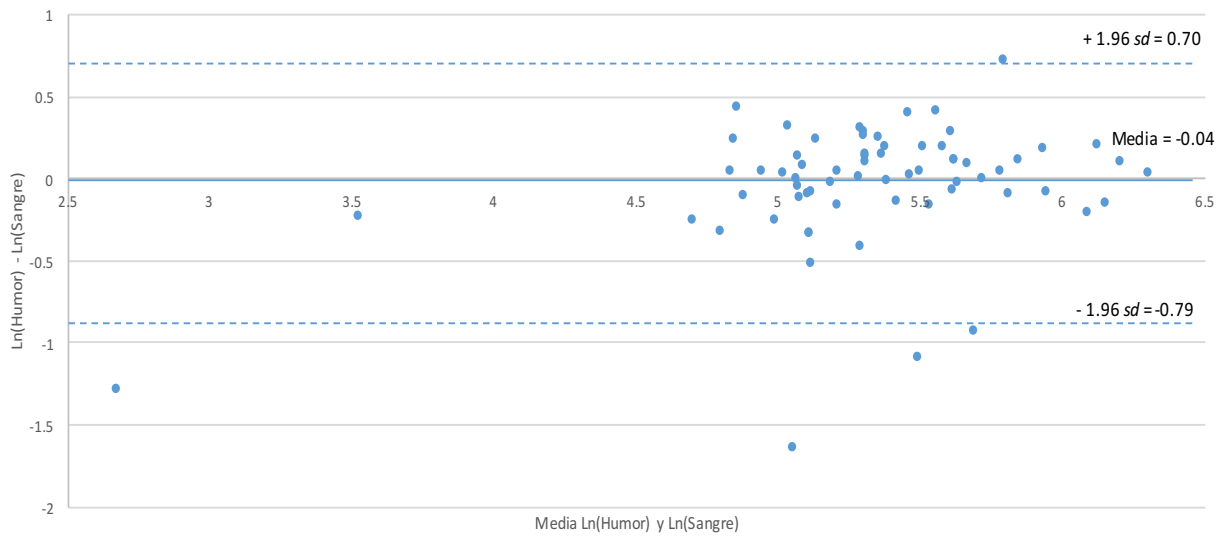
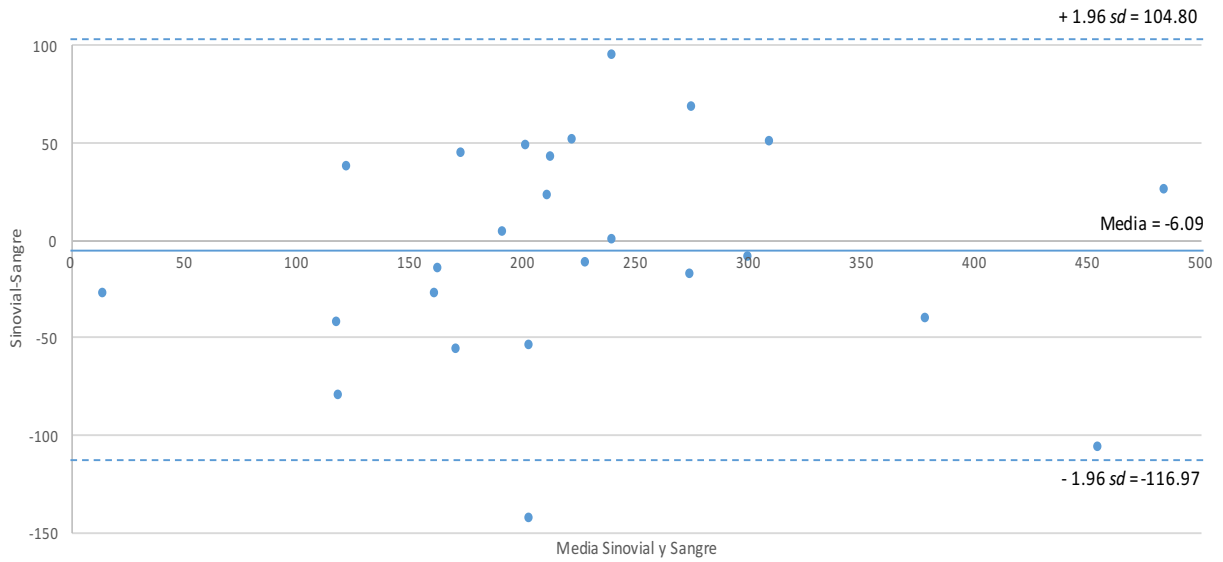


Fig. 16. a) Gráfica de las diferencias de concentración de humor vítreo y sangre vs. promedio de ambas concentraciones. b) Gráfica de las diferencias de los logaritmos naturales de las concentración de humor vítreo y sangre vs. promedio de los Ln de ambas concentraciones.

a)



b)

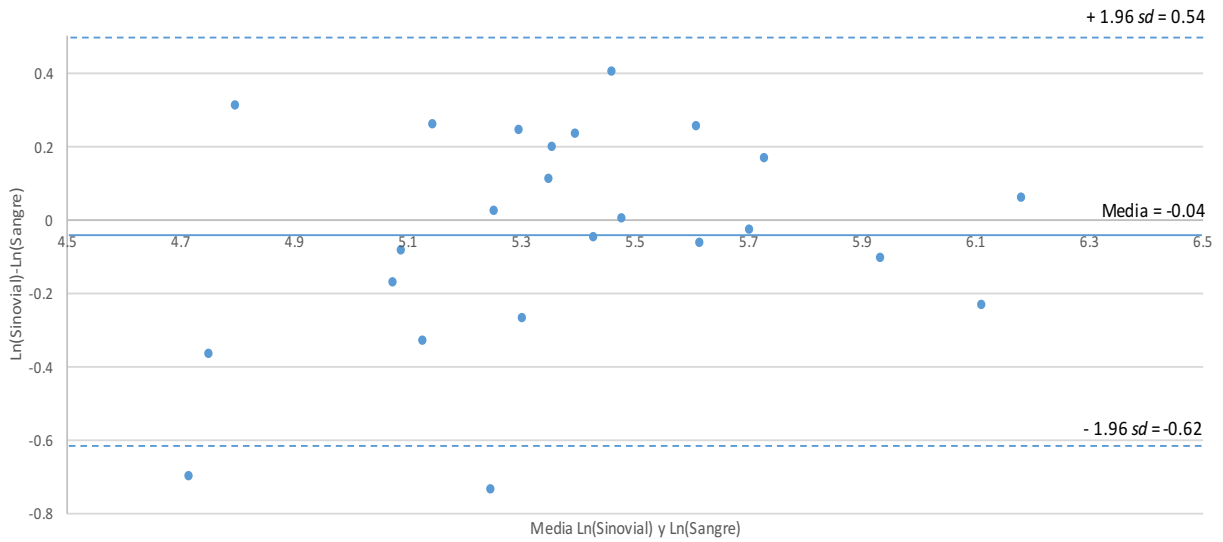


Fig. 17. a) Gráfica de las diferencias de concentración de líquido sinovial y sangre vs. promedio de ambas concentraciones. b) Gráfica de las diferencias de los logaritmos naturales de las concentración de líquido sinovial y sangre vs. promedio de los Ln de ambas concentraciones.

Como se puede observar en las gráficas anteriores (*Fig. 11 a 17*), tras realizar el análisis de concordancia entre mediciones (Bland & Altman, 1999; Jones & Holmgren, 2001), los datos se distribuyen de una manera adecuada dentro del intervalo al 95% indicado en cada cuadrante. Esto indica que para todas las variables analizadas, se confirma que más del 90% - y en algunos casos incluso el 95% - de las observaciones se encuentran dentro de una desviación estándar, ya que el número de observaciones que exceden este margen está entre 1 y 5 para las variables estudiadas. Más aún, se observa que la transformación logarítmica de los datos para calcular las diferencias y las medias aritméticas no tuvo impacto en el ajuste de los datos, ya que prácticamente en todos los casos el mismo número de observaciones excedió la primera desviación estándar marcada entre los datos naturales y *log*-transformados.

Continuando con el análisis de los datos anteriores, se realizaron regresiones lineales simples de las gráficas de dispersión de las restas contra las medias de las concentraciones analizadas (fluido o tejido con respecto a sangre), tanto con los datos en escala aritmética como transformados a logaritmo natural. A partir de estas regresiones se pudo confirmar que salvo las concentraciones de etanol en hígado y músculo con respecto a la sangre, los demás fluidos y tejidos no presentan una evidencia de correlación significativa entre estas variables calculadas, con coeficientes R^2 máximos de 0.12 y pendientes de la recta menores a 0.3. Sin embargo, para el tejido hepático, se encontró que a medida que se incrementa el promedio de las concentraciones, el valor de la resta entre ellas parece hacerse más negativo (indicando una mayor concentración sanguínea con respecto a la hepática), calculando una pendiente $m = -0.71$ con una $R^2 = 0.253$ (*Fig. 13.a*). Dicha correlación desaparece con la transformación a \ln , como puede ser visualizado en la *Fig. 13.b*. Por otro lado, para el tejido muscular también se registra una tendencia en los datos sin transformar con la misma tendencia descrita para el tejido hepático, calculando una $m = -0.562$ con una $R^2 = 0.337$ (*Fig. 15.a*).

Finalmente, se puede concluir acerca del análisis sobre las diferencias y concordancias entre métodos propuesto por Bland y Altman (1999), que la consideración de las diferencias entre las mediciones individuales resulta interesante para poder cuantificar los sesgos presentes en cada una de las muestras biológicas, como fue discutido anteriormente. Con esto, se confirma lo evidenciado desde la *Figura 7*, sobre que la cuantificación en orina y bilis supra-

estiman la alcoholemia, mientras que la medición de todos los demás fluidos y tejidos subestiman la concentración de etanol en sangre. Dentro de este análisis, los fluidos orina, humor vítreo y líquido sinovial tienen el menor sesgo (media de las diferencias), siendo este máximo en los tejidos con evidencia de capacidad metabólica (hígado, pulmón y músculo).

Otros análisis estadísticos realizados sobre los datos de concentración de etanol obtenidos, con el objetivo de establecer una variable alternativa a la concentración hemática de etanol, fueron ajustes de regresión lineal para cada una de las variables estudiadas contra la alcoholemia. A partir de ahí, se analizaron los coeficientes de regresión y las bondades de ajuste individualmente, como se muestra en las *figuras 18 a 24*. En todos los casos, como se ha descrito anteriormente con fines de estandarización, las unidades de concentración de los fluidos están reportadas en mg/100 mL, mientras que los valores de concentración de muestras biológicas sólidas están en unidades de mg/100 g.

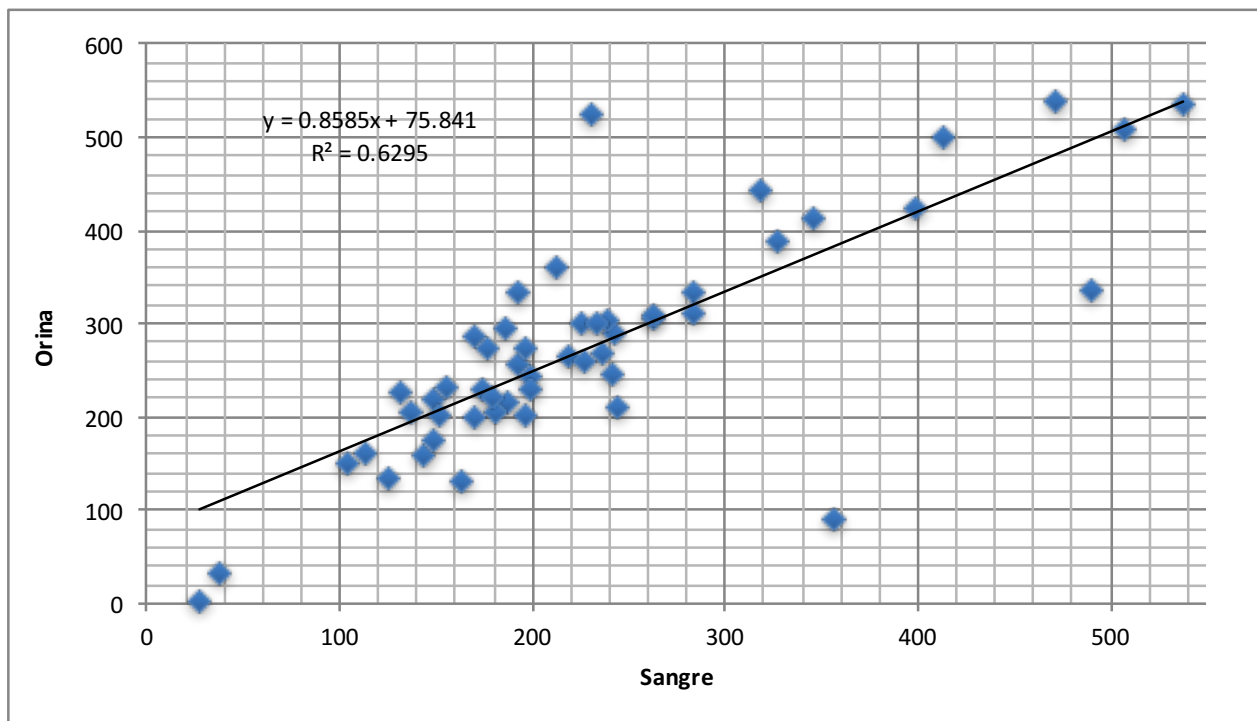


Fig. 18. Gráfica de correlación mediante regresión lineal de las variables concentración de alcohol en orina [mg/100 mL] vs. concentración en sangre [mg/100 mL].

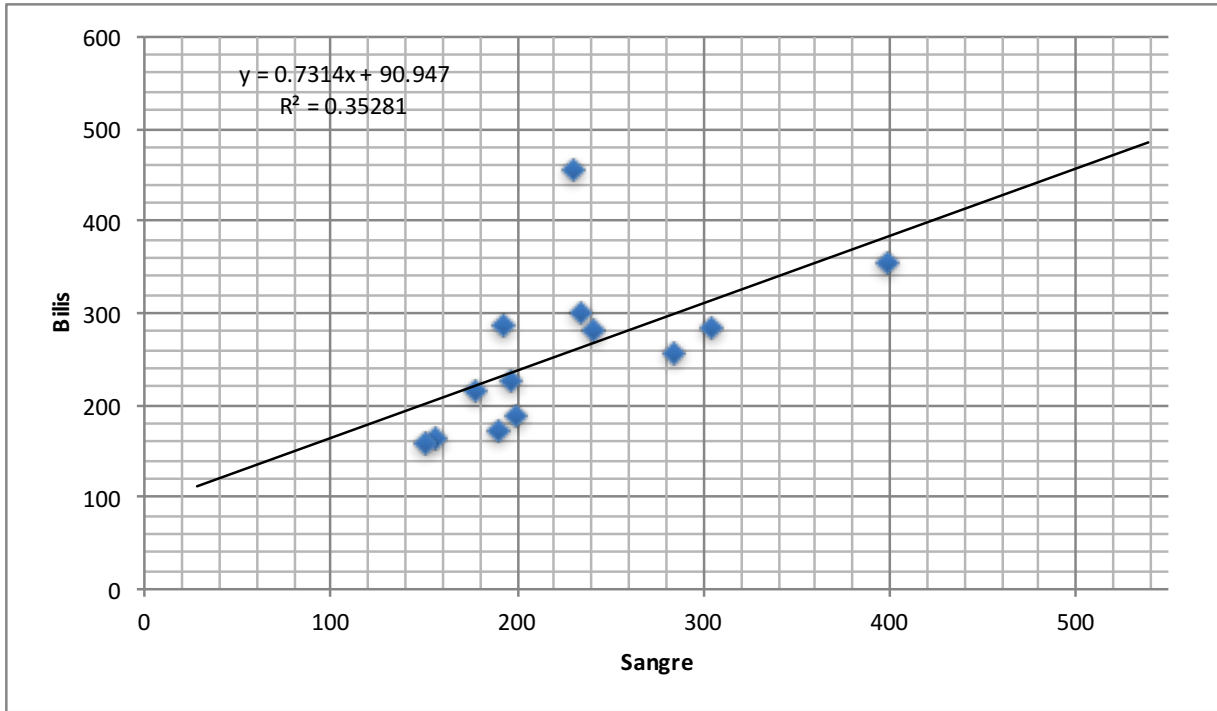


Fig. 19. Gráfica de correlación mediante regresión lineal de las variables concentración de alcohol en bilis [mg/100 mL] vs. concentración en sangre [mg/100 mL].

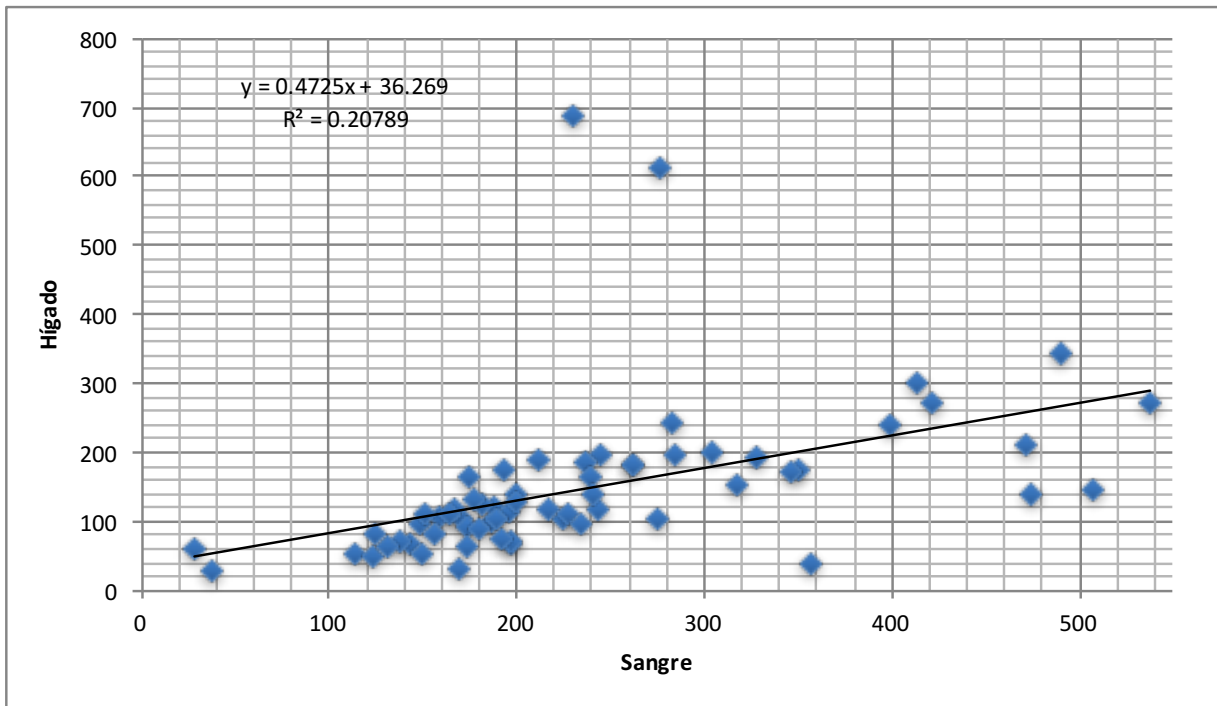


Fig. 20. Gráfica de correlación mediante regresión lineal de las variables concentración de alcohol en hígado [mg/100 g] vs. concentración en sangre [mg/100 mL].

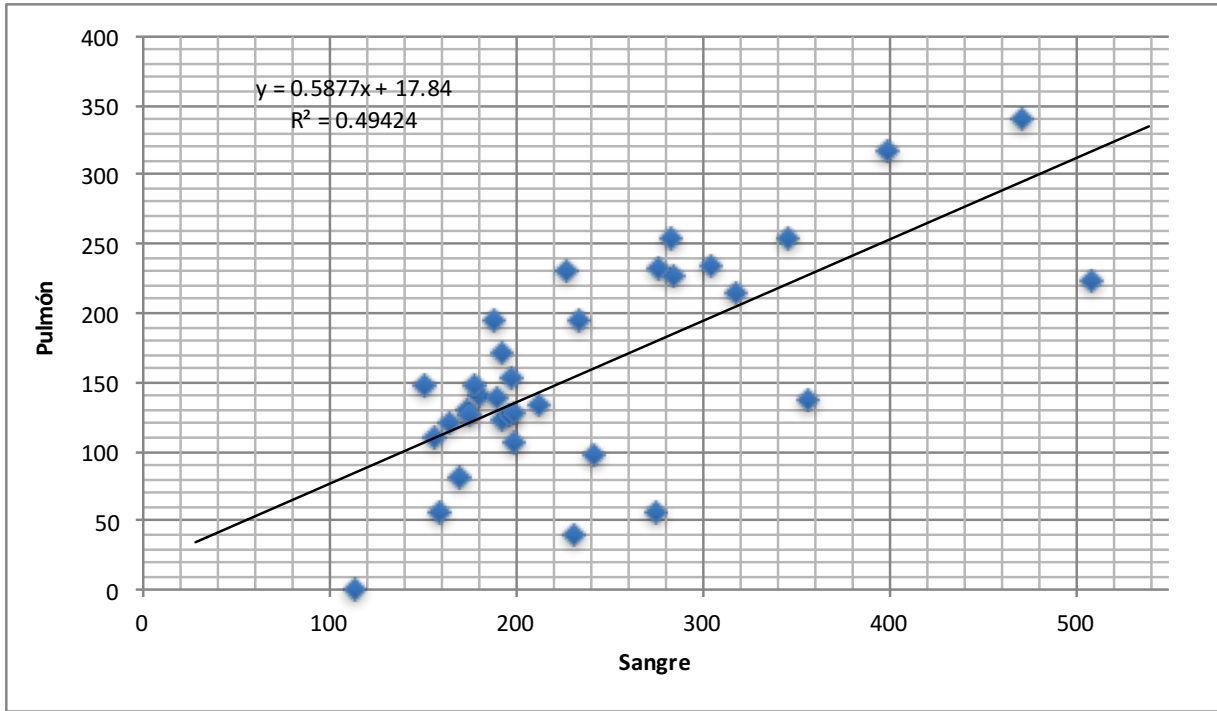


Fig. 21. Gráfica de correlación mediante regresión lineal de las variables concentración de alcohol en pulmón [mg/100 g] vs. concentración en sangre [mg/100 mL].

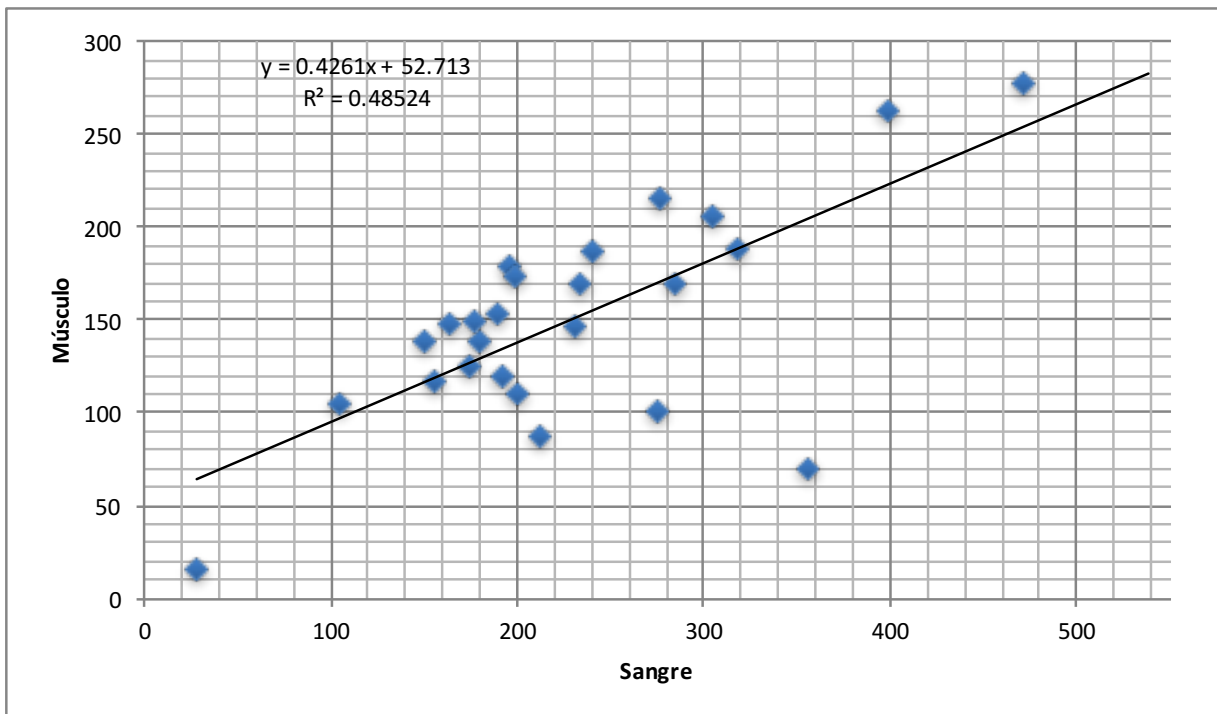


Fig. 22. Gráfica de correlación mediante regresión lineal de las variables concentración de alcohol en músculo-esquelético [mg/100 g] vs. concentración en sangre [mg/100 mL].

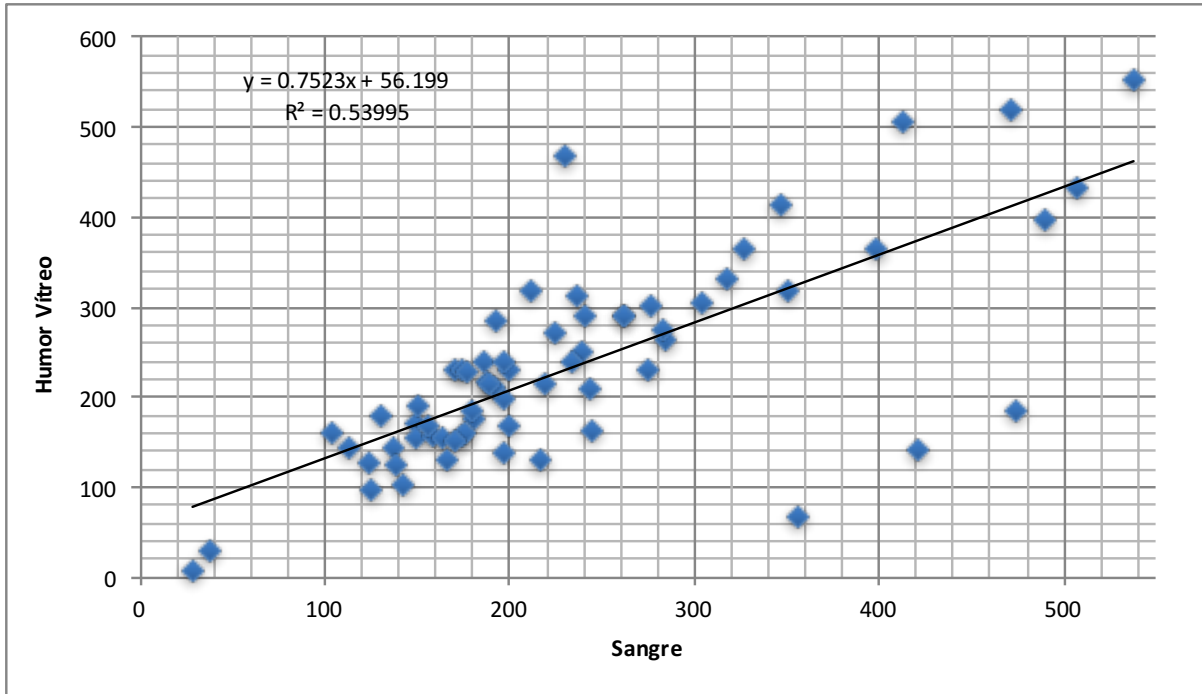


Fig. 23. Gráfica de correlación mediante regresión lineal de las variables concentración de alcohol en humor vítreo [mg/100 mL] vs. concentración en sangre [mg/100 mL].

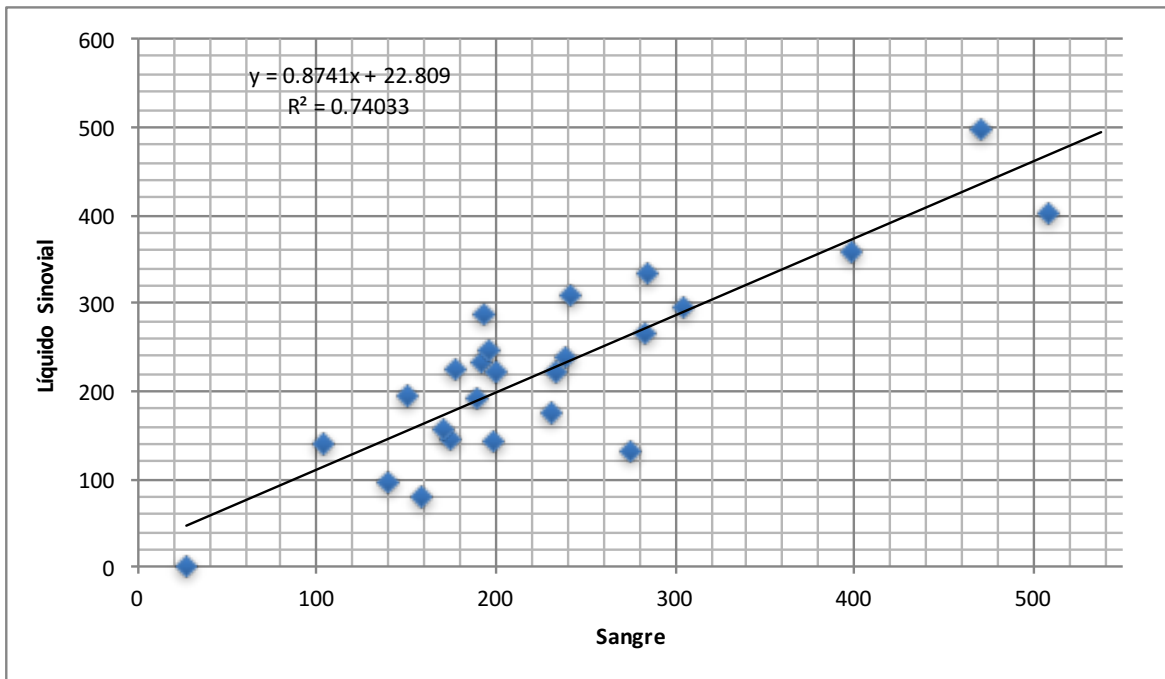


Fig. 24. Gráfica de correlación mediante regresión lineal de las variables concentración de alcohol en líquido sinovial [mg/100 mL] vs. concentración en sangre [mg/100 mL].

En la *tabla 3* se muestra un resumen de los coeficientes obtenidos de los ejercicios de regresión lineal simple mostrados en las gráficas anteriores con Microsoft® Excel, complementado con los intervalos de confianza para la pendiente y la ordenada al origen, así como la significancia del modelo de regresión, calculado con GraphPad®Prism. De esta tabla de resumen se desprende que todos los modelos de regresión de estas variables con referencia a la concentración en sangre son significativos. Adicionalmente, la correlación de la concentración de líquido sinovial con sangre es la mejor de acuerdo a los datos, teniendo el coeficiente de correlación ($R^2 = 0.74$), la cual además incluye a la unidad (valor de 1) en el intervalo de confianza al 95% calculado para su pendiente.

Enseguida, con una bondad de ajuste menor que la del análisis de líquido sinovial, se encuentra el modelo de orina contra sangre, que también presenta un buen ajuste a los datos ($R^2 = 0.63$), estando su pendiente cercana a la unidad, que la incluye en el IC al 95%. Posteriormente se puede ver que el humor vítreo puede ser un fluido útil para determinar concentración de alcohol en sangre, sin embargo su R^2 se encuentra baja, en 0.54. El tejido hepático contra sangre muestra el coeficiente de correlación más bajo (0.21), seguido de la bilis (0.35), por lo que resultaron ser los modelos menos significativos. Finalmente, las pendientes de los tejidos hígado, pulmón y músculo, confirman la sub-estimación sistemática al calcular la alcoholemia en caso de tomar éstas como muestras biológicas de referencia.

Tabla 3. Resumen de los coeficientes de regresión lineal y de correlación de las concentraciones de etanol en las muestras biológicas contra alcoholemia.

Muestra biológica	m	IC 95%	b	IC 95%	R^2	F	p-value
Orina	0.86	(0.6713, 1.046)	75.84	28.05 - 123.6	0.63	84.95	< 0.0001
Bilis	0.73	(0.07400, 1.389)	90.95	-64.53 - 246.4	0.35	5.997	0.0323
Hígado	0.47	(0.2383, 0.7067)	36.27	-24.77 - 97.31	0.21	16.27	0.0002
Pulmón	0.59	(0.3298, 0.7605)	17.84	-24.97 - 86.43	0.49	26.67	< 0.0001
Músculo	0.43	(0.2368, 0.6154)	52.71	6.104 - 99.32	0.49	21.68	0.0001
Humor Vítreo	0.75	(0.5788, 0.9258)	56.20	11.54 - 100.9	0.54	75.12	< 0.0001
Líquido Sinovial	0.87	(0.6508, 1.097)	22.81	-33.48 - 79.10	0.74	65.57	< 0.0001

Con el fin de ejemplificar el análisis de residuales efectuado con todos los modelos lineales obtenidos anteriormente, en la *figura 25* se grafican los residuales sólo del modelo de regresión lineal simple de las variables orina vs. sangre. En el panel *a* se puede observar que los

residuales se distribuyen de manera normal, por mostrar un buen ajuste a la recta, cumpliendo los supuestos de normalidad de residuales del modelo. Por otro lado, en el panel *b* se observa que la gráfica Q-Q (cuantil-cuantil) también muestra un buen ajuste a la recta. Sin embargo, en este último panel se destaca la presencia de 3 datos aberrantes (uno en los valores estimados bajos y dos en los valores estimados altos), los cuales fueron eliminados del análisis de regresión para efectos de tener un ajuste robusto, como se explicará más adelante y se muestra en la *tabla 4*.

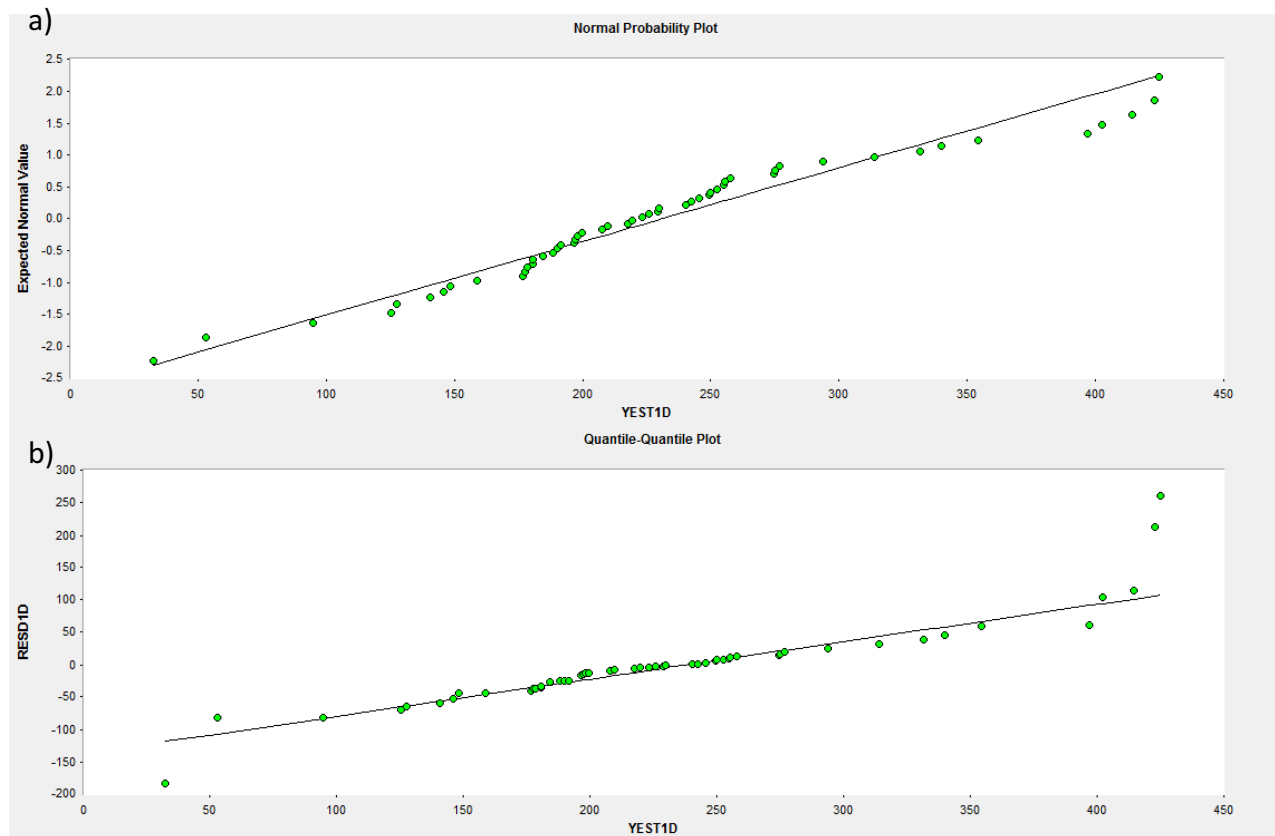


Fig. 25. Análisis de residuales obtenidos de la regresión lineal simple de las variables concentración de alcohol en orina vs. concentración en sangre.

a) Gráfica de probabilidad normal de los residuales.

b) Gráfica Q-Q de los valores estimados por la regresión contra los residuales del modelo.

Procediendo con el análisis de regresión, y con el fin de mejorar las estimaciones entre variables, se ejecutó un modelo de regresión con ajuste robusto (*robust fit*) con el programa GraphPad®Prism. El objetivo de esta prueba fue generar un modelo sin la influencia de los valores extremos en las observaciones (*outliers*). Se resumen en la *tabla 4* además de los

parámetros de la regresión (pendiente m y ordenada al origen b), la suma de cuadrados robusta (RSS) y la desviación estándar robusta de los residuales (RSDR), la cual puede ser interpretada como una desviación típica sin influencia de los valores extremos, ya que consiste en la distancia desde las observaciones a la línea de regresión, y tiene las mismas unidades que la variable Y (Motulsky & Christopoulos, 2003). Esta se calcula como la desviación de los datos dentro del 68.27% de los valores, multiplicado por $n/(n-K)$, donde K es el número de parámetros ajustados.

Como conclusión de esta tabla se puede mencionar que las pendientes de los modelos para orina y humor vítreo mejoraron su cercanía a la unidad, por lo que se concluye que hay 3 y 4 valores extremos en las observaciones de estas variables respectivamente que están influyendo las pruebas estadísticas. Por otro lado, la variable pulmón también presentó cambios en sus parámetros por la mejoría del ajuste, a pesar de no tener datos extremos en sus observaciones. Respecto a los modelos de bilis, músculo y líquido sinovial, no se presentó un cambio sustancial en los valores de m y b con el mejor ajuste tras la eliminación de los valores extremos, que fueron 1, 1 y 0, respectivamente. Finalmente, la variable hígado, tras la eliminación de 5 datos fuera de la tendencia, no presentó un cambio drástico en los parámetros de su regresión.

Tabla 4. Resumen de los coeficientes de regresión del ajuste robusto de las concentraciones de etanol en las muestras biológicas contra alcoholemia.

	Valores con el mejor ajuste		Bondad de ajuste		Valores extremos eliminados
	m	b	RSS	RSDR	
Orina	0.9823	50.16	32.97	44.09	3
Bilis	0.7363	65.92	8.283	41.89	1
Hígado	0.5169	11.73	45.87	38.91	5
Pulmón	0.7278	1.363	19.91	42.78	0
Músculo	0.4955	49.25	16.49	26.92	1
Humor	0.9897	10.67	45.98	44.57	4
Sinovial	0.8968	21.22	12.72	57.22	0

Cabe destacar que, dada la eliminación de los datos extremos u *outliers*, que pueden ser identificados fácilmente como puntos fuera de la generalidad en las *figuras 11 a 17*, así como en el grupo de *figuras 18 a 24* y en los análisis de residuales, se puede comprobar que el ajuste de

los datos en relación con la concentración sanguínea de etanol exhibe un comportamiento lineal. Es por eso que un ajuste de regresión no lineal no es recomendado, ya que solo complicaría el modelo sin presentar ninguna ventaja notoria en la descripción de los datos por una ecuación.

Como parte de los análisis de regresión múltiple ejecutados con el software EQS, se analizaron el total de las variables, su covarianza y su correlación, que en forma de matriz, se obtuvo lo siguiente para las correlaciones:

	Género	Peso	Edad	SangrICF	Sangre	Orina	Humor	Higado	Cerebro	Pulmón	Sinovial
Género	1.0000										
Peso	-0.3174	1.0000									
Edad	-0.2583	-0.0658	1.0000								
SangrICF	-0.0860	0.0421	0.6869	1.0000							
Sangre	-0.1311	0.5669	0.3495	0.7670	1.0000						
Orina	-0.2979	0.3557	0.6792	0.6669	0.6287	1.0000					
Humor	-0.4020	0.3901	0.6370	0.6098	0.5789	0.9892	1.0000				
Higado	-0.2770	0.2755	0.4364	0.0417	-0.0540	0.6738	0.7219	1.0000			
Cerebro	-0.5067	0.2319	0.4864	0.0096	0.0287	-0.0197	-0.0046	0.0487	1.0000		
Pulmón	0.1387	0.3362	0.2401	0.3436	0.5555	-0.0700	-0.1528	-0.4758	0.5321	1.0000	
Sinovial	0.1147	0.1409	0.3740	0.7378	0.8031	0.2493	0.1502	-0.4674	0.1520	0.7906	1.0000

Cronbach's alpha = 0.773

A pesar de haber más de 70 observaciones en la base de datos, en el cruce de las 11 variables, solo se contabilizaron 8 casos para la matriz. Sin embargo, analizando el parámetro del alfa de Cronbach, que resultó mayor a 0.7, se puede afirmar que la matriz de correlación es fiable. Para esto, se identificaron los valores con mayores coeficientes de correlación con respecto a la variable *sangre* y, tal como se esperaba por las regresiones lineales realizadas previamente, las variables *orina*, *humor vítreo* y *líquido sinovial*, así como *pulmón*, resultaron ser las más relacionadas.

Por lo tanto, con el objeto de realizar regresiones múltiples con las variables medidas, se probaron varios modelos inter-relacionando distintos grupos de variables con la concentración en sangre como variable de respuesta. Se evaluaron los mejores modelos basados en el *p-value* del ANOVA, coeficientes de correlación y de correlación ajustado, ya que se realizaron regresiones con diferente número de variables y número de observaciones. En adición, se

consideró el estadístico de Durbin-Watson (DW), el cual mide la independencia de los residuales para confirmar uno de los supuestos del modelo, el cual se esperó entre $1.5 < DW < 2.5$, idealmente muy cercano a 2, para confirmar una completa independencia de los residuales.

Modelo 1. Regresión de las variables de concentraciones de etanol en *orina* y *humor vítreo* con la variable dependiente concentración de etanol en *sangre*.

ANALYSIS OF VARIANCE
=====

Source	SUM OF SQUARES	DF	MEAN SQUARES	F	p
REGRESSION	422418.008	2	211209.004	52.031	0.000
RESIDUAL	194847.499	48	4059.323		
TOTAL	617265.507	50			

Dependent Variable = Sangre
 Number of obs. = 51
 Multiple R = 0.8272
 R-square = 0.6843
 Adjusted R-square = 0.6712
 F(2, 48) = 52.0306
 Prob > F = 0.0000
 Std. Error of Est. = 63.7128
 Durbin-Watson Stat.= 2.0050

=====REGRESSION COEFFICIENTS=====

VARIABLE	B	ORDINARY		HETERO-SCEDASTIC		t	p
		STD. ERROR	STD. ERROR	BETA			
Intercept	41.685	22.791	34.135		1.221	0.228	
Orina	-0.003	0.266	0.349	-0.003	-0.008	0.994	
Humor	0.776	0.269	0.340	0.830	2.285	0.027	

El modelo planteado, significativo estadísticamente, en forma de ecuación, resulta ser el siguiente:

$$\text{Sangre} = 41.685 - 0.003 * \text{Orina} + 0.776 * \text{Humor}$$

Este modelo tiene una correlación de alrededor de 68% en el coeficiente de correlación y 67% en su parámetro ajustado, por lo que se podría estimar con esta precisión la concentración hemática de etanol si es que se alimentan al modelo los datos de concentración de orina y humor vítreo. Sin embargo, por los valores obtenidos de *p-value*, el modelo 1 se podría mejorar retirando la variable *orina* del análisis (por un *p-value* >> 0.05) y ajustando un modelo con las variables *sangre vs. humor vítreo*. Sin embargo, de este análisis resultaría un modelo de regresión lineal, el cual ya se ha demostrado que es significativo y explicativo en los análisis realizados previamente (*tablas 3 y 4*).

Modelo 2. Regresión de las variables de concentraciones de etanol en *humor vítreo* y *líquido sinovial* con la variable dependiente concentración de etanol en *sangre*.

ANALYSIS OF VARIANCE

Source	SUM OF SQUARES	DF	MEAN SQUARES	F	p
REGRESSION	174575.739	2	87287.869	34.200	0.000
RESIDUAL	53597.903	21	2552.281		
TOTAL	228173.641	23			

Dependent Variable = Sangre
 Number of obs. = 24
 Multiple R = 0.8747
 R-square = 0.7651
 Adjusted R-square = 0.7427
 F(2, 21) = 34.1999
 Prob > F = 0.0000
 Std. Error of Est. = 50.5201
 Durbin-Watson Stat.= 2.2680

=====REGRESSION COEFFICIENTS=====

VARIABLE	B	ORDINARY STD. ERROR	HETERO- SCEDASTIC STD. ERROR	BETA	t	p
Intercept	14.120	29.181	44.837		0.315	0.756
Humor	0.427	0.168	0.958	0.435	0.445	0.661
Sinovial	0.492	0.171	0.860	0.491	0.572	0.574

El modelo planteado, significativo estadísticamente, en forma de ecuación, resulta ser el siguiente:

$$\text{Sangre} = 14.120 + 0.427 * \text{Humor} + 0.492 * \text{Sinovial}$$

Este modelo tiene una correlación de alrededor de 77% en el coeficiente de correlación y 74% en su parámetro ajustado, por lo que se podría estimar con mayor precisión que el modelo anterior la concentración hemática de etanol si es que se alimentan al modelo los datos de concentración de humor vítreo y líquido sinovial. Sin embargo, por los valores obtenidos de *p-value*, el modelo 2 se podría mejorar retirando la variable *humor vítreo* del análisis (por tener el mayor *p-value*) y ajustando un modelo con las variables *sangre vs. líquido sinovial*, aunque de este resultaría un modelo de regresión lineal, el cual ya se ha demostrado que es significativo y explicativo en los análisis realizados previamente (*tablas 3 y 4*).

Modelo 3. Regresión de las variables de concentraciones de etanol en *orina, humor vítreo y líquido sinovial* con la variable dependiente concentración de etanol en *sangre*.

ANALYSIS OF VARIANCE
=====

Source	SUM OF SQUARES	DF	MEAN SQUARES	F	p
REGRESSION	172408.404	3	57469.468	31.417	0.000
RESIDUAL	25609.130	14	1829.224		
TOTAL	198017.534	17			

Dependent Variable = Sangre
 Number of obs. = 18
 Multiple R = 0.9331
 R-square = 0.8707
 Adjusted R-square = 0.8430
 F(3, 14) = 31.4174
 Prob > F = 0.0000
 Std. Error of Est. = 42.7694
 Durbin-Watson Stat.= 2.2068

=====REGRESSION COEFFICIENTS=====

VARIABLE	B	ORDINARY	HETERO-	BETA	t	p
		STD. ERROR	SCEDASTIC			
Intercept	-56.064	33.086	37.237		-1.506	0.154

Orina	0.786	0.349	0.360	0.831	2.181	0.047
Humor	-0.491	0.402	0.942	-0.480	-0.521	0.610
Sinovial	0.749	0.165	0.903	0.652	0.830	0.421

El modelo planteado, significativo estadísticamente, en forma de ecuación, resulta ser el siguiente:

$$\text{Sangre} = -56.06 + 0.786 * \text{Orina} - 0.491 * \text{Humor} + 0.749 * \text{Sinovial}$$

Este modelo tiene una correlación de alrededor del 85%, tanto en el coeficiente de correlación como en su parámetro ajustado, por lo que se podría estimar con bastante precisión la concentración hemática de etanol si es que se alimentan al modelo los datos de concentración de orina, humor vítreo y líquido sinovial. Esta fórmula podría ser de utilidad para los investigadores forenses en caso de que no esté disponible una muestra sanguínea, pero se pueda determinar el contenido alcohólico en orina y en compartimentos poco comunes, como el ojo para la obtención de humor vítreo y la rodilla para la extracción de líquido sinovial.

Sin embargo, por los valores obtenidos de *p-value*, el modelo 3 se podría mejorar retirando la variable *humor vítreo* del análisis (por tener el mayor *p-value*) y ajustando un modelo con las variables *sangre vs. orina y líquido sinovial*. A pesar de ello, se destaca que la variable *líquido sinovial* tiene también un *p-value* alto ($p \gg 0.05$), por lo que la única variable significativa resultará ser *orina*, que con respecto a la variable *sangre*, resultará una regresión lineal que ya se ha probado previamente y es significativa en los análisis anteriores (*tablas 3 y 4*).

Adicionalmente, y dado que se encontraron también variables correlacionadas con la concentración de etanol en orina en la matriz de correlación, se realizó un modelo de regresión múltiple con la concentración en orina como variable dependiente, mostrado a continuación:

Modelo 4. Regresión de las variables de concentraciones de etanol en *sangre, humor vítreo e hígado* con la variable dependiente concentración de etanol en *orina*.

ANALYSIS OF VARIANCE

Source	SUM OF SQUARES	DF	MEAN SQUARES	F	p
REGRESSION	651468.369	3	217156.123	176.481	0.000
RESIDUAL	55371.551	45	1230.479		
TOTAL	706839.920	48			

Dependent Variable = Orina
 Number of obs. = 49
 Multiple R = 0.9600
 R-square = 0.9217
 Adjusted R-square = 0.9164
 F(3, 45) = 176.4810
 Prob > F = 0.0000
 Std. Error of Est. = 35.0782
 Durbin-Watson Stat.= 1.8974

=====REGRESSION COEFFICIENTS=====

VARIABLE	B	HETERO-SCEDASTIC		BETA	t	p
		ORDINARY STD. ERROR	STD. ERROR			
Intercept	38.965	12.060	13.889		2.806	0.007
Sangre	-0.015	0.082	0.137	-0.014	-0.111	0.912
Humor	0.978	0.094	0.116	0.972	8.434	0.000
Higado	-0.000	0.070	0.201	-0.000	-0.001	0.999

El modelo planteado, significativo estadísticamente, en forma de ecuación, resulta ser el siguiente:

$$\text{Orina} = 38.965 - 0.015 \cdot \text{Sangre} + 0.978 \cdot \text{Humor} - 0.000 \cdot \text{Hígado}$$

Este modelo tiene una correlación de alrededor del 92%, tanto en el coeficiente de correlación como en su parámetro ajustado, por lo que se podría estimar con precisión la concentración de etanol en orina, para inferir la eliminación, si es que se alimentan al modelo los datos de concentración de sangre y humor vítreo, ya que el coeficiente para los datos de

concentración hepática no fueron significativos y se estimó su contribución al modelo en 0.000. Debido a que el valor de p del coeficiente de regresión para hígado fue prácticamente 1, se procedió a realizar la eliminación de esta variable con el fin de intentar mejorar el ajuste de los datos al modelo, mostrado en el modelo 5.

Adicionalmente, a manera de ejemplificación sobre los análisis de residuales realizados con los modelos de regresión múltiple explicados en esta sección, se muestra en la *figura 26* las gráficas de los residuales del modelo 4. En el panel *a* se puede observar que los residuales se distribuyen de manera normal, por mostrar un buen ajuste a la recta, cumpliendo los supuestos de normalidad de residuales del modelo. Por otro lado, en el panel *b* se observa que la gráfica Q-Q (cuantil-cuantil) en general también exhibe un buen ajuste a la recta. Sin embargo, en este último panel se destaca un sesgo hacia la no normalidad en las estimaciones de mayor valor.

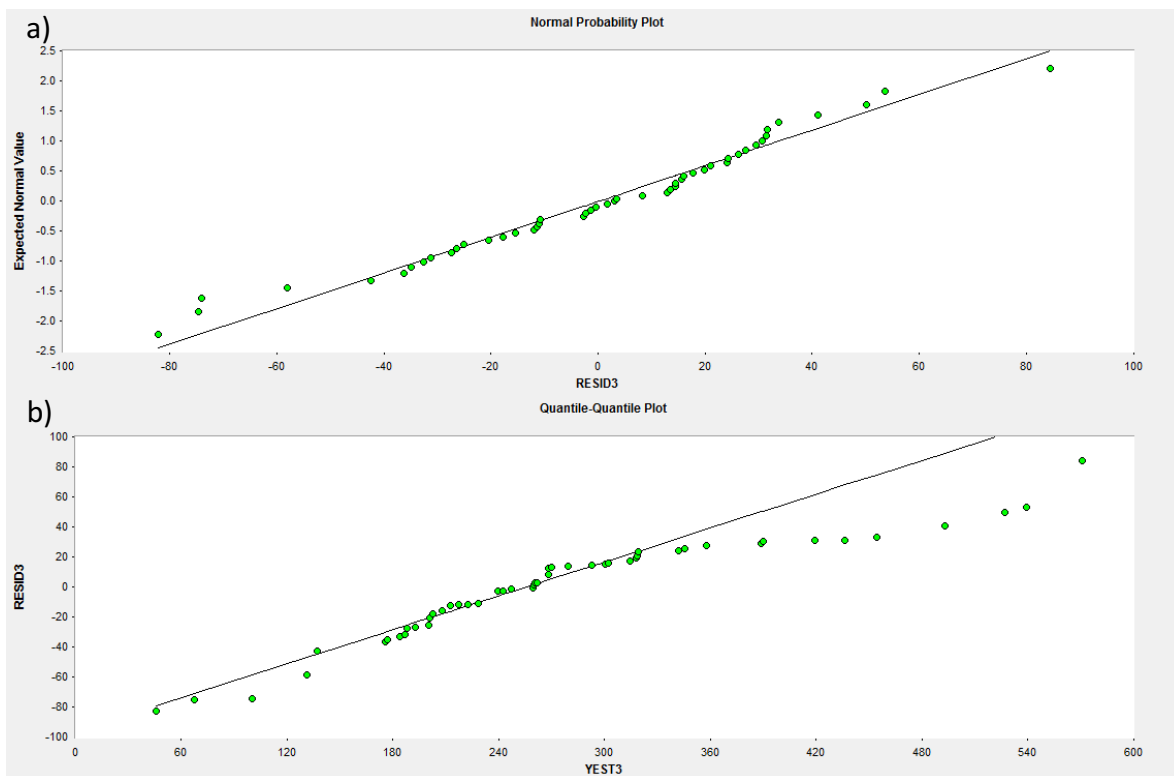


Fig. 26. Análisis de residuales obtenidos de la regresión lineal múltiple de las variables explicativas de concentración de etanol en sangre, humor vítreo e hígado vs. concentración de etanol en orina.

a) Gráfica de probabilidad normal de los residuales.

b) Gráfica Q-Q de los valores estimados por la regresión contra los residuales del modelo.

Modelo 5. Regresión de las variables de concentraciones de etanol en *sangre y humor vítreo* con la variable dependiente concentración de etanol en *orina*.

ANALYSIS OF VARIANCE

Source	SUM OF SQUARES	DF	MEAN SQUARES	F	p
REGRESSION	665124.561	2	332562.281	278.076	0.000
RESIDUAL	57405.039	48	1195.938		
TOTAL	722529.601	50			

Dependent Variable = Orina
 Number of obs. = 51
 Multiple R = 0.9595
 R-square = 0.9205
 Adjusted R-square = 0.9172
 F(2, 48) = 278.0764
 Prob > F = 0.0000
 Std. Error of Est. = 34.5823
 Durbin-Watson Stat.= 2.0285

=====REGRESSION COEFFICIENTS=====

VARIABLE	B	ORDINARY		HETERO-		p
		STD. ERROR	STD. ERROR	BETA	t	
Intercept	36.805	11.640	12.906		2.852	0.006
Sangre	-0.001	0.078	0.107	-0.001	-0.008	0.994
Humor	0.971	0.073	0.079	0.960	12.352	0.000

El modelo planteado, significativo estadísticamente, en forma de ecuación, resulta ser el siguiente:

$$\text{Orina} = 36.805 - 0.001 * \text{Sangre} + 0.971 * \text{Humor}$$

Este nuevo modelo no presenta una mejoría notable respecto al modelo anterior (modelo 4), ya que la correlación permaneció alrededor del 92%, tanto en el coeficiente de correlación como en su parámetro ajustado. No obstante, es de notar que se podría estimar con bastante precisión la concentración de etanol en *orina*, para estimar eliminación del compuesto tóxico, si es que se alimentan al modelo los datos de concentración de *sangre y humor vítreo*.

Sin embargo, en este escenario el coeficiente de regresión de la variable *sangre* resulta prácticamente 0 y muy poco significativo ($p = 0.994$), por lo que con el fin de mejorar el modelo se procede a retirar esta variable. Con esto, el modelo de regresión lineal univariada de la variable *orina* contra *humor vítreo*, significativo estadísticamente, en forma de ecuación resulta ser el siguiente:

$$\text{Orina} = 36.770 + 0.970 \cdot \text{Humor}$$

Dado que al final, este último modelo resulta ser una regresión lineal, es posible graficar los datos, mostrados en la *figura 27*. En esta figura se puede visualizar una correlación con buen ajuste ($R^2 = 92.06\%$), a pesar de que los coeficientes no cambiaron de manera notoria si se analizan los modelos de regresión lineal múltiple para la variable dependiente *orina* con las variables explicativas *humor vítreo*, *sangre* e *hígado*. Es altamente probable que estas variables se encuentren relacionadas desde la perspectiva de la actividad metabólica y de depuración de la sustancia.

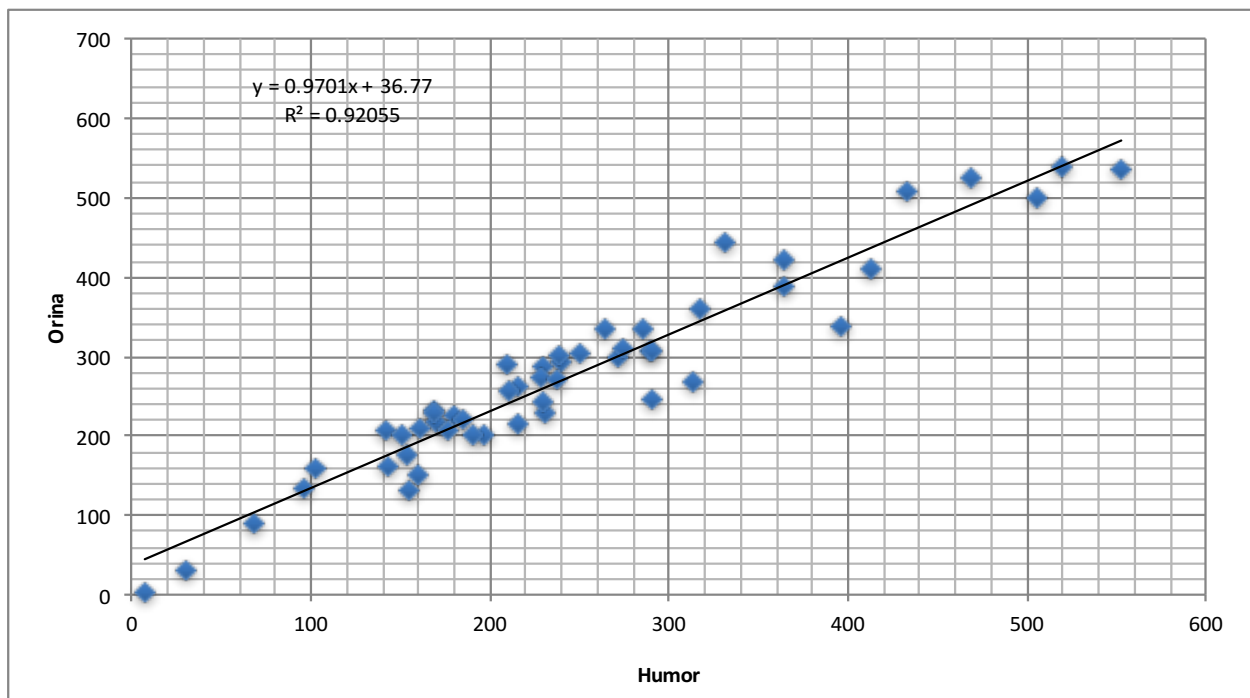


Fig. 27. Gráfica de correlación mediante regresión lineal de las variables concentración de alcohol en humor vítreo [mg/100 mL] vs. concentración en orina [mg/100 mL].

Este último modelo podría ser de utilidad para los científicos forenses, principalmente con fines de investigación, para la correlación de concentración sanguínea y urinaria en caso de que se desee estimar la eliminación renal de etanol, siempre y cuando sea posible determinar el contenido alcohólico en sangre y en compartimentos poco comunes, como el ojo para la obtención de humor vítreo. Este modelo sería más relevante en caso de conocer otras variables, como la hora de muerte y el último tiempo de consumo de etanol antes de la muerte, lo cual podría ser estudiado y confirmado en investigaciones futuras.

Como mejoras a los modelos estadísticos de regresión lineal simple y múltiple analizados anteriormente, se plantea la consideración del tiempo transcurrido desde la última ingesta hasta la muerte y la cantidad de alcohol ingerida, que como se ha comentado previamente, son datos difíciles de obtener en el contexto forense. Adicionalmente es relevante incluir la aportación de las variables *género*, *edad* y *peso*, las cuales serán analizadas más adelante como parte de las ecuaciones estructurales modeladas para este trabajo.

c. Modelos estructurales (SEM)

Tras estudiar y cuantificar la relación entre variables individuales y múltiples, se probaron distintos modelos de ecuaciones estructurales para el estudio del impacto de las variables demográficas (*edad*, *género* y *peso*) sobre los datos de concentraciones de etanol en los distintos fluidos biológicos. Tras probarse varios escenarios con factores latentes, variables cuantificadas, interrelaciones diferentes entre ellas, y conectando las variables demográficas como explicativas, muchos modelos resultaron no significativos o sobre-definidos. Sin embargo, en las *figuras 28, 29 y 30* se presentan los diagramas de senderos de algunos modelos que resultaron ser significativos y explicativos, con base en los parámetros de bondad de ajuste del modelo (*p-value* y el RMSEA), así como en la significancia de sus variables.

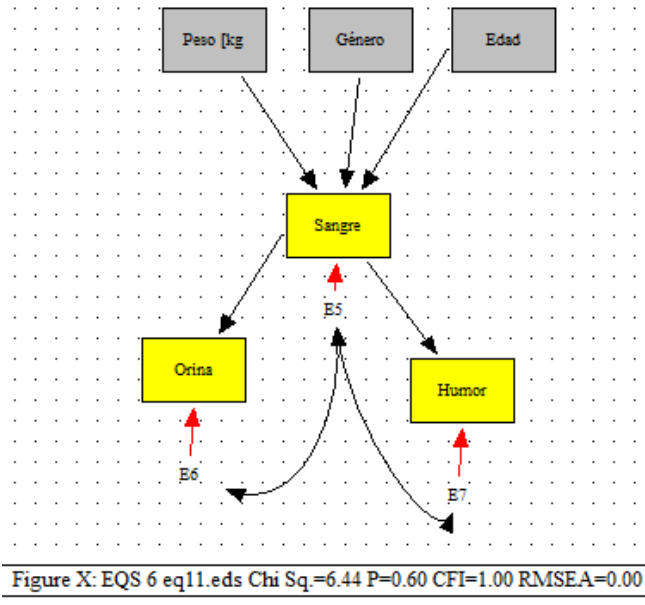


Fig. 28. Diagrama de senderos para SEM con un escenario planteado sobre el impacto de las variables demográficas en la alcoholemia, y a su vez ésta impactando la concentración en orina y humor vítreo.

Los errores de las 3 variables explicadas se plantearon covariantes entre ellos. El modelo mostrado en la *figura 28*, en forma de ecuaciones, se asignó sólo con variables medidas y resulta ser el siguiente:

$$\text{Sangre} = \text{Peso} + \text{Género} + \text{Edad} + \text{Error}$$

$$\text{Orina} = \text{Sangre} + \text{Error}$$

$$\text{Humor} = \text{Sangre} + \text{Error}$$

El resumen de los parámetros de bondad de ajuste arrojados para el modelo una vez ejecutado fueron los siguientes:

GOODNESS OF FIT SUMMARY FOR METHOD = ML

INDEPENDENCE MODEL CHI-SQUARE = 144.102 ON 15 DEGREES OF FREEDOM

INDEPENDENCE AIC = 114.102 INDEPENDENCE CAIC = 74.149

MODEL AIC = -9.564 MODEL CAIC = -30.872

CHI-SQUARE = 6.436 BASED ON 8 DEGREES OF FREEDOM
 PROBABILITY VALUE FOR THE CHI-SQUARE STATISTIC IS .59848

THE NORMAL THEORY RLS CHI-SQUARE FOR THIS ML SOLUTION IS 6.375.

FIT INDICES

```

-----
BENTLER-BONETT      NORMED FIT INDEX =      .955
BENTLER-BONETT NON-NORMED FIT INDEX =      1.023
COMPARATIVE FIT INDEX (CFI) =      1.000
BOLLEN'S           (IFI) FIT INDEX =      1.011
MCDONALD'S        (MFI) FIT INDEX =      1.020
JORESKOG-SORBOM'S GFI FIT INDEX =      .947
JORESKOG-SORBOM'S AGFI FIT INDEX =      .861
ROOT MEAN-SQUARE RESIDUAL (RMR) =      86.348
STANDARDIZED RMR =      .099
ROOT MEAN-SQUARE ERROR OF APPROXIMATION (RMSEA) =      .000
90% CONFIDENCE INTERVAL OF RMSEA (      .000,      .162)

```

RELIABILITY COEFFICIENTS

```

-----
CRONBACH'S ALPHA =      .740

```

De acuerdo a los indicadores de ajuste, se puede concluir que el modelo es bueno y explica la variable de respuesta, ya que en la prueba de χ^2 , el estadístico de prueba es no significativo; el índice de Bentler-Bonett resultó mayor a 0.95; el RMSEA es de 0.000, con un IC al 90% de (0.000, 0.162); el alfa de Cronbach es mayor a 0.70, lo cual indica que el modelo es confiable; sin embargo, el RMR es un valor pequeño, aunque mayor que 0.08, lo cual puede indicar que el modelo tiene oportunidad de mejora en el ajuste (Hox & Bechger, 2007). Finalmente, las ecuaciones de este modelo resultaron como se describen a continuación, donde se indican también los coeficientes de correlación R^2 corregidos de Bentler-Raykov entre las variables dependientes y los predictores.

$$\text{Sangre} = 0.35 * \text{Peso} + 0.14 * \text{Género} - 0.08 * \text{Edad} + 0.999 * \text{Error}$$

$$[R^2 = 0.001]$$

$$\text{Orina} = -0.444 * \text{Sangre} + 1.362 * \text{Error}$$

$$[R^2 = 0.550]$$

$$\text{Humor} = 1.102 * \text{Sangre} + 0.719 * \text{Error}$$

$$[R^2 = 0.593]$$

Como se puede deducir por los coeficientes de correlación calculados para el modelo de ecuaciones estructurales propuesto, la variable dependiente *Sangre* no es bien descrita por las

variables demográficas *género, edad y peso*, lo cual era de esperarse ya que la población de estudio prácticamente estuvo compuesta sólo de cadáveres masculinos.

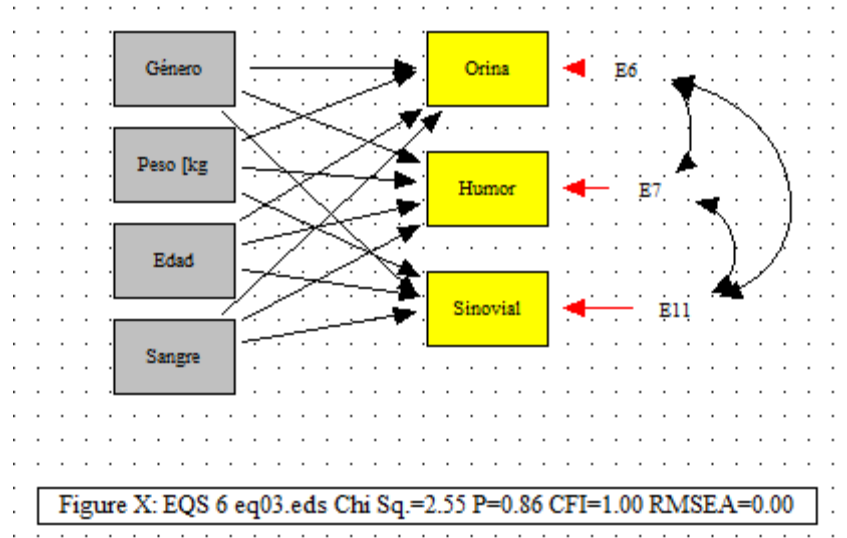


Fig. 29. Diagrama de senderos para SEM con un escenario planteado sobre el impacto de las variables demográficas y la alcoholemia en la concentración de etanol en orina, humor vítreo y líquido sinovial.

El modelo mostrado en la *figura 29*, en forma de ecuaciones, se asignó sólo con variables medidas y resulta ser el siguiente:

$$\text{Orina} = \text{Sangre} + \text{Peso} + \text{Género} + \text{Edad} + \text{Error}$$

$$\text{Humor} = \text{Sangre} + \text{Peso} + \text{Género} + \text{Edad} + \text{Error}$$

$$\text{Sinovial} = \text{Sangre} + \text{Peso} + \text{Género} + \text{Edad} + \text{Error}$$

Se planteó que los errores de las 3 variables explicadas fueran covariantes entre ellos. El resumen de los parámetros de bondad de ajuste arrojados para el modelo una vez ejecutado fueron los siguientes:

GOODNESS OF FIT SUMMARY FOR METHOD = ML

INDEPENDENCE MODEL CHI-SQUARE = 96.074 ON 21 DEGREES OF FREEDOM

INDEPENDENCE AIC = 54.074 INDEPENDENCE CAIC = 21.210
 MODEL AIC = -9.451 MODEL CAIC = -18.841

CHI-SQUARE = 2.549 BASED ON 6 DEGREES OF FREEDOM
 PROBABILITY VALUE FOR THE CHI-SQUARE STATISTIC IS .86293
 THE NORMAL THEORY RLS CHI-SQUARE FOR THIS ML SOLUTION IS 2.246.

FIT INDICES

```

-----
BENTLER-BONETT      NORMED FIT INDEX =      .973
BENTLER-BONETT NON-NORMED FIT INDEX =    1.161
COMPARATIVE FIT INDEX (CFI)           =    1.000
BOLLEN'S           (IFI) FIT INDEX     =    1.038
MCDONALD'S        (MFI) FIT INDEX     =    1.142
JORESKOG-SORBOM'S GFI FIT INDEX       =    .949
JORESKOG-SORBOM'S AGFI FIT INDEX      =    .763
ROOT MEAN-SQUARE RESIDUAL (RMR)       =   160.536
STANDARDIZED RMR                               =    .110
ROOT MEAN-SQUARE ERROR OF APPROXIMATION (RMSEA) =    .000
90% CONFIDENCE INTERVAL OF RMSEA (    .000,    .190)
    
```

RELIABILITY COEFFICIENTS

```

-----
CRONBACH'S ALPHA =    .808
    
```

El modelo, como se observa arriba, se identifica como bueno y explica las tres variables de respuesta, ya que en la prueba de χ^2 , el estadístico de prueba es no significativo; el índice de Bentler-Bonett resultó mayor a 0.95; el RMSEA es de 0.000, con un IC al 90% de (0.000, 0.190); el alfa de Cronbach es 0.808, lo cual indica que el modelo es confiable. Sin embargo, el RMR estandarizado es un valor mayor que 0.08, lo cual puede indicar que el modelo tiene oportunidad de mejora en el ajuste (Hox & Bechger, 2007). Finalmente, las ecuaciones del modelo resultaron como se describen a continuación, donde se indican también los coeficientes de correlación R^2 corregidos de Bentler-Raykov entre las variables dependientes y los predictores entre corchetes:

$$\text{Orina} = 0.756 \cdot \text{Sangre} + 0.039 \cdot \text{Peso} - 0.047 \cdot \text{Género} + 0.087 \cdot \text{Edad} + 0.646 \cdot \text{Error}$$

$$[R^2 = 0.582]$$

$$\text{Humor} = 0.713 \cdot \text{Sangre} + 0.019 \cdot \text{Peso} - 0.150 \cdot \text{Género} - 0.022 \cdot \text{Edad} + 0.684 \cdot \text{Error}$$

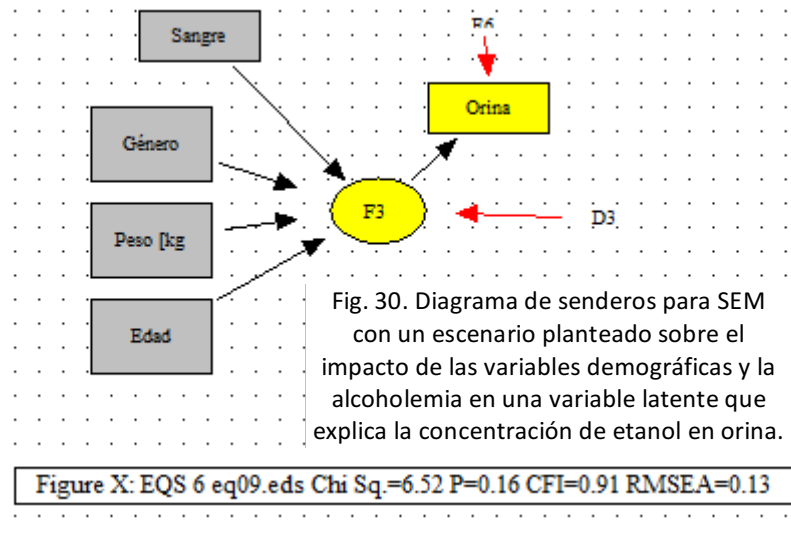
$$[R^2 = 0.532]$$

$$\text{Sinovial} = 0.882 \cdot \text{Sangre} - 0.081 \cdot \text{Peso} + 0.161 \cdot \text{Género} - 0.100 \cdot \text{Edad} + 0.425 \cdot \text{Error}$$

$$[R^2 = 0.819]$$

Como se puede deducir por los coeficientes de correlación calculados para el modelo de ecuaciones estructurales propuesto, las variables dependientes *orina*, *humor* y *sinovial* son descritas por las variables demográficas *género*, *edad*, *peso* y *sangre*. De las tres variables dependientes analizadas, la que mejor se explica por las variables predictoras es la concentración de etanol en líquido sinovial, como se observa en el coeficiente de correlación R^2 .

Se probaron también modelos de ecuaciones estructurales con factores (variables latentes) entre las variables demográficas y las concentraciones de etanol en fluidos. Sin embargo, dichos modelos ajustados, como el mostrado en la *Figura 30*, muestran valores de AIC



inferiores a los de los modelos de las *Figuras 28* y *29*, así como criterios de bondad de ajuste que indican un modelo de menor calidad que los anteriores (índices de Bentler-Bonett menores a 0.95; RMSEA y RMR altos; alfas de Cronbach menores a 0.70, etc.), lo cual indica que los modelos no son confiables ni explicativos, a diferencia de los anteriormente expuestos.

En conclusión sobre el modelamiento de ecuaciones estructurales, este método es muy útil para las ciencias cuantitativas, en donde existe la posibilidad de modelar variables latentes o factores no cuantificados que explican parte de las variables de respuesta. No obstante, para ello es esencial comprender y analizar los parámetros explicativos de las ecuaciones estructurales, así como las medidas de bondad de ajuste, para poder discernir entre un buen modelo y un modelo que no se explica adecuadamente con las ecuaciones propuestas.

Mediante la integración de diversas herramientas estadísticas, como la regresión lineal simple, múltiple, correlaciones matriciales, análisis de factores, entre otras, es posible resolver y

proponer diversos sistemas para explicar variables a través de factores latentes y variables cuantificadas. Sin embargo, para poder proponer dichos modelos inicialmente es necesaria una comprensión profunda del problema, de las variables y del campo de estudio, ya que la interpretación de los resultados es uno de los puntos críticos para poder generar un sistema de ecuaciones estructurales explicativo, significativo y útil para la investigación.

5. Conclusiones y perspectivas

La investigación forense en nuestro país y en el mundo emplea de manera rutinaria el análisis de etanol en sangre como prueba para confirmar ingesta y/o intoxicación alcohólica para una correcta impartición de justicia. Sin embargo, en algunos casos los investigadores se enfrentan a la falta de muestra hemática para poder realizar este análisis químico. Es por eso que es relevante y justificable realizar esfuerzos en el área de la toxicología aplicada, complementada con herramientas estadísticas, para poder contribuir con conocimiento y evidencias de soporte en este tema.

A través del presente trabajo fue posible realizar un análisis y correlación de concentración de etanol de diferentes fluidos (orina, humor vítreo, líquido sinovial y bilis) y tejidos (hígado, músculo-esquelético, pulmón, páncreas) para compararlos con la concentración de etanol en sangre, el cual es el estándar de oro en toxicología forense.

Como se confirmó gracias a la aplicación de múltiples pruebas estadísticas, los resultados son explicables con base en la toxicocinética del etanol y el metabolismo o almacenamiento de cada fluido y tejido, además de que se confirma la utilidad de otros tejidos y fluidos biológicos para evaluar y determinar intoxicación alcohólica en ausencia de sangre. Sin embargo, y como se ha comentado previamente, es relevante el conocimiento preciso sobre el tiempo y patrón de consumo de las bebidas alcohólicas antes de la muerte, datos que en contadas ocasiones se obtienen, por lo cual se hace necesario recurrir a estimadores de contenido etílico en sangre a través de modelos predictivos a partir de otros fluidos o tejidos.

A través de un catálogo de técnicas estadísticas, como análisis de concordancia de métodos, regresión lineal simple, no lineal, múltiple, correlación y modelamiento por ecuaciones estructurales, los resultados obtenidos en el presente trabajo retoman la

información reportada y aportan nuevo conocimiento al campo, con sustento científico toxicológico y evidencia estadística.

Finalmente, respondiendo a las preguntas de investigación sobre si será posible establecer una relación de concentraciones de etanol entre fluidos y tejidos, se confirma que a través de métodos de regresión y correlación de variables con referencia a la concentración en sangre, se ha logrado establecer parámetros numéricos de correlación entre la concentración de etanol en 7 diferentes tejidos y fluidos corporales. Por lo demás, en respuesta a la segunda pregunta sobre si es posible sustituir con confianza estadística la muestra hemática en caso de escasez o contaminación por algún otro tejido o fluido, con los resultados derivados del trabajo aquí expuesto se han planteado modelos matemáticos significativos y explicativos para estimar la concentración de etanol en sangre a partir de los otros fluidos cuantificados. Sin embargo, y como perspectiva para este proyecto, se considera necesario explorar más posibilidades con datos de etanol en otros fluidos, así como incrementar el tamaño de muestra estudiado y ampliar el perfil demográfico de los sujetos incluidos en el estudio observacional, para robustecer los análisis estadísticos propuestos mediante este análisis.

Adicionalmente, es necesaria una evaluación y validación de los modelos, para lo cual para un futuro proyecto, se plantea la continuación de la colecta de valores de concentración de etanol en fluidos contra los datos sanguíneos. De esta forma, será posible un análisis y comparación estadística de los valores de concentración calculados contra medidos en los diversos modelos propuestos para determinación de alcoholemia. Esto posibilitará un mayor soporte científico y estadístico para la estimación de la concentración de etanol en sangre con fines legales y forenses a partir de otros tejidos o fluidos. No obstante, este proyecto aporta un grano de arena en un campo del conocimiento interdisciplinario, con el fin de resolver problemas y situaciones prácticas de la vida real mediante el conocimiento aplicado de la estadística.

6. Referencias

- Alexander, W. (1998). Postmortem urinary alcohol is unreliable in diabetes (Letter). *BMJ*, 317(206). Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1136/bmj.317.7152.206a>
- Alvarado Guevara, A. T., Raudales García, I., & Vega Ramirez, J. P. (2008). Determinación de alcohol post-mortem: Aspectos a considerar para una mejor interpretación. *Medicina Legal de Costa Rica*, 25(2), 35–46. doi:1409-0015
- Athanaselis, S., Stefanidou, M., & Koutselinis, A. (2005). Interpretation of postmortem alcohol concentrations. *Forensic Science International*, 149, 289–291. doi:10.1016/j.forsciint.2003.04.001
- Bland, J. M., & Altman, D. G. (1999). Measuring agreement in method comparison studies. *Statistical Methods in Medical Research*, 8(2), 135–160. doi:10.1191/096228099673819272
- Calabuig, J. A. G., & Villanueva Cañadas, E. (2004). *Medicina Legal y Toxicología* (6ta ed.). Elsevier.
- CECA. (2012). *Accidentes de tránsito y consumo de alcohol*. Retrieved from <http://www.ssm.gob.mx/portal/page/adicciones/nvo/Alcohol/8>. Accidentes De Transito y Consumo De Alcohol.pdf
- CEVECE. (2012). *Accidentes y alcoholismo*.
- Cox, D. E., Sadler, D. W., & Pounder, D. J. (1997). Alcohol estimation at necropsy: epidemiology, economics, and the elderly. *Journal of Clinical Pathology*, 50, 197–201. doi:10.1136/jcp.50.9.796-b
- de la Garza García, J., Morales Serrano, B. N., & González Cavazos, B. A. (2013). *Análisis Estadístico Multivariante. Un enfoque teórico y practico* (1ra ed.). México: McGraw Hill.
- De Martinis, B. S., de Paula, C. M. C., Braga, A., Moreira, H. T., & Martin, C. C. S. (2006). Alcohol distribution in different postmortem body fluids. *Human & Experimental Toxicology*, 25, 93–97. doi:10.1191/0960327106ht596oa
- Fernandez, E., & Doty, C. I. (2015). Ethanol Toxicity. Retrieved June 20, 2005, from <http://emedicine.medscape.com/article/1010220-overview#a5>
- Ferrari, L. A. (2008). Análisis toxicológico de etanol y su interpretación forense. *Ciencia Forense Latinoamericana*, 2(1-2), 20–35.
- Ferrari, L. A., Triszcz, J. M., & Giannuzzi, L. (2006). Kinetics of ethanol degradation in forensic blood samples. *Forensic Science International*, 161(2-3), 144–150. doi:10.1016/j.forsciint.2006.02.049
- French, M. T., Norton, E. C., Fang, H. A. I., & Maclean, J. C. (2010). ALCOHOL CONSUMPTION AND BODY WEIGHT. *HEALTH ECONOMICS*, 832(June 2009), 814–832. doi:10.1002/hec
- Gordon, M. (2015). Medical Pharmacology and Disease-Based Integrated Instruction. Retrieved June 20, 2006, from <http://www.pharmacology2000.com/>
- Harris, R. A., Trudell, J., & Mihic, J. (2008). Ethanol's Molecular Targets. *Sci Signal*, 1(28), 1–11. doi:10.1126/scisignal.128re7.Ethanol
- Helander, A., Bottcher, M., Fehr, C., Dahmen, N., & Beck, O. (2009). Detection times for urinary ethyl glucuronide and ethyl sulfate in heavy drinkers during alcohol detoxification. *Alcohol and Alcoholism*, 44(1), 55–61. doi:10.1093/alcalc/agn084
- Hodgson, E. (2004). *a Textbook of Modern Toxicology* (3rd editio). John Wiley & Sons, Inc.

doi:10.1002/0471646776

- Holford, N. H. G. (1987). Clinical Pharmacokinetics of Ethanol. *Clinical Pharmacokinetics*, 13(5), 273–292. doi:10.2165/00003088-198713050-00001
- Honey, D., Caylor, C., Luthi, R., & Kerrigan, S. (2005). Comparative alcohol concentrations in blood and vitreous fluid with illustrative case studies. *Journal of Analytical Toxicology*, 29, 365–369.
- Hox, J. J., & Bechger, T. M. (2007). Introduction to Structural Equation Modeling. *Family Science Review*, 11, 354–373. doi:10.1080/10705510903008345
- INPRFM. (2012). *Encuesta Nacional de Adicciones 2011 Drogas Ilícitas*. Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz / Secretaría de Salud. Retrieved from http://www.conadic.salud.gob.mx/pdfs/ENA_2011_DROGAS_ILICITAS_.pdf
- Instituto Nacional de Salud Pública. (2012). *Evidencia para la política pública en salud. Consumo de alcohol en México 2000-2012: estrategias mundiales para reducir su uso nocivo. Documentos analíticos de la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2012*. Retrieved from <http://ensanut.insp.mx/doctos/analiticos/ConsumoAlcohol.pdf>
- Johnson, R., Lewis, R., Angier, M., & Vu, N. (2004). The Formation of Ethanol in Postmortem Tissues. *Office of Aerospace Medicine*, (February). Retrieved from <http://oai.dtic.mil/oai/oai?verb=getRecord&metadataPrefix=html&identifier=ADA423300>
- Jones, A. W. (2010). Evidence-based survey of the elimination rates of ethanol from blood with applications in forensic casework. *Forensic Science International*, 200(1-3), 1–20. doi:10.1016/j.forsciint.2010.02.021
- Jones, A. W. (2011). Pharmacokinetics of ethanol: issues of forensic importance. *Forensic Sci Rev*, (July), 91–136. Retrieved from <http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Pharmacokinetics+of+Ethanol+?+Issues+of+Forensic+Importance#2\http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Pharmacokinetics+of+ethanol:+issues+of+forensic+importance#2>
- Jones, A. W., & Holmgren, P. (2001). Uncertainty in estimating blood ethanol concentrations by analysis of vitreous humour. *Journal of Clinical Pathology*, 54, 699–702. doi:10.1136/jcp.54.9.699
- Kent, W. (2012). The Pharmacokinetics of Alcohol in Healthy Adults. *WebmedCentral*, 3, 1–8. doi:10.9754/journal.wmc.2012.003291
- Kugelberg, F. C., & Jones, A. W. (2007). Interpreting results of ethanol analysis in postmortem specimens: A review of the literature. *Forensic Science International*. doi:10.1016/j.forsciint.2006.05.004
- Kurzejamska-Parafiniuk, M., Wolski, S., Mikołajczak, A., Stańczyk, J., & Czechowski, W. (2007). Comparative tests of ethyl alcohol concentrations in blood, vitreous body of an eye and urine collected from a corpse. *Annales Academiae Medicae Stetinensis*, 53 Suppl 2, 166–169; discussion 169.
- Lieber, C. S. (1977). Metabolism and Metabolic Actions of Ethanol. In N. Freinkel (Ed.), *The Year in Metabolism* (pp. 411–434). Plenum Publishing Corporation.
- Majchrowicz, E., Pietruszko, R., Roach, M. K., & Plapp, B. V. (1975). Biochemical pharmacology of ethanol. In E. Majchrowicz (Ed.), *Proceedings of the American Chemical Society symposium on Biochemical Pharmacology of Ethanol* (1st ed., Vol. 56). New York: Advances in Experimental Medicine And Biology. doi:10.1017/CBO9781107415324.004

- Menshawi, S., & Al-Alousi, L. M. (2007). Detection of Alcohol in Different Post-Mortem Samples. *Naif Arab University for Security Sciences*. Retrieved from <http://hdl.handle.net/123456789/56406>
- Motulsky, A., & Christopoulos, H. (2003). *Fitting Models to Biological Data using Linear and Nonlinear Regression. A practical guide to curve fitting*. GraphPad Software, Inc. (2nd ed.). San Diego, CA: GraphPad Software, Inc. doi:10.1002/pst.167
- Özgür Can, İ., Özkara, E., Salaçin, S., & Gümüştekin, M. (2012). Importance of Sampling Sites for Postmortem Evaluation of Ethyl Alcohol. *Journal of Forensic Research*, 01(7). doi:10.4172/2157-7145.1000156
- Papierz, P., Berent, J., Markuszewski, L., & Szram, S. (2004). A Comparative Study Of The Ethyl Alcohol Concentration In Vitreous Humor In Relation To Ethyl Alcohol Concentration In. *Problems of Forensic Sciences*, 58, 34–44. Retrieved from http://www.forensicscience.pl/pfs/58_papierz.pdf
- Pizon, A. F., Becker, C. E., & Bikin, D. (2007). The clinical significance of variations in ethanol toxicokinetics. *Journal of Medical Toxicology : Official Journal of the American College of Medical Toxicology*, 3(2), 63–72. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3550085&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Pounder, D., & Paul, H. (1998). Dead sober or dead drunk ? May be hard to determine (Editorial). *BMJ*, 316(87), 87–89. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1136/bmj.316.7125.87>
- RELX Group. (2014). Mendeley Desktop. Elsevier. Retrieved from <https://www.mendeley.com/newsfeed/>
- Robertson, S. (2005). Interpretation of measured alcohol levels in fatal aviation accident victims. *Australian Government, Australian Transport Safety Bureau*. Retrieved from <http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Interpretation+of+measured+alcohol+levels+in+fatal+aviation+accident+victims#0>
- Sturner, W. Q., & Coumbis, R. J. (1966). The quantitation of ethyl alcohol in vitreous humor and blood by gas chromatography. *American Journal of Clinical Pathology*, 46(3), 349–351. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5921411>
- Sylvester, P. A., Wong, N. A. C. S., Warren, B. F., & Ranson, D. L. (1998). Unacceptably high site variability in postmortem blood alcohol analysis. *Journal of Clinical Pathology*, 51, 250–252. doi:10.1136/jcp.51.3.241
- Teixeira, H. M., Reis, F., Proença, P., Ramos, P., Quintela, O., López-Rivadulla, M., ... Vieira, D. N. (2004). Vitreous humour as a complementary sample to blood for the detection/confirmation of diazepam: ante-mortem and post-mortem studies in an animal model. *Human & Experimental Toxicology*, 23, 571–577. doi:10.1191/0960327104ht490oa
- Thermo-Scientific. (2012). Ensayo de etil glucurónido DRI ®. Thermo Scientific.
- Tiscione, N. B., Alford, I., Yeatman, D. T., & Shan, X. (2011). Ethanol analysis by headspace gas chromatography with simultaneous flame-ionization and mass spectrometry detection. *Journal of Analytical Toxicology*, 35(7), 501–511.
- Ullman, J. B. (2006). Structural Equation Modeling: Reviewing the Basics and Moving Forward. *Journal of Personality Assessment*, 87(1), 35–50. doi:10.1207/s15327752jpa8701
- Vellonen, K.-S., Soini, E.-M., del Amo, E. M., & Urtti, A. (2015). Prediction of ocular drug

- distribution from systemic blood circulation. *Molecular Pharmaceutics*, acs.molpharmaceut.5b00729. doi:10.1021/acs.molpharmaceut.5b00729
- von Wartburg, J. P. (1980). Alcohol metabolism and alcoholism--pharmacogenetic considerations. *Acta Psychiatrica Scandinavica*, 62(s286), 179–188. doi:10.1111/j.1600-0447.1980.tb08065.x
- Wilkinson, P. K. (1980). Pharmacokinetics of ethanol: a review. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research*, 4(1), 6–21. doi:10.1111/j.1530-0277.1980.tb04785.x
- Winek, C. L., Bauer, J., Wahba, W. W., & Collom, W. D. (1993). Blood Versus Synovial Fluid Ethanol Concentrations in Humans. *Journal of Analytical Toxicology*, 17(4), 233–235. doi:10.1093/jat/17.4.233
- World Health Organisation. (2014). Global status report on alcohol and health 2014. *Global Status Report on Alcohol*, 1–392. doi:/entity/substance_abuse/publications/global_alcohol_report/en/index.html