

# Marcadores del consumo de alcohol en muestras de pelo.

*Markers of alcohol consumption in hair samples.*

---

---

C. Jurado<sup>1</sup>

---

---

## RESUMEN

El consumo de alcohol está aceptado socialmente en la mayoría de los países, sobretodo en los que es una droga lícita, a pesar de las implicaciones que conlleva sobre la salud. Esta situación hace necesarios unos marcadores adecuados que permitan discriminar entre consumo social y excesivo de alcohol, así como también, en algunos casos, verificar la abstinencia después de un periodo de consumo abusivo de alcohol.

Existe una gran variedad de marcadores que se pueden analizar en fluidos biológicos, pero ninguno de ellos es definitivo. Los marcadores indirectos en sangre o suero pueden verse alterados por otras causas patógenas; mientras que los marcadores directos tienen un tiempo de detección muy corto en sangre u orina. Este último problema se resolvería usando el pelo debido a la característica única de esta matriz biológica de permitir la acumulación indefinida de los compuestos absorbidos.

El objetivo de la presente revisión es demostrar la utilidad del pelo para establecer el consumo excesivo de alcohol durante periodos prolongados de tiempo. Se estudiarán los dos marcadores del consumo de alcohol analizados, hasta el momento, en el pelo, el etil-glucurónido (EtG) y los ésteres etílicos de los ácidos grasos (FAEE).

Después de toda la revisión podemos concluir que ambos marcadores, EtG y FAEE, permiten discriminar entre consumo excesivo, por un lado, y consumo social o abstinencia, por otro, pero en ningún caso permiten diagnosticar el alcoholismo en una persona.

*Palabras clave: marcadores del consumo excesivo de alcohol, etil-glucurónido, ésteres etílicos de los ácidos grasos, análisis de pelo.*

*Cuad Med Forense 2009; 15(58):265-278*

---

## ABSTRACT

Alcohol is perhaps the most widely consumed licit drug in the world. Despite the wide range of health implications associated with alcohol use, its consumption continues to be socially accepted in most countries. This situation leads to a considerable demand for reliable alcohol markers to discriminate between social drinking and alcohol abuse or to verify claims of abstinence after previous harmful drinking.

Despite the considerable progress, the situation is still not satisfactory, since the indirect blood or serum markers can be altered with other pathogenic situations, and the direct markers have too short a detection window in blood or urine. Using hair, the last drawback could be avoided due to the unique ability of this matrix to serve as a long-term storage of foreign substances.

The objective of the present review is to demonstrate the capacity of hair to establish chronic excessive alcohol consumption. Up to now, only two ethanol metabolites, ethyl-glucuronide (EtG) and fatty acid ethyl esters (FAEE) have been analyzed in hair, both of which will be here studied at length.

After this review, it is possible to conclude that both markers, EtG and FAEE, allow us to discriminate between excessive drinkers, on the one hand, and social drinkers or teetotalers, on the other. Nevertheless, they never allow us to diagnose alcoholism.

*Key words: markers for excessive alcohol consumption, ethyl-glucuronide, fatty acid ethyl esters, hair analysis.*

---

**Correspondencia:** Dra. Carmen Jurado Montoro. Instituto Nacional de Toxicología y Ciencias Forenses. Av. Dr. Fedriani s/n. 41015 Sevilla. España. Tfno.: 954 371 233. Fax: 954 370 262. E-mail: carmen.jurado@mju.es.

<sup>1</sup> Instituto Nacional de Toxicología y Ciencias Forenses. Departamento de Sevilla. España.

## INTRODUCCIÓN:

El consumo y, sobre todo, el abuso de alcohol es uno de los mayores problemas sociales y económicos que afectan a la sociedad mundial. El alcohol es una sustancia legal en la mayoría de los países y se consume en mayores cantidades y por una mayor proporción de la población que cualquier otra droga de abuso. La Organización Mundial de la Salud ha estimado que dos billones de personas consumen bebidas alcohólicas en todo el mundo, de las que 76'3 millones sufren trastornos relacionados con el abuso de alcohol [1]. España ocupa un lugar importante en el ranking mundial de producción de bebidas alcohólicas y es el quinto país consumidor de alcohol del mundo [2]. LA OMS afirma, el año 2002, que el alcohol es el quinto factor de riesgo para la salud en el mundo y el tercero en los países desarrollados [3].

Revisando la literatura publicada al respecto así como los datos de varias organizaciones encontramos distintos valores para establecer a partir de qué cantidad de alcohol se puede considerar consumo excesivo. Así, el National Institute for Alcohol Abuse and Alcoholism considera un consumo de entre 40 y 60 gramos de alcohol diarios, como excesivo en el hombre; mientras que para la mujer el valor baja hasta 30 – 45 gramos, en ambos casos durante varios meses. La Organización Mundial de la Salud, en el mismo sentido, considera consumo excesivo a partir de 60 gramos de alcohol al día, durante periodos prolongados de tiempo. La Society of Hair Testing (SoHT) intentando homologar criterios para una correcta interpretación de los análisis de los marcadores del consumo excesivo de alcohol en muestras de pelo, llegó recientemente a un Consenso (*"Consensus of the Society of Hair Testing on hair testing for chronic excessive alcohol consumption"*) [4] en cuyo punto 2 dice: "...chronic excessive alcohol drinking corresponds to a consumption higher than 60 g of pure ethanol per day during several months"

El abuso de alcohol supone un gran problema desde el punto de vista tanto forense como clínico y conlleva la necesidad de disponer de unos adecuados marcadores que permitan discriminar entre consumo social y consumo excesivo de alcohol, así como también, en algunos casos, verificar la abstinencia después de un periodo de consumo abusivo de alcohol. Estos marcadores deberían reflejar el consumo tanto crónico como agudo y se conocen también como "state markers", ya que indican el estado del paciente al que se le está realizando el análisis [5]; en cambio, los marcadores que indican la predisposición a desarrollar alcoholismo se conocen como "trait markers".

Los marcadores que se analizan en el laboratorio, hasta el momento, son los de estado "state markers", que se subdividen en marcadores directos e indirectos. Los marcadores directos derivan de la molécula de etanol y son el propio etanol y alguno de sus metabolitos como los ésteres etílicos de los ácidos grasos (FAEE, fatty acid ethyl esters), etil-glucurónido (EtG), etilbenzoilecgonina (EBE, también conocida como cocaetilena) o fosfatidiletanol, así como algunos derivados del acetaldehído. Los marcadores indirectos son consecuencia de alteraciones patógenas o metabólicas ocasionadas por el consumo excesivo de alcohol, entre ellos podemos citar enzimas hepáticas como gamma-glutamilttransferasa (GGT), aspartato-aminotransferasa (ASAT), alanito-aminotransferasa (ALAT), volumen corpuscular medio (MCV) o transferrina deficiente de carbohidratos (CDT), etc [6].

Todos los marcadores anteriores se pueden analizar en varios fluidos biológicos, aunque fundamentalmente en la sangre (suero o plasma), mientras que en el pelo, hasta el momento sólo se han analizado tres marcadores: etil-glucurónido, ésteres etílicos de los ácidos grasos y etilbenzoilecgonina.

El EtG es un metabolito minoritario del etanol, del que sólo un 0'02-0'06% se elimina como EtG (ácido etil- $\beta$ -D-6-glucurónico) [7], que se forma principalmente en el retículo endoplásmico de las células hepáticas y, en menor proporción, en las células de la mucosa intestinal y del pulmón, mediante una reacción de glucuronidación entre el etanol y ácido glucurónico, que fue descrita en primer lugar por Neubauer en 1901 [8] y está catalizada por las enzimas UDP-glucuronosil transferasas (UGT), siendo las isoformas UGT 1A1 y UGT 7B2 las más activas en los microsomas hepáticos [9]. EtG es un compuesto no-volátil y soluble en agua, que se puede detectar en fluidos biológicos durante periodos de tiempo largos después de la total eliminación del etanol del organismo. El tiempo de vida media en sangre es de 2 a 3 horas y se puede detectar en suero durante un periodo de tiempo superior a 8 horas después de la total eliminación del etanol, mientras que en orina puede llegar hasta 80 horas en pacientes que entran en programas de desintoxicación [10].

Los FAEE se forman a partir de los ácidos grasos, triglicéridos o fosfolípidos cuando se encuentran en la presencia de etanol, esta reacción fue descrita por primera vez por Lange en 1981 [11] y está catalizada, principalmente, por dos enzimas, la acil-CoA:etanol O-aciltransferasa (AEAT) y la FAEE sintetasa [12]. La cinética de eliminación de la sangre es de dos fases con una vida media inicial y terminal de, aproximadamente, 3 y 11 horas, respectivamente [13], pudiéndose detectar en sangre hasta 44 horas después de haber cesado el consumo de alcohol [14], se acumulan en altas concentraciones en el hígado, corazón y grasa, por lo que se piensa que pueden jugar un papel muy importante en algunas patogénesis inducidas por el etanol.

La etilbenzoilecgonina, también conocida como cocaetilenina (EBE) es un metabolito del alcohol y de la cocaína, que se forma cuando hay consumo concomitante de ambas sustancias, mediante una reacción de transesterificación en las células del retículo endoplasmático del hígado y del riñón, que está catalizada por la carboxilesterasa [15].

El objetivo de la presente revisión es demostrar la utilidad del pelo para establecer el consumo excesivo de alcohol durante periodos prolongados de tiempo. Se estudiarán los dos marcadores del consumo de alcohol analizados, hasta el momento, en el pelo, el EtG y los FAEE; mientras que el otro metabolito posible, la EBE, no se considerará ya que su presencia conlleva no sólo el consumo de alcohol, sino también el de otra droga de abuso, como es la cocaína. Además La SoHT en el Consenso anteriormente citado [4] reconoce que tanto el EtG como los FAEE, en muestras de pelo, se pueden usar como marcadores del consumo de alcohol. Así en su punto 4 dice "... *Instead, the minor metabolites ethyl glucuronide (EtG) and/or fatty acid ethyl esters (FAEE) should be measured in hair as direct alcohol markers*". En primer lugar se revisarán someramente las metodologías analíticas publicadas para estos analitos, para pasar a un punto muy importante como es el de la interpretación de los resultados que se obtengan en los laboratorios, qué significan y las circunstancias que puedan afectarlos. En este sentido se discutirá sobre las concentraciones de corte (*cut-off*) a partir de las cuales se puede considerar consumo abusivo de alcohol y la posible influencia que pueda tener el color del pelo, los tratamientos cosméticos o la zona anatómica de donde se tome la muestra. Por último, las aplicaciones de este tipo de análisis son un punto indispensable y para ello veremos la posibilidad de establecer el perfil cronológico del consumo de alcohol.

#### **METODOLOGÍAS ANALÍTICAS:**

Uno de los mayores inconvenientes de los análisis de pelo comparados con los de fluidos biológicos, como sangre u orina, es la complejidad y laboriosidad de los procedimientos analíticos.

El análisis de cualquier sustancia en el pelo, incluidos los marcadores del consumo de etanol (EtG y FAEE) conlleva los siguientes pasos:

- Descontaminación, mediante el lavado de la muestra, para evitar el riesgo de la contaminación externa.
- Extracción de los compuestos de interés, paso que es muy conflictivo, ya que las condiciones de extracción deben ser, por un lado, lo suficiente fuertes que permitan liberarlos de sus uniones a los distintos componentes pediculares y, por otro, no pueden ser tan drásticas que alteren las moléculas como es el caso, por ejemplo, del EtG, que es muy lábil. En este paso, los compuestos son liberados de la matriz pedicular y después se realiza una purificación, concentración y derivatización, si el análisis instrumental posterior lo requiera.
- Análisis instrumental, siempre por espectrometría de masas, bien sola (MS) o en tandem (MS/MS) y acoplada a un cromatógrafo de gases (GC-MS o GC-MS/MS) o a un cromatógrafo de líquidos (LC-MS o LC-MS/MS).

En el caso de los FAEE y aunque en el pelo se han detectado más de 20 ésteres etílicos de ácidos grasos de 12 a 20 átomos de carbono [6], rutinariamente sólo se analizan cuatro de ellos: miristato, palmitato, oleato y estearato de etilo y las concentraciones se encuentran en el rango 1:4:4:1 [16]. El método usado por todos los laboratorios es el mismo, incluye lavado de las muestras con agua y n-heptano, extracción de los FAEE con una mezcla n-heptano-dimetilsulfóxido, seguido de microextracción en fase sólida y análisis por GC-MS usando patrones internos deuterados de los FAEE [16, 17].

No ocurre lo mismo con el EtG, ya que desde el primer trabajo de Sachs en 1993 [18], sobre la identificación de EtG en pelo, se han publicado muchos otros métodos, pero todos, dado el carácter polar de este compuesto, se basan en la extracción con agua o soluciones acuosas y posterior análisis por espectrometría de masas acoplada a cromatógrafos de gases (GC-MS o GC-MS/MS) o de líquidos (LC-MS o LC-MS/MS). La Tabla 1 [19-32] presenta un resumen de todos ellos, junto con los límites de detección (LOD) y de cuantificación (LOQ) de los mismos.

### **CONCENTRACIONES DE CORTE (*CUT-OFF*) PARA ESTABLECER EL CONSUMO EXCESIVO DE ALCOHOL:**

Una de las cuestiones más importantes, pero también más discutidas y que más controversia ha creado en los análisis de pelo es la del establecimiento de unas concentraciones de corte adecuadas (*cut-off values*), a partir de las cuales poder considerar un resultado verdaderamente positivo. En el caso de las drogas de abuso, el problema radica en la contaminación externa y, por tanto, la posibilidad de reportar falsos resultados positivos en personas que no consumen drogas, pero que se desenvuelven en un ambiente muy contaminado, por lo que las drogas se podrían incorporar desde el ambiente. Para evitar ese riesgo, en 2004 dos organizaciones la Society of Hair Testing (SoHT) [33] y el SAMHSA [34] propusieron unos valores *cut-off* para opiáceos, cocaína, cannabis y anfetaminas. En el caso que nos interesa en este trabajo, de los marcadores del consumo de alcohol, la pregunta que se plantea es a partir de qué concentraciones de EtG y FAEE se puede considerar consumo excesivo de alcohol y así poder diferenciar este tipo de consumo del de los bebedores sociales y abstemios.

Tabla 1.- Revisión bibliográfica de los métodos publicados para el análisis de EtG en pelo

REF. (Año)	DESCONTAMINACIÓN	EXTRACCIÓN	PURIFIC.	DERIVATIZACIÓN	INSTRUMENT.	LOD	LOQ
[19] (1994)	MeOH	MeOH:H <sub>2</sub> O (1:1)	No	AA + py	GC-MS	1000	5000
[20] (2000)	Éter + Acetona	MeOH:H <sub>2</sub> O (4:1)	No	MSTFA	GC-MS	2200	5000
[21] (2000)	MeOH+Acetona	H <sub>2</sub> O	No	BSTFA + py	GC-MS	N.R. <sup>a</sup>	N.R.
[22] (2002)	MeOH+Acetona	H <sub>2</sub> O	SPE	No	LC-MS/MS	51	103
[23] (2004)	H <sub>2</sub> O+Acetona	H <sub>2</sub> O	No	PFPA	GC/MS	25	50
[24] (2004)	H <sub>2</sub> O+Acetona	H <sub>2</sub> O	SPE	PFPA/PFPOH	GC/MS	2	4
[25] (2006)	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> +MeOH	H <sub>2</sub> O:MeOH	No	No	LC-MS	2	3
[26] (2008)	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> +MeOH	H <sub>2</sub> O	No	No	LC-MS/MS	0'9	2'5
[27] (2008)	H <sub>2</sub> O+Acetona+ MeOH	H <sub>2</sub> O+Acetonitrilo	SPE	No	LC-MS	15	25
[28] (2008)	MeOH	H <sub>2</sub> O	SPE	BSTFA	GC-MS/MS	10	20
[29] (2008)	Twen+H <sub>2</sub> O	n-hexano:H <sub>2</sub> O (1:1)	No	BSTFA	GC-MS	100	300
[30] (2009)	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> +MeOH	MeOH	No	No	LC-MS/MS	25	50
[31] (2009)	H <sub>2</sub> O+Acetona	H <sub>2</sub> O	SPE	PFPA	GC-MS/MS	3	8'4
[32] (2008)	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	H <sub>2</sub> O	SPE	No	LC-MS/MS	2	10

<sup>a</sup> N.R.: No reportado

Los métodos analíticos empleados en los primeros trabajos (entre 1994 y 2004) para la determinación de EtG en pelo no eran muy sensibles y, como se puede observar en la Tabla 1, los LOQ oscilaban entre 50 pg/mg [23] y 5000 pg/mg [19, 20], por lo que este marcador sólo podía detectarse en el cabello de bebedores excesivos de alcohol y no se detectaba en el de bebedores sociales y abstemios; pero a partir del año 2004, al optimizarse los métodos o bien aplicando técnicas instrumentales más sensibles como son el tandem espectrometría de masas-espectrometría de masas acoplado a un cromatógrafo de gases (GC-MS/MS) o a un cromatógrafo de líquidos (LC-MS/MS), se consiguió aumentar la sensibilidad de los métodos y los LOQ se redujeron ostensiblemente hasta alcanzar valores de 8'4 pg/mg [31] o incluso 2'5 pg/mg [26], valores que permiten detectar EtG en el pelo de bebedores sociales, lo que hace necesario establecer unas concentraciones de corte adecuadas, a partir de las cuales poder considerar que existe consumo excesivo de alcohol. La Tabla 2 muestra los valores propuestos por diversos autores, que, como se puede observar, oscilan entre los 50 pg/mg [23, 32] y los 5 pg/mg [35]. Para unificar criterios, la SoHT en el Consenso de Roma [4] establece en su punto 8: "*The cut-off of EtG in scalp hair to strongly suggest chronic excessive alcohol drinkers is proposed at 30 pg/mg*".

**Tabla II.- Concentraciones de corte (cut-off) para establecer el consumo excesivo de alcohol, publicadas en la literatura.**

AUTOR	REF.	MÉTODO DETECCIÓN	CUT-OFF (PG/MG)
Yegles et al., (2004)	[24]	GC-MS-NCI	25
Jurado et al., (2004)	[23]	GC-MS-EI	50
Kintz et al., (2008)	[32]	LC-MS/MS	50
Politi et al., (2006)	[35]	LC-MS/MS	5
Bendroth et al., (2008)	[26]	LC-MS/MS	30

Todos los autores que analizan rutinariamente FAEE están de acuerdo en que este marcador se encuentra no sólo en el pelo de bebedores abusivos, sino también en el de los bebedores sociales e incluso en el de los abstemios; por lo que se hace imprescindible establecer un valor de corte que permita diferenciar dos grupos importantes de bebedores, por un lado los abstemios y bebedores sociales y por otro lado los bebedores abusivos. Similarmente a lo ocurrido con el EtG, en los primeros trabajos sobre FAEE, cuando la suma de las concentraciones de los cuatro ésteres era igual o mayor que 1 ng/mg, se consideraba consumo abusivo de alcohol etílico. Con los años y la experiencia en el análisis de este marcador se pudo comprobar que con este *cut-off* la especificidad para discriminar el consumo abusivo de los otros tipos de consumo, era del 100%; sin embargo, la sensibilidad era menor, ya que se corre el riesgo de reportar un 10% de falsos negativos [36]. Por todo lo anterior, en 2006 Pragst y Yegles [6] proponen dos diferentes valores *cut-off* dependiendo de la procedencia de la muestra de cabello, así en el caso de muestras procedentes de cadáveres y para casos forenses, el *cut-off* óptimo sería 0'8 ng/mg; mientras que en muestras de cabellos procedentes de personas vivas y en el caso de análisis relacionados con los permisos de conducir, el *cut-off* se reduciría a 0'5 ng/mg. La SoHT en el mismo Consenso anteriormente citado [4] propone para los FAEE: "*The discrimination cut-off for the sum of the four esters in hair between social and excessive alcohol drinkers is proposed at 0.5 ng/mg*".

### **INFLUENCIA DEL COLOR DEL PELO:**

Un problema que se presenta en la interpretación de ese tipo de análisis es la posibilidad de que los resultados se vean afectados por el color del pelo, sobre todo si consideramos que, según algunos estudios, el porcentaje de personas canosas (con pelo blanco, gris o negro con algunas canas) entre los pacientes con problemas de abuso de alcohol oscila entre el 18 y el 50% (20-22, 37).

Diferentes investigadores han demostrado que la melanina influye en la incorporación de las drogas de abuso en el pelo, encontrando diferencias en las concentraciones entre el pelo blanco y el pelo pigmentado. Por ejemplo, en un estudio realizado *in vitro* Reid et al. [38] observaron que el pelo negro africano incorporaba 10 veces más cocaína- $d_3$  que el pelo rubio caucásico. Esto es debido a que la incorporación de las distintas sustancias desde la sangre al pelo es mayor en las moléculas lipófilas, que pueden atravesar las membranas fácilmente [39] a lo que se suma que los melanocitos tienen un pH relativamente bajo, por lo que los compuestos básicos tienden a incorporarse en el pelo pigmentado.

La importancia de la melanina en los estudios de los marcadores del consumo de alcohol no está tan documentada, pero como el EtG tiene carácter hidrofílico con un pKa de 3'21 [40] y a pH fisiológico tiene carga negativa, cabe esperar que la melanina no influya en su incorporación y que, por lo tanto, las concentraciones del pelo pigmentado no difieran mucho de las del blanco. Para demostrar estas suposiciones, Appenzeller *et al.* [41] tomaron muestras de pelo en 21 casos postmortem, con conocidos problemas de abuso de alcohol, de los que separaron el pelo blanco del pelo de color y lo analizaron por separado, no encontrando diferencias intraindividuales entre ambos tipos de pelo, la pendiente de la curva fue 1'001 y el coeficiente de correlación 0'9939 ( $P < 0.0001$ ).

Si consideramos la relación entre las características químicas y la afinidad por la melanina, la incorporación de los FAEE tampoco debería estar afectada por el color del pelo, ya que los FAEE son moléculas neutras e hidrófilas y, como la melanina presenta mayor afinidad por las sustancias básicas y catiónicas, cabría esperar que la interacción melanina:FAEE no fuera muy importante, lo que queda corroborado en un estudio realizado por Kulaga et al. [42], sobre el efecto de la pigmentación en la incorporación de FAEE, para lo que administraron etanol a ratas Long Evans (con manchas blancas y negras en la piel) y analizaron el pelo blanco y negro por separado, no encontrando diferencias significativas en los perfiles de FAEE en ambos tipos de pelo.

De todo lo anterior se puede concluir que los resultados de los análisis de los marcadores del consumo de alcohol (EtG y FAEE) en muestras de pelo no están sesgados por el color, lo que es muy importante para evitar cualquier discriminación en la interpretación de los resultados. A este respecto, la SoHT en su Consenso [4] establece, para ambos marcadores, la misma afirmación: "...their incorporation is not biased by natural hair color".

### **INFLUENCIA DEL TRATAMIENTO COSMÉTICO:**

Otra circunstancia a considerar en los análisis de pelo es la posibilidad que las concentraciones de las sustancias presentes sufran unos cambios inducidos por los tratamientos cosméticos a los que se haya sometido el pelo. Algunos tratamientos cosméticos, especialmente los que emplean ácidos o bases fuertes como son la decoloración y la permanente, pueden ocasionar alteraciones en el pelo, dañando la cutícula, cambiando la estructura molecular de los pigmentos como la melanina o incluso pueden llegar a degradar las moléculas presentes; todo lo cual se traduciría en una disminución de las concentraciones.

En todos los trabajos realizados con drogas de abuso se observa una disminución de las concentraciones. Así Jurado et al. [43] observaron disminuciones de hasta el 79%, 85'5% y 75'86% para cocaína, 6-monoacetilmorfina y  $\Delta^9$ -tetrahidrocannabinol, respectivamente; la afectación fue más notable en las muestras sometidas a decoloración que en las teñidas y cuanto más dañado o deteriorado se encontrara el pelo, mayores eran las pérdidas en concentración.

Hasta el momento, no se conoce que se hayan realizado investigaciones sistemáticas sobre la estabilidad del EtG en el pelo y la posible afectación por los posibles tratamientos cosméticos; sin embargo, Pragst y Yegles [36] en un trabajo para establecer el consumo retrospectivo de alcohol durante el embarazo, afirman que observaron una disminución del 78% en la concentración de EtG después de decolorar el pelo con un producto comercial. Por otra parte, y debido al carácter tan hidrofílico de este compuesto, también se puede esperar que los frecuentes lavados disminuyan la concentración [36].

Los FAEE, por el contrario, son relativamente estables en el pelo, como se comprueba en un estudio, en el que después de lavar 20 veces el pelo con el champú normal, no se observan disminuciones significativas en las concentraciones, como tampoco se observan después de someter el pelo a un único tratamiento cosmético (decoloración, tinte o permanente) [44]. Sin embargo, la disminución es mucho mayor, hasta un 64%, cuando el pelo se somete a un tinte con un producto muy alcalino (pH 11) [36].

#### **MARCADORES DE ETANOL EN PELO DE DISTINTAS ZONAS ANATÓMICAS:**

En ocasiones se da la circunstancia que la persona a analizar sufre de alopecia o tiene el cabello excesivamente corto, no permitiendo obtener una muestra adecuada para el análisis, por lo que se presenta la posibilidad de tomar muestras de otras zonas anatómicas para demostrar que ha habido un consumo abusivo de alcohol.

Existen muchos trabajos que comparan los resultados obtenidos de cabello con los de otros tipos de pelo. En el caso de las drogas de abuso, incluso hay un capítulo de un libro dedicado a este tema [45] en el que se concluye que las drogas se pueden detectar en cualquier tipo de pelo (cabeza, barba, brazo, axila o pubis) y que en todos ellos la concentración del principio activo es siempre superior a la de sus metabolitos. Existen diferencias en las concentraciones, observándose las más altas en el vello púbico y las más bajas en el axilar, pero a pesar de ello, existe una correlación muy significativa entre todas las muestras, lo que permite que muestras de pelo obtenidas de distintas zonas anatómicas sean una buena alternativa al cabello, cuando este no está disponible para el análisis.

Después de obtener un resultado positivo de EtG en el vello púbico de un conocido bebedor social, Kintz et al. [32] investigaron la distribución de este marcador entre el cabello y el vello púbico de ocho bebedores sociales y seis abstemios, obteniendo resultados negativos en ambas muestras cuando se trata de abstemios, pero una situación distinta se observó en los bebedores sociales, que dieron resultado negativo en el cabello, pero positivo en el vello púbico y en todos, excepto en dos casos, las concentraciones estaban por encima del *cut-off* de 30 pg/mg, propuesto por la SoHT, para diferenciar consumo excesivo de alcohol (Tabla 3). En el mismo sentido, Kerekes et al. [46] analizaron EtG en pelo tomado de distintas zonas anatómicas, como cabeza, barba, pecho, brazos, abdomen, pubis y piernas y observaron (Tabla 3) que, en general, resultados positivos o negativos en cabello se corresponden con el mismo tipo de resultados en pelo de otras zonas anatómicas, excepto en el vello púbico, donde las concentraciones de EtG fueron considerablemente más elevadas, incluso en los casos de resultados negativos en cabello. De todo lo anterior se

deduce que existen grandes diferencias en la incorporación de EtG entre cabello y vello púbico y éste último no se debe usar como alternativa cuando no se dispone de cabello, ya que puede conducir a falsos resultados positivos.

**Tabla III.- Concentraciones (pg/mg) de EtG en pelo de distintas zonas anatómicas [32, 46]**

REF.	TIPO DE BEBEDORES	CABEZA	PUBIS	AXILAS	BARBA	CUERPO
[32]	Abstemios	n.d. <sup>a</sup>	n.d. <sup>a</sup>			
[32]	Bebedores sociales	n.d. <sup>a</sup>	12-1370	n.d. <sup>b</sup>	n.d. <sup>b</sup>	n.d. <sup>b</sup>
[46]	Abstemios (n=12)	n.d. <sup>c</sup>	n.d. <sup>c</sup>	n.d. <sup>c</sup>	n.d. <sup>c</sup>	7
[46]	Bebedores sociales (n=10)	8 – 29	32-1174	9-38	16 <sup>b</sup>	8-30
[46]	Bebedores Abusivos (n= 10)	35-1446	76-19647	14-54	132 <sup>b</sup>	53-778

<sup>a</sup> n.d.: No detectado [EtG] < 7 pg/mg.

<sup>b</sup>: Sólo se dispone de los datos de un único caso

<sup>c</sup> n.d.: No detectado [EtG] < 10 pg/mg

Hartwig et al. [47] examinaron la posibilidad de usar muestras de pelo distintas al cabello para, mediante el análisis de FAEE, establecer el consumo de etanol. Tomaron muestras a un abstinente, cinco bebedores sociales y 22 muertes de conocidos alcohólicos y observaron (Tabla 4) grandes diferencias en las concentraciones del pelo obtenido de las distintas partes, pero los casos de consumo excesivo de alcohol se caracterizaron porque las concentraciones eran superiores a 1 ng/mg en todas las muestras, por lo que, en el caso de los FAEE, se puede usar pelo del pubis, axila, barba o cuerpo si no se dispone de cabello o también para evitar errores producidos por el uso de tratamientos cosméticos.

**Tabla IV.- Concentraciones (ng/mg) de FAEE en pelo de distintas zonas anatómicas [44]**

	CABEZA	PUBIS	AXILAS	BARBA	CUERPO
Abstemios	0'39 <sup>a</sup>	0'33 <sup>a</sup>			
Bebedores sociales	0'09-0'66	0'20-0'50	0'03-0'83	0'34-0'41	0'05-0'48
Bebedores Abusivos	1'30-16,30	0'49-13'80	0'87-7'90	1'10-17'30	1'80-12'00

<sup>a</sup>: Sólo se dispone de los datos de un único caso

#### ESTABLECIMIENTO DEL PERFIL CRONOLÓGICO DEL CONSUMO DE ALCOHOL:

Una de las grandes ventajas del pelo respecto a otras matrices más tradicionales, como la sangre y la orina, es la posibilidad de obtener un perfil cronológico del consumo, en este caso de alcohol, que se consigue fragmentando el mechón de cabello en segmentos de longitud conocida y analizarlos por separado, pero para poder extrapolar las concentraciones obtenidas en los distintos segmentos con el periodo de consumo correspondiente, es necesario conocer la velocidad de crecimiento del cabello, que no crece homogéneamente, sino que se alternan periodos de crecimiento

activo y de reposo, que se reflejan en tres fases bien conocidas como anágena, catágena y telógena; tampoco la velocidad de crecimiento es igual en todos los individuos, sino que los valores oscilan entre 0'07 y 0'78 mm/día con una media entre 0'32 y 0'46 mm/día [48], dándose la circunstancia que los autores aplicaban distintos valores para establecer el crecimiento mensual. Para evitar toda la polémica y, especialmente, para que hubiera una postura oficial, aceptable por los tribunales, la Society of Hair Testing [33] recomendó que, para la interpretación de los análisis de pelo en casos forenses, se podía aceptar una velocidad de crecimiento del pelo de 1 cm/mes.

En el caso de las drogas de abuso, la aplicación de estos análisis para establecer el perfil cronológico de su consumo ha quedado demostrada en la bibliografía [49].

Hasta el momento no hay mucha bibliografía publicada sobre la posibilidad de establecer el perfil cronológico del consumo de alcohol mediante el análisis secuencial de EtG en cabello, pero todos concluyen que existe una buena correlación entre el patrón de consumo y las concentraciones en los distintos segmentos. Appenzeller et al. [37] realizaron un análisis segmental de EtG en muestras de cabello obtenidas de 15 pacientes que entraron en un programa de desintoxicación y lo compararon con sus historias de consumo de alcohol, observando, en todos los casos, que el comienzo de la abstinencia coincide con una disminución en la concentración de EtG en los segmentos proximales y que periodos de abstinencia previos, anteriores a alguna recaída conllevaron una disminución en las concentraciones de los correspondientes segmentos. Algunos ejemplos obtenidos de casos forenses se incluyen más adelante, en los que también se demuestra que la determinación secuencial de EtG en muestras de cabello nos proporciona información sobre las distintas historias del consumo de alcohol.

Algo distinto ocurre con los FAEE, ya que a partir de ellos no es posible obtener el perfil cronológico del consumo de alcohol. En todos los estudios realizados con este marcador se observa el mismo perfil de concentraciones, independientemente de si el consumo es homogéneo, aumenta o disminuye. Auwärter et al. [16, 50] observaron que, a pesar de un consumo homogéneo de alcohol durante un periodo prolongado de tiempo, en todos los casos se presentaba el mismo perfil que consistía en un incremento de las concentraciones a partir del segmento proximal, hasta un máximo entre los 7 y 15 cm, y a partir de aquí disminuyen de nuevo. Este patrón se puede explicar por la incorporación de los FAEE, que es fundamentalmente a través de la grasa, que se forma en las glándulas sebáceas y baña regularmente el mechón, de modo que a medida que aumenta la distancia desde el cuero cabelludo, también aumenta el tiempo de exposición y, por tanto, se acumulan más FAEE, aumentando también su concentración en el cabello. Sin embargo, en la parte distal del mechón las concentraciones disminuyen debido a los lavados, la evaporación o incluso la hidrólisis de los ésteres [36].

#### **- Caso nº 1**

Se trata de un hombre que declara un consumo muy alto (más de 250 gramos diarios) de alcohol durante meses, sin alterar prácticamente la rutina de abuso. Se analizó un mechón de 5 cm. de longitud, correspondientes, aproximadamente, a cinco meses de consumo [33], que se troceó en segmentos de 1 cm, correspondientes a un mes de consumo y el resultado de los análisis de cada uno de los segmentos (Figura 1) permitió corroborar la historia de consumo, ya que las concentraciones de EtG estuvieron alrededor de 600 pg/mg en cada uno de los segmentos, demostrando un consumo excesivo y sin altibajos de alcohol durante el periodo de cinco meses anteriores a la toma de la muestra.

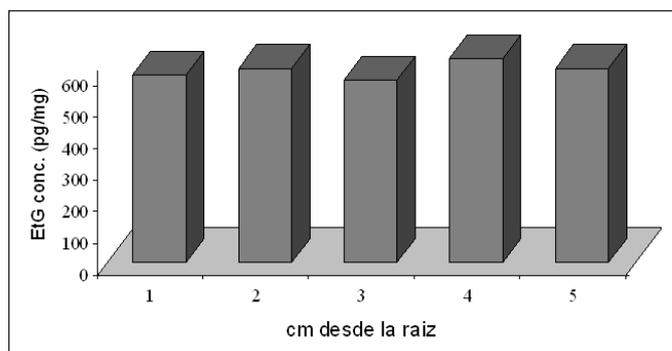


Figura 1.- Estudio secuencial de EtG en el mechón de cabello de un hombre que declara un consumo constante y alto de alcohol.

### Caso nº 2

Este caso hace referencia a un hombre de 60 años, que declara un consumo de alcohol elevado (más de 200 gramos diarios) y constante durante años. En los ocho a nueve meses anteriores a la toma de la muestra intentó disminuir el consumo y así lo hizo, pero durante los últimos cuatro meses sufrió una recaída y aumentó de nuevo el consumo. Se recibió un mechón de 10 cm, correspondientes a diez meses de consumo, que se trocó en segmentos de 1 cm, para poder establecer el perfil cronológico del consumo mensual. Los resultados obtenidos, reflejados en la Figura 2, corroboran la historia del consumo, ya que de ellos se deduce un consumo excesivo y homogéneo de alcohol durante el periodo comprendido entre los meses décimo y octavo anteriores a la toma de la muestra, a partir de ese momento, aunque sigue siendo excesivo, el consumo sufre una disminución paulatina entre el séptimo y el cuarto mes y que a partir del tercero las concentraciones de EtG aumentaron de nuevo.



Figura 2.- Estudio secuencial de EtG en el mechón de cabellos de un hombre que declara una disminución en el consumo de alcohol ocho meses antes de la toma de la muestra y tiene una recaída en los cuatro últimos meses.

De todo lo anterior se deduce que hay un desfase de un mes, aproximadamente, entre los cambios en la intensidad del consumo reportados por el implicado y los resultados obtenidos en el análisis de EtG en el pelo, que se pueden explicar por el hecho de que el mechón no se haya cortado justo en la raíz, sino un poco separado del cuero cabelludo, quizás por miedo a un corte.

### CONCLUSIÓN:

Los aspectos relativos a la interpretación y aplicación de los análisis de EtG y FAEE en muestras de pelo se podrían resumir en los siguientes puntos:

- Las concentraciones de corte (*cut-off*) para diferenciar el consumo excesivo de alcohol del consumo social o la abstinencia, se han establecido en 30 pg/mg y 0'5 ng/mg, para el EtG y los FAEE, respectivamente.
- El color del pelo no sesga los resultados de los análisis de los marcadores del consumo de alcohol (EtG y FAEE) en muestras de pelo.
- Los tratamientos cosméticos, a los que se pueda someter el pelo, afectan considerablemente la concentración de EtG y, en menor proporción, la de FAEE.
- En caso de no disponer de cabello, en el caso de los FAEE se puede utilizar pelo de cualquier otra zona anatómica; en cambio con el EtG no se debe usar vello púbico, ya que puede conducir a falsos resultados positivos.
- El perfil cronológico del consumo de alcohol se puede establecer mediante el análisis de EtG, pero no mediante el de los FAEE.

Después de toda la revisión podemos concluir que ambos marcadores, EtG y FAEE, permiten discriminar entre consumo excesivo, por un lado, y consumo social o abstinencia, por otro, pero en ningún caso permiten diagnosticar el alcoholismo en una persona.

#### ABREVIATURAS

AA: anhídrido acético

BSTFA: *N,O*-bistrimetilsilil-trifluoroacetamida

CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>: diclorometano

EBE: etil-benzoilecgonina o cocaetilena

El: Impacto electrónico

EtG: Etil-glucurónido

FAEE: Esteres etílicos de los ácidos grasos

GC-MS: cromatografía de gases-espectrometría de masas

GC-MS/MS: cromatografía de gases-espectrometría de masas en tandem

H<sub>2</sub>O: agua

LC-MS: cromatografía de líquidos-espectrometría de masas

LC-MS/MS: cromatografía de líquidos-espectrometría de masas en tandem

LOD: límite de detección

LOQ: límite de cuantificación

MeOH: metanol

MS: espectrometría de masas

MS/MS: espectrometría de masas en tandem

MSTFA: *N*-metil-*N*-trimetilsililtrifluoroacetamida

NCl: ionización química negativa

PFPA: anhídrido pentafluoropropiónico

PFPOH: alcohol pentafluoro-isopropílico

py: piridina

SoHT: Society of Hair Testing

SPE: extracción en fase sólida

#### BIBLIOGRAFÍA:

1. WHO Global Status Report on Alcohol 2004 [http://www.who.int/substance\\_abuse/publications/global\\_status\\_report\\_2004\\_overview.pdf](http://www.who.int/substance_abuse/publications/global_status_report_2004_overview.pdf). (Último acceso Septiembre 2009).
2. Bohn MJ, Babot TF, Kranzler HR. The alcohol use disorders identification test (AUDIT): Validation of a screening instrument for use in medical settings. *J. Stud. Alc.* 1995; 56:423-432.
3. World Health Organization. The World Health Report 2002. Reducing risks, promoting healthy life. Geneva 2002.
4. Society of Hair Testing (2009), Consensus of the Society of Hair Testing on hair testing for chronic excessive alcohol consumption, [http://www.soht.org/pdf/Consensus\\_EtG\\_2009.pdf](http://www.soht.org/pdf/Consensus_EtG_2009.pdf). (Último acceso Septiembre 2009).
5. Laposata M. Assessment of ethanol intake. Current issues and new assays on the horizon *Am. J. Clin. Pathol.* 1999; 112: 443-450.
6. Pragst F and Yegles M, Alcohol markers in hair. In: Kintz P, ed. *Analytical and Practical Aspects of Drug Testing in Hair*. Boca Raton,

FL: CRC Taylor & Francis; 2006; 287-323.

7. Goll M, Schmitt G, Ganssmann B, Aderjan RE. Excretion profiles of ethyl glucuronide in human urine after internal dilution. *J. Anal. Toxicol.*, 2002; 26: 262-266.
8. Neubauer O, Ueber Glucuronsäurepaarung bei Stoffen der Fettreihe, *Archiv für experimentelle Pathologie und Pharmakologie*, 1901; 46: 135-154,
9. Foti RS and Fisher MB. Assessment of UDP-glucuronosyltransferase catalyzed formation of ethyl glucuronide in human liver microsomes and recombinant UGTs, *Forensic Sci. Int.* 2005; 153: 109-116.
10. Schmitt G, Droenner P, Skopp G, Aderjan R. Ethyl glucuronide concentration in serum of human volunteers, teetotalers, and suspected drinking drivers. *J Forensic Sci* 1997; 42:1099-1102.
11. Lange LG, Bergmann SR, Sobel BE. Identification of fatty acid ethyl esters as a product of rabbit myocardial ethanol metabolism. *J. Biol. Chem.* 1981; 256: 12968-12973.
12. Musshoff F, *Chromatographic methods for the determination of*

- markers of chronic and acute alcohol consumption, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 2002; 781: 457–480,
13. Doyle KM, Bird DA, al-Salihi S, Hallaq Y, Cluette-Brown JE, Goss KA, and Laposata M. Fatty acid ethyl esters are present in human serum after ethanol ingestion, *J. Lipid Res.* 1994; 35: 428–437.
  14. Borucki K, Kunstmann S, Dierkes J, Westphal S, Diekmann S, Bogerts B, Luley C. In heavy drinkers fatty acid ethyl esters in the serum are increased for 44 hr after ethanol consumption. *Alcohol Clin. Exp. Res.*, 2004; 28: 1102–1106.
  15. Harris, Everhart ET, Mendelson J, Jones RT. The pharmacology of cocaethylene in humans following cocaine and ethanol administration, *Drug Alcohol Depend.*, 2003; 72: 169–182.
  16. Auwärter V, Sporkert F, Hartwig S, et al. Fatty acid ethyl esters in hair as markers of alcohol consumption. Segmental hair analysis of alcoholics, social drinkers, and teetotalers. *Clin Chem.* 2001; 47: 2114–2123.
  17. Pragst F, Auwärter V, Sporkert F, et al. Analysis of fatty acid ethyl esters in hair as possible markers of chronically elevated alcohol consumption by headspace solid-phase microextraction (HS-SPME) and gas chromatography–mass spectrometry (GC-MS). *Forensic Sci. Int.* 2001; 121:76–88.
  18. Sachs H, Drogennachweis in haaren, in: H. Kijewski (Ed.), *Proceedings of the Symposium “Das Haar als Spur. Spur der Haare”*, November 24, 1993, Göttingen, Schmidt-Römhild, Lübeck. 119–133.
  19. Aderjan R, Besserer K, Sachs H, Schmitt G, Skopp G. Ethyl Glucuronide – A non-volatile ethanol metabolite in human hair. *Proceedings of the TIAFT-SOFT Joint Meeting*. Tampa, FL. 1994; 39-45.
  20. Skopp G, Schmitt G, Pötsch L, Dröner P, Aderjan R, Mattern R. Ethyl glucuronide in human hair. *Alcohol Alcohol.* 2000; 35: 283–285.
  21. Alt A, Janda I, Seidl S, Wurst FM. Determination of ethyl glucuronide in hair samples. *Alcohol Alcohol.* 2000; 35: 313–314
  22. Janda I, Weinmann W, Kuehnle T. Determination of ethyl glucuronide in human hair by SPE and LC-MS/MS. *Forensic Sci. Int.* 2002; 128: 59–65
  23. Jurado C, Soriano T, Giménez MP, Menéndez M. Diagnosis of chronic alcohol consumption. Hair analysis for ethyl-glucuronide. *Forensic Sci Int.* 2004; 145: 161-166.
  24. Yegles M, Labarthe A, Auwärter V, Hartwig S, Vater H, Wennig R, Pragst F. Comparison of ethyl glucuronide and fatty acid ethyl ester concentrations in hair of alcoholics, social drinkers and teetotalers. *Forensic Sci Int.* 2004;145:167-173.
  25. Morini L, Politi L, Groppi A, Stramesi C, Polettoni A. Determination of ethyl glucuronide in hair samples by liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* 2006; 41: 34–32.
  26. Bendroth P, Kronstrand R, Helander A, Greby J, Stephanson N, Krantz P. Comparison of ethyl glucuronide in hair with phosphatidylethanol in whole blood as post-mortem markers of alcohol abuse. *Forensic Sci. Int.* 2008; 176: 76–81.
  27. Klys M, Woźniak K, Rojek S, Rzepecka-Woźniak E, Kowalski P. Ethanol related death of a child: an unusual case report. *Forensic Sci. Int.* 2008; 179: e1-4.
  28. Paul R, Kingston R, Tsanaclis L, Berry A, Guwy A. Do drug users use less alcohol than non-drug users? A comparison of ethyl glucuronide concentrations in hair between the two groups in medico-legal cases. *Forensic Sci Int.* 2008;176:82-86
  29. Alvarez I, Bermejo AM, Tabernero MJ, Fernández P, Cabarcos P, López P . Microwave-assisted extraction: a simpler and faster method for the determination of ethyl glucuronide in hair by gas chromatography-mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem.* 2009; 393:1345-1350.
  30. Concheiro M, Cruz A, Mon M, de Castro A, Quintela O, Lorenzo A, López-Rivadulla M. Ethylglucuronide determination in urine and hair from alcohol withdrawal patients. *J Anal Toxicol.* 2009; 33: 155-161.
  31. Kharbouche H, Sporkert F, Troxler S, Augsburg M, Mangin P, Christian Staub C. Development and validation of a gas chromatography–negative chemical ionization tandem mass spectrometry method for the determination of ethyl glucuronide in hair and its application to forensic toxicology. *J. Chromatography B.* 2009; 877: 2337–2343
  32. Kintz P, Villain M, Vallet E, Etter M, Salquebre G, Cirimele V. Ethyl glucuronide: Unusual distribution between head hair and pubic hair”, *For. Sci. Int.* 2008; 176: 87-90.
  33. Society of Hair Testing. Recommendations for hair testing in forensic cases. *For. Sci. Int.* 2004; 145:83-85.
  34. SAMHSA, Department of Health and Mental Services, Substance Abuse and Mental Health Services Administration, Proposed Revisions to Mandatory Guidelines for Federal Workplace Drug Testing Programs, *Federal Register.* 2004; 69(71): 19673–19732.
  35. Politi L, Morini L, Leone F, Polettoni A. Ethyl glucuronide in hair: is it a reliable marker of chronic high levels of alcohol consumption. *Addiction* 2006; 101: 1408–1412
  36. Pragst F and Yegles M, Determination of Fatty Acid Ethyl Esters (FAEE) and ethyl glucuronide (EtG) in hair: a promising way for retrospective detection of alcohol abuse during pregnancy? *Ther. Drug Monit.* 2008; 30: 255-263,
  37. Appenzeller BM, Agirman R, Neuberg P, Yegles M, Wennig R. Segmental determination of ethyl glucuronide in hair: a pilot study. *Forensic Sci. Int.* 2007; 173: 87–92.
  38. Reid RW, O’Connor FL, and Crayton JW, The in vitro differential binding of benzoylecgonine to pigmented human hair samples, *J. Toxicol. Clin. Toxicol.* 1994; 32: 405,
  39. Pragst F and Balikova MA. State of the art in hair analysis for detection of drug and alcohol abuse. *Clinica Chimica Acta.* 2006; 370: 17–49
  40. Krivankova L, Caslavská J, Malásková H, Gebauer P, Thormann W. Analysis of ethyl glucuronide in human serum by capillary electrophoresis with sample self-stacking and indirect detection. *Journal of Chromatography A.* 2005; 1081: 2–8

41. Appenzeller BMR, Schuman M, Yegles M and Wennig R. Ethyl glucuronide concentration in hair is not influenced by pigmentation. *Alcohol & Alcoholism* 2007; 42: 326–327.
42. Kulaga V, Velazquez-Armenta Y, Aleksa K, Vergee Z, Koren G. The effect of hair pigment on the incorporation of fatty acid ethyl esters (FAEE) *Alcohol Alcohol*. 2009; 44: 287-292.
43. Jurado C, Kintz P, Menéndez M, Repetto M. Influence of the cosmetic treatment of hair on drug testing. *Int. J. Legal Med.* 1997; 110: 159-163.
44. Hartwig S, Auwärter V, Pragst F, Effect of hair care and hair cosmetics on the concentrations of FAEE in hair as markers of chronically elevated alcohol consumption, *Forensic Sci. Int.* 2003; 131:90-97
45. Mangin P, Drug analysis in non head hair, in: P. Kintz (Ed.), *Drug Testing in Hair*, Boca Raton CRC Press, 1996, 279–287.
46. Kerekes I, Yegles M, Grimm U, Wennig R, Ethyl glucuronide determination: head hair versus non-head hair, *Alcohol Alcohol* 2009; 44: 62-66.
47. Hartwig S, Auwärter V, Pragst F, “Fatty acid ethyl esters in scalp, pubic, axillary beard and body hair as markers for alcohol misuse” *Alcohol & Alcoholism*. 2003; 38: 163-167.
48. Pötsch L. A discourse on human hair fibers and reflections on the conservation of drug molecules. *Int J Legal Me.* 1996; 108:285-293
49. Jurado C. Análisis de drogas de abuso en muestras de pelo. *Diagnóstico del consumo crónico. Trastornos adictivos.* 2007; 9: 172-183.
50. Auwärter V, Kiessling B, Pragst F. Squalene in hair—a natural reference substance for the improved interpretation of fatty acid ethyl ester concentrations with respect to alcohol misuse. *Forensic Sci. Int.* 2004;145: 149–159.