



**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE PUEBLA**



**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
DEPARTAMENTO DE ANÁLISIS CLÍNICOS**

TESIS

**“VALORACIÓN DE ALFAFETOPROTEÍNA HEPÁTICA EN
RATA WISTAR CON CONSUMO CRÓNICO DE ALCOHOL
EN COMBINACIÓN CON BEBIDAS ENERGIZANTES”**

Para obtener el título de:

LICENCIADO EN QUÍMICO FARMACOBIOLOGO

Presenta

pQ.F.B. NATALY SÁNCHEZ ROJAS

Director de Tesis

DC. SAMUEL TREVIÑO MORA

Asesor de Tesis

DC. ALFONSO DANIEL DÍAZ FONSECA

Junio 2017

Índice

Abreviaturas

1. Marco teórico
 - 1.1 Generalidades del hígado
 - 1.2 Anatomía del hígado
 - 1.3 Unidades morfofuncionales del hígado
 - 1.4 Funciones del hígado
 - 1.4.1 Metabólicas
 - 1.4.2 Inmunológicas
 - 1.4.3 Formación y secreción de bilis
 - 1.4.4 Detoxificación
 - 1.4.5 Almacén
 - 1.5 Fisiología de las alteraciones hepáticas
 - 1.5.1 Inflamación
 - 1.5.2 Síntesis de proteínas
 - 1.5.2.1 Alfafetoproteína
 - 1.5.3 Regeneración
 - 1.6 Factores de riesgo
 - 1.6.1 Consumo de alcohol
 - 1.6.2 Consumo de bebidas energizantes
 - 1.7 Enfermedades hepáticas
 - 1.7.1 Fibrosis
 - 1.7.2 Cirrosis
 - 1.7.3 Cáncer
2. Planteamiento del problema
3. Pregunta de investigación
4. Justificación
5. Objetivos
 - 5.1. Objetivo general

- 5.2. Objetivos específicos
- 6. Hipótesis
 - 6.1 Hipótesis nula
 - 6.2 Hipótesis alternativa
- 7. Diagrama de trabajo
- 8. Metodología
 - 8.1. Material y métodos
 - 8.2. Manejo estadístico de los datos y pruebas estadísticas
 - 8.3. Aspectos bioéticos
- 9. Resultados
- 10. Discusión
- 11. Conclusión
- 12. Recursos
 - 12.1 Recursos humanos
 - 12.2. Recursos materiales
 - 12.3. Recursos financieros
- 13. Bibliografía

Abreviaturas

aa. : Aminoácidos

AFP: Alfafetoproteína

ACH: Acetaldehído

ADH: Alcohol deshidrogenasa

ALDH: Aldehído deshidrogenasa

ALAT: Alanina aminotransferasa

ASAT: Aspartato aminotransferasa

γ -GT: Gamma-glutamil transferasa

BE: Bebida energizante

CYP2E1: Citocromo P450 2E1

GSH: glutatión

HC: Hepatocarcinoma

NF- κ B: Factor nuclear κ B

RFA: Reactantes de fase aguda

ROS: Especies reactivas de oxígeno

TNF- α : Factor de necrosis tumoral α

TP: Tiempo de protrombina

1. MARCO TEÓRICO

1.1 Generalidades del hígado

El hígado es la glándula de mayor tamaño, su peso aproximado es de 1 800 g en los hombres y 1 400 g en mujeres, representa más o menos 2.5% de la masa corporal magra¹. Está localizado en el cuadrante superior derecho del abdomen, en el espacio peritoneal justo por debajo del lado derecho del diafragma (Fig.1). El hígado está revestido por una capsula de tejido conjuntivo fibroso (capsula de Glisson).²

Desde el punto de vista anatómico, se divide en dos lóbulos predominantes, uno derecho (siendo el más grande) y uno izquierdo; el lóbulo derecho tiene dos secciones de menor tamaño: el lóbulo caudado posterior y el lóbulo cuadrado inferior;³ formados cada uno por segmentos que contienen miles de *lobulillos hepáticos*, siendo la unidad funcional básica de este órgano.⁴

Sin embargo, existe otra clasificación descrita por Claude Couinaud en los años 50's, donde el hígado se divide en ocho segmentos (Cuadro 1), cada segmento es suministrado por una *triada portal* compuesta por una vena porta, arteria hepática y conducto biliar.

Cuadro 1. Segmentos por Couinaud

Segmentos por Couinaud	Lóbulos
Segmento I	Lóbulo caudado
Segmento II	Segmento anterior del lóbulo izquierdo
Segmento III	Segmento posterior del lóbulo izquierdo
Segmento IV	Segmento medial del lóbulo izquierdo
Segmento V y VIII	Segmentos anteriores del lóbulo derecho
Segmento VI y VII	Segmentos posteriores del lóbulo derecho

El tejido hepático recibe cerca del 25% del gasto cardiaco, alrededor de 1 500 mL de flujo sanguíneo por minuto por medio de dos fuentes: el flujo sanguíneo que proviene de la vena porta (75%), formada por la confluencia de la vena esplénica y la vena

mesentérica superior, esta irrigación contiene nutrientes y otro tipo de sustancias; y el flujo proveniente de la arteria hepática (25%) que surge del eje celíaco, este flujo es importante para la oxigenación hepática.³

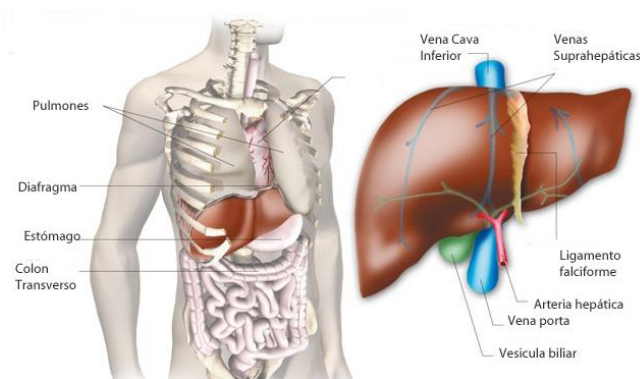


Fig. 1 Localización y anatomía del hígado

1.2 Anatomía hepática

El hígado consta de muchos tipos de células, en términos generales pueden clasificarse en células parenquimatosas (hepatocitos) y células no parenquimatosas (células de Kupffer, células endoteliales sinusoidales, fibroblastos, células estelares).⁵

El tejido hepático está formado por unidades funcionales: lobulillos hepático, este tiene una forma hexagonal, se constituye alrededor de una vena central (o centrolobulillar). El propio lobulillo se compone, en esencia, de múltiples placas celulares (hepatocitos) dispuestos en sentido radial en láminas alrededor de la vena central. Cada hepatocito está en contacto con la pared de los sinusoides a través del espacio de Disse (área subendotelial), así como la superficie de los hepatocitos circundantes. Los sinusoides están recubiertos por: células endoteliales, que constituyen la pared de los sinusoides; células de Kupffer que son macrófagos especializados; células estelares (también llamadas células de Ito o lipocitos) que son células que almacenan grasa.³

Esta arquitectura de los hepatocitos alineados con los sinusoides, que consiste en una capa discontinua de células endoteliales fenestradas, es decir, tiene poros

transcelulares con un diámetro medio aproximadamente de 160 nm (en ratas), lo que permite la permeabilidad bidireccional y el intercambio de materiales a partir de los hepatocitos y la sangre, por tal razón la resistencia a la transferencia de sustancias es baja, regulando el tráfico de partículas.

Cada placa de hepatocitos suele componerse de dos células y entre ella se encuentran los canaliculos biliares que drenan bilis. La bilis es un fluido complejo que contiene sustancias orgánicas e inorgánicas (agua, electrolitos, sales biliares, colesterol, fosfolípidos, etc.) disueltas en una solución alcalina, su función es ayudar a la digestión y a la absorción de lípidos y vitaminas liposolubles, eliminar los productos de desecho, la bilis fluye en dirección contraria a la de la sangre.^{4, 5,6} (Fig. 2).

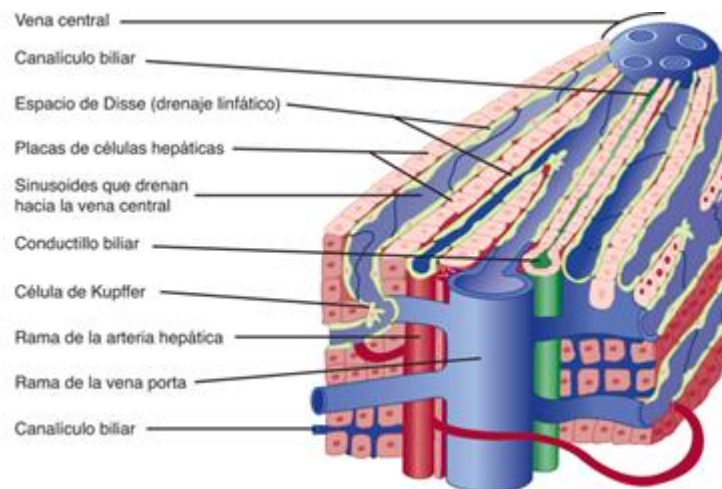


Fig.2 Estructura detallada del lobulillo hepático. (Tomado de Khalili M, Burman B. 2015)

1.3 Unidades morfofuncionales del hígado

Se puede diferenciar tres unidades morfofuncionales en el hígado:

- A. Lobulillo hepático clásico**, el cual tiene una forma hexagonal y se encuentra alrededor de una vena centrolobulillar y espacios portales con las triadas portales en sus ángulos de la periferia.
- B. Lobulillo portal**; se basa en el carácter exocrino del hígado, teniendo como principal función la secreción de bilis, por tanto el eje morfológico de este

lobulillo es el conducto biliar interlobulillar de la triada portal del lobulillo clásico. Tiene un espacio portal en su centro y venas centrolobulillares en sus extremos.

C. Acino hepático; tiene forma romboidal y es la unidad funcional más pequeña del parénquima hepático. El eje menor del acino está definido por las ramas terminales de la triada portal que siguen el límite entre dos lobulillos clásicos. El eje mayor es una línea perpendicular trazada entre las dos venas centrolobulillares más cercanas al eje menor.

El mantenimiento de la homeostasia del hígado depende de la función metabólica de este órgano, para llevar a cabo estas funciones, los hepatocitos son quiescentes o altamente especializados (K. Jungermann), es decir, se especializan basándose en la posición a lo largo del eje porto-central. Por tanto, esta unidad (acino hepático) es necesaria para entender los patrones de daño celular, por lo que se diferencian tres zonas:

- Zona 1: es la más próxima al eje vascular del acino. En esta zona los hepatocitos reciben un excelente aporte de nutrientes y oxígeno, por lo que tienen un metabolismo más activo. Estas células son las primeras expuestas a sustancias tóxicas que llegan al hígado.
- Zona 2: es una zona de actividad metabólica intermedia y se localiza entre las zonas 1 y 3.
- Zona 3: es la zona más próxima a las venas centrolobulillares. Los hepatocitos de esta zona reciben menos aporte de oxígeno y nutrientes. (Fig. 3).²

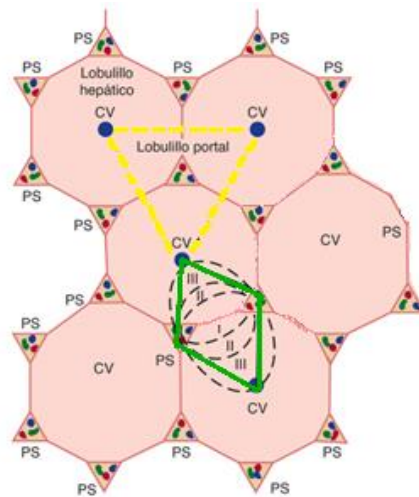


Fig. 3 Comparación del lobulillo clásico, el lobulillo portal (punteado amarillo) y el acino portal (línea verde) con las zonas 1, 2 y 3. (Modificado de Khalili M, Burman B. 2015)

1.4 Funciones del hígado

El hígado es esencial para la vida llevando a cabo una vasta gama de funciones, sin embargo, realiza sus funciones correspondientes en zonas específicas:

1.4.1 Metabólicas

El hígado desempeña funciones metabólicas aportando al cuerpo la energía que necesita, a continuación se resumirán las funciones metabólicas de mayor interés:

a) Carbohidratos

Este órgano juega un papel importante en el mantenimiento de la glucosa en un intervalo normal mediante un sistema estrechamente regulado de enzimas y quinasas que regulan la descomposición de la glucosa, el almacenamiento como glucógeno o la síntesis en los hepatocitos (glucogénesis). Este proceso está bajo el control de glucorreguladores, entre los cuales la insulina y el glucagón juegan un papel clave. El hígado como órgano sensorial detecta un gradiente de concentración de glucosa entre la arteria hepática y la vena porta por los nervios sensores-efectores intrahepáticos, generando una señal colinérgica para una captación neta de glucosa hepática dependiente de la insulina.

Los carbohidratos ingeridos en la dieta en forma de polisacáridos (almidón) o como disacáridos (sacarosa, lactosa), se transforman bajo la acción de enzimas en monosacáridos (glucosa, fructosa, galactosa, ribosa), llegan al hígado por la vena porta, siendo absorbidos por los hepatocitos. La entrada de glucosa en los hepatocitos se da por fusión facilitada por transportador de membrana (Glut-2); en el hepatocito la glucosa es rápidamente transformada en glucosa-6-fosfato y de ahí a glucosa-1-fosfato, siendo incorporada al glucógeno, reacción catalizada por la glucógeno sintetasa, proceso llamado *glucogénesis*, principal forma de almacenamiento de carbohidratos del organismo humano, este proceso se da en los hepatocitos periportales. En la *glucólisis*, que generalmente ocurre en hepatocitos perivenosos, la fosforilación de glucosa en glucosa-6-fosfato constituye la primera etapa, asegurada por una glucoquinasa degradando la glucosa en ácido pirúvico. La desfosforilación de la glucosa-6-fosfato catalizada por la glucosa 6-fosfatasa, mantiene el ciclo glucosa/glucosa-6-fosfato. El ácido pirúvico es precursor del radical acetilo y del ion acetato, que forman el acetil-coenzima A.

Debido a la alta capacidad del transportador de glucosa (Glut-2) en el hígado, los niveles de glucosa intra y extracelular están en un equilibrio estricto en los hepatocitos. Se ha demostrado que la glucoquinasa (GK) es la enzima limitante de la velocidad para la utilización de la glucosa.⁴

Por otro lado, la fructosa participa en metabolismo de los carbohidratos, está controlado por la enzima fosfofructoquinasa, su transformación en fructosa 1-6-difosfato podrá transformarse en glucosa o glucógeno; produciendo acetil-coenzima A y gliceraldehído-3-fosfato. De igual forma, la galactosa es fosforilada por una galactoquinasa transformándose en uridil-difosfo-galactosa, que es utilizada en la síntesis de diversas glicoproteínas y de glucosaminglicanos.

b) Lípidos

El hígado es un importante regulador del metabolismo de los lípidos, desempeñando un papel central en la síntesis y degradación (oxidación) de los ácidos grasos. Los ácidos grasos sirven como una fuente importante de energía, son fundamentales

para una variedad de procesos biológicos incluyendo la síntesis de los lípidos de la membrana celular y la generación de lípidos que contienen mensajeros implicados en la transducción de señales.

El mecanismo por el cual los ácidos grasos entran en los hepatocitos todavía no ha sido totalmente elucidado, pero parece que las proteínas transportadoras de ácidos grasos (FATP) desempeñan un papel importante en la captación hepatocelular. Además, los hepatocitos contienen proteína citoplasmática de unión a ácidos grasos (FABP1) y la translocasa de ácidos grasos (FAT / CD36).

Además de la síntesis, la oxidación y la secreción de ácidos grasos para el transporte y el almacenamiento en tejidos extrahepáticos, el hígado también funciona en el mantenimiento de los lípidos plasmáticos, a través de su capacidad de ensamblar y segregar lipoproteínas en la circulación y tiene un papel central en la eliminación de las lipoproteínas de la circulación.

Así mismo, en el hígado ocurre la *lipólisis*: degradación de triglicéridos en glicerol y ácidos grasos, que son degradados en acetil-coA por β -oxidación mitocondrial. Los ácidos grasos originados en la lipólisis contribuyen a la *novo* síntesis de triglicéridos, excretados en forma de lipoproteínas de muy bajo peso molecular. La *lipogénesis*, síntesis de ácidos grasos a partir de acetil-coA y de triglicéridos a partir de ácidos grasos y glicerolfosfato, es una vía alimentada casi exclusivamente por la glucólisis. El Acetil-CoA resulta de la acción de una piruvato deshidrogenasa sobre el piruvato en el interior de la mitocondria; posteriormente, en presencia de la acetil-coA carboxilasa y citrato en el citoplasma el acetil-coA se convierte en Malonil-CoA, que es el primer intermediario de la síntesis de ácidos grasos. La *síntesis de triglicéridos* se hace por esterificación de ácidos grasos libres en el hígado. Además hay producción de fosfolípidos y lipoproteínas, como la apoproteína B, que se ligan a los triglicéridos y pasan a la circulación, reacción estimulada por la insulina.

La síntesis hepática de colesterol depende de la cantidad absorbida por el intestino de este esteroide, además de otros factores como catecolaminas y estrógenos. Se hace a partir de moléculas de acetil-coA, por intermedio de mevalonato y de

escualeno. El colesterol se excreta en la bilis, siendo convertido en ácidos biliares, pero cerca de 70% del colesterol plasmático es esterificado a ácido graso.^{3,5}

c) Proteínas

Tras la alimentación, el hígado capta aminoácidos (a.a.) de la circulación portal, el catabolismo de los a.a. en el hepatocito se realiza a través de dos mecanismos: transaminación y desaminación oxidativa.

En la *transaminación*, un grupo amino es transferido a un cetoácido (prácticamente siempre, α -cetoglutarato). Ese proceso se realiza por enzimas citosólicas, llamadas transaminasas o aminotransferasas, de las que dispone de manera muy generosa el hepatocito (y otros tejidos, como el músculo, el cerebro y el riñón), recibiendo el nombre del aminoácido que cede el grupo amino o del producto final. Las dos transaminasas o aminotransferasas mejor conocidas y de mayor uso en el diagnóstico de las enfermedades hepáticas son: aspartato-transferasa (el donador de NH_2 es el aspartato), conocida con las siglas ASAT y también TGO (transaminasa glutámico-oxalacética, porque el producto final es oxalacetato); la segunda transaminasa importante es la alanina-transferasa o ALAT (el donador es la alanina), conocida también como TGP (transaminasa glutámico-pirúvica, porque el producto final es piruvato). Ambas tienen un segundo producto final común: el glutamato. Mientras que el oxalacetato y el piruvato procedentes de la transaminación pueden ser utilizados para la síntesis de glucosa, el glutamato sufrirá la desaminación oxidativa. En el hepatocito la enzima encargada de esta desaminación es la glutamato-deshidrogenasa (enzima mitocondrial), cuyo objetivo es la elaboración de amoníaco y α -cetoglutarato.⁷

Por otro lado, el hígado sintetiza y secreta continuamente proteínas, siendo esta una función especializada del hepatocito, el retículo endoplasmático rugoso es el orgánulo encargado de la síntesis de diversas proteínas como: albúmina, fibrinógeno y diversas proteínas mediadoras de reacciones inflamatorias y de la coagulación sanguínea. Sin embargo, la síntesis en el hígado sólo se puede dar en una población de hepatocitos, un ejemplo de este carácter local del control de la síntesis se observa

en la llamada fase aguda de la respuesta inflamatoria, en que solo los hepatocitos situados en posiciones perilobulares, participan en la respuesta primaria.

Cuadro 2. Principales proteínas

Función	Proteínas
Antiproteasas	α -1-antitripsina α -2-macroglobulina antitrombina
Coagulación de la sangre	Diversos factores de la coagulación, fibrinógeno
Enzimas	Aminotransferasas, colinesterasa, entre otras
Hormonas	Eritropoyetina
Defensas inmunitarias	Proteínas del complemento y β -2- macroglobulina
Participación en respuestas inflamatorias	Proteínas de fase aguda
Oncofetal	α -fetoproteína
Transporte o unión de proteínas	Albumina Globulina de unión a corticoesteroides (transcortina) Haptoglobinas Lipoproteínas Transferrina Transferritina

Harper. Bioquímica (modificado de Murray y cols. 2010)

1.4.2 Funciones inmunológicas

El hígado tiene capacidad para influir sobre la respuesta inmunitaria, actúa como primera línea defensiva frente a agentes patógenos, tóxicos y carcinogénicos procedentes del aparato digestivo debido a la vascularización, en el hígado, actúan

como células presentadoras de antígenos (Ag) células de Kupffer como representantes del sistema mononuclear fagocítico, células endoteliales sinusoidales, células estelares y los propios hepatocitos.⁷

Las células de Kupffer son macrófagos hepáticos residentes, móviles, de forma irregular y se localizan en el lumen de los sinusoides adheridos a las células endoteliales. El tamaño y la actividad fagocítica (contenido lisosómico y actividad enzimática) de las células de Kupffer son mayores en el área periportal y menos en el área pericentral. Las diferencias funcionales en las células de Kupffer periportal y pericentral también se ilustran mediante un nivel relativamente mayor de síntesis de factor de necrosis tumoral- α (TNF- α), prostaglandina E2 (PGE2) e IL-1. También, las células de Kupffer pueden eliminar microorganismos, eritrocitos senescentes y dañados y las células neoplásicas circulantes, fagocitar una variedad de materiales como restos celulares y bacterias o fragmentos bacterianos. Sin embargo, la fagocitosis por las células de Kupffer desencadena la síntesis de ROS, citocinas y quimiocinas, que desempeñan un papel importante en la defensa, así como respuestas inflamatorias.

Por otro lado, el hígado interviene en la respuesta inmunitaria a través de la síntesis de elementos del complemento, el más importante es la síntesis en el hepatocito de la fracción C3, elemento clave en las dos vías de activación conocidas (clásica y alternativa). El hepatocito sintetiza, además, otras fracciones del complemento: C6, C8, C9, así como una fracción muy especial por sus implicaciones: el C1-INH (C1-inhibidor esterasa), que es el iniciador de la activación de la vía clásica.^{5,6}

1.4.3 Formación y secreción de bilis

El hígado sintetiza en los hepatocitos ácido biliar que conforman la bilis, ya que es el único órgano que tiene todas las enzimas necesarias para este proceso. Hay dos vías principales biosintéticas de ácidos biliares: la *vía del ácido biliar neutro* (o ruta clásica) es iniciada por el colesterol 7 α -hidroxilasa (CYP7A1), una enzima de la familia de citocromo P-450 localizada en el retículo endoplásmico del hígado y la *vía ácida* (o vía alternativa) es iniciada por el esteroide 27-hidroxilasa (CYP27A1), una

enzima de citocromo P-450 localizada en la mitocondria de la mayoría de los tejidos. La vía neutra es la vía principal que sintetiza dos ácidos biliares primarios, ácido cólico y ácido quenodeoxicólico en el hígado humano. Existen receptores en la regulación de la síntesis de ácidos biliares, la secreción, absorción intestinal y captación hepática, como los FXR (receptor farnesoides X) ya que activa la transcripción del gen diana en forma estricta, para regular dos mecanismos de retroalimentación positiva o negativa, de acuerdo con los requerimientos del organismo.

Los ácidos biliares sintetizados en el hígado son inmediatamente secretados en la bilis, reabsorbidos en el intestino y transportados de vuelta al hígado. La circulación enterohepática de los ácidos biliares no sólo juega un papel importante en la absorción y transporte de nutrientes y eliminación de metabolitos tóxicos y xenobióticos, sino que también sirve como un control de retroalimentación de la síntesis de ácidos biliares.

La bilis está constituida por los ácidos biliares, pigmentos biliares como los glucorónicos (bilirrubina y biliverdina), electrolitos y otras sustancias en una solución alcalina. El flujo biliar es centrifugo, es decir, se dirige desde la región de la vena centrolobulillar hacia el espacio portal (un sentido opuesto al flujo sanguíneo).^{5,6}

1.4.4 Detoxificación

El cuerpo está expuesto a una variedad de productos químicos todos los días en forma de agentes farmacéuticos, productos químicos domésticos, suplementos dietéticos y contaminantes ambientales, muchos de los cuales son extremadamente tóxicos. El hígado es el principal órgano implicado en el metabolismo de los xenobióticos, incluidos los productos químicos y los agentes farmacéuticos.

Las reacciones químicas involucradas en el metabolismo del fármaco generalmente convierten los productos químicos en metabolitos más solubles en agua, haciéndolos más fáciles para la excreción eventual en la orina. Mientras que muchas reacciones catalizadas por las enzimas resultan en más productos solubles en agua, que son relativamente menos dañinos, varias de las reacciones mediadas por estas enzimas

dan lugar a la producción de intermedios metabólicos, que son altamente reactivos e inducen daño tisular.⁵

En los hepatocitos se llevan a cabo las reacciones de biotransformación que se clasifican en reacciones de fase I y II. En la fase I, el compuesto puede oxidarse, reducirse o hidrolizarse por ayuda de un gran número de enzimas (monooxigenasa, alcohol deshidrogenasa y aldehído deshidrogenasa) y por miembros de la familia de los citocromos P450 (CYP450). Lo cual hace que los productos y tóxicos se transforman de poco polares y poco hidrosolubles en productos mucho más polares e hidrosolubles que, en consecuencia, son mucho más fácilmente eliminables por la orina. Las reacciones de fase II son reacciones de conjugación para xenobióticos o tóxicos y para la bilirrubina, la reacción se realiza mediante transferasas (glutación transferasas, glucuronosiltransferasas, sulfotransferasas, metiltransferasas y N-acetil transferasas).

Los productos formados son demasiado hidrófilos para difundirse pasivamente a través de la membrana canalicular en la bilis o a través de la membrana basolateral hepática en la sangre sinusoidal, además existen transportadores miembros de la familia de proteínas (MRP) dirigida por ATP localizados en la membrana basolateral de los hepatocitos como: ABCC3 (MRP3), ABCC4 (MRP4), ABCC5 (MRP5) y ABCC6 (MRP6).^{5,6}

1.4.5 Almacén

El hígado actúa como órgano de depósito de numerosas sustancias, el almacenamiento de glucógeno, los depósitos de vitaminas liposolubles (A, D y E) y los metales de hierro en forma de ferritina son ejemplos.

Las células estelares o células de Ito, son células perisinusoidales, tienen papel de depósito de grasa además almacena vitamina A, siendo el principal almacenador de esta vitamina. Estas células se localizan en el espacio de Disse adyacente a los hepatocitos, bajo la capa de las células endoteliales sinusoidales.

1.5 Fisiopatología de las alteraciones hepáticas

Cualquier daño persistente en el parénquima hepático como virus, medicamentos, toxinas, ingesta de alcohol, y metabolismos alterados; puede provocar un deterioro tanto morfológico como funcional en este órgano originando alguna lesión hepática gravosa. El hígado responde a los distintos tipos de agresiones con una serie de modificaciones como:

1.5.1 Inflamación

La inflamación es la respuesta protectora natural de las células inmunes innatas a las señales de peligro para eliminar la causa y mantener la homeostasis. La respuesta inflamatoria en el hígado contribuye en gran medida al desarrollo de enfermedades hepáticas agudas y crónicas.

En las formas agudas de lesión hepática causada por virus, fármacos o resección hepática, las respuestas inflamatorias desempeñan un papel importante que conduce a lesiones citotóxicas. La activación de las células de Kupffer conduce a la modificación de su morfología y expresión superficial de marcadores clásicos de macrófagos tales como CD68 (ED1) y CD163 (ED2), así como la producción de un gran número de mediadores inmunes incluyendo citocinas tales como interleucina 1 (IL-1), factor de necrosis tumoral α (TNF- α), interleucina 6 (IL-6), interleucina 8 (IL-8) y especies de oxígeno reactivo (ROS).

Las citoquinas proinflamatorias incluyendo TNF- α , IL-1 e IL-6 están aumentadas en la mayoría de los tipos de inflamación hepática. TNF- α desempeña un papel importante en la homeostasis del hígado, ya que puede activar las vías proapoptóticas (caspasas) y antiapoptóticas (NF- κ B) en los hepatocitos, contribuir a la regeneración hepática, promover la esteatosis y ejercer efectos metabólicos.

La homeostasis celular en el hígado requiere un equilibrio de rutas intrínsecas extrínsecas o apoptóticas. La apoptosis de los hepatocitos tiene un papel importante en la lesión hepática posterior al inicio de la inflamación en una amplia gama de

enfermedades hepáticas tales como hepatitis viral, hepatitis alcohólica, lesión por isquemia, hepatitis fulminante y cáncer.

Sin embargo, dependiendo de la etiología del daño hepático, será la respuesta y las vías de señalización que los hepatocitos y las células no parenquimatosas darán como respuesta a dicha agresión.⁵

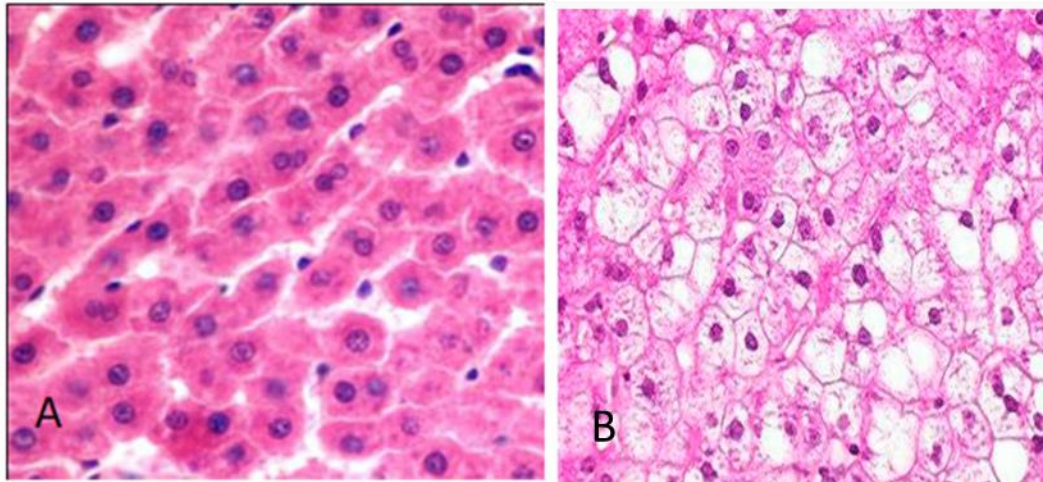


Fig. 4 A) Hepatocitos normales B) Inflamación lobulillar y esteatosis. (H&E 20X).

1.5.2 Síntesis de proteínas de fase aguda

Cuando existe una alteración en hígado, este responde a la agresión dando como primera respuesta la inflamación, en este proceso se desencadenan varias señales, una de ellas es el incremento en citocinas (IL1, IL-6, TFN- α), lo que estimula la respuesta de fase aguda, es decir, la producción de *proteínas de fase aguda o reactantes de fase aguda* (RFA).^{8,9}

Los RFA se expresan durante la inflamación sistémica aguda y crónica, teniendo un papel importante en el daño tisular. Estas proteínas sintetizadas por el hígado por lo general forman parte del grupo de las α 1-globulinas y α 2-globulinas.

Las proteínas de fase aguda son:

- α 1- antritipsina
- Proteína C reactiva
- α 1-glicoproteína ácida

- Haptoglobina
- Fracción C3 y C4 del complemento
- Fibrinógeno
- Ceruloplasmina
- Alfafetoproteína¹⁰

Los cambios en los niveles de RFA reflejan en gran medida la producción alterada por los hepatocitos, cuya concentración aumenta o disminuye al menos 25% después de una lesión. Aún no se comprende del todo las causas de los cambios en la concentración, pero puede decirse que muchos de los cambios tienen un fin homeostático; por otro lado, estas citocinas también suprimen la síntesis de la albúmina, que se denomina un reactantes de fase negativo, porque sus niveles disminuyen con la inflamación, otros RAF negativo incluyen la transferrina y transtiretina.^{6,11}

Por otro lado, la proteína C reactiva es la primera de estos reactantes en elevar su concentración, esta aumenta rápidamente en respuesta a inflamación, destrucción tisular y puede elevarse en inflamación crónica, sin embargo los demás RFA alcanzan su máxima concentración entre 2 y 5 días. Una respuesta aguda puede evolucionar a una fase crónica (Fig. 5).¹⁰

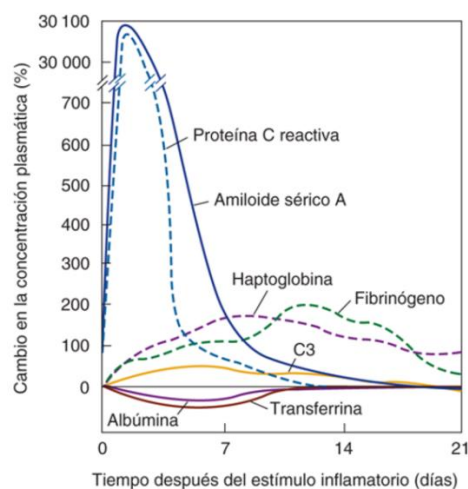


Fig.5 Tiempos para los cambios en algunas proteínas importantes de fase aguda (Modificado de Barrett K y cols. 2016)

Por otro lado, cuando el estímulo es continuo, la inflamación aguda progresa a crónica, es este cambio hay proteínas que permanecen aumentadas como son las α 2-globulinas (haptoglobina, α 2-macroglobulina, ceruloplasmina), por lo que los reactantes de fase aguda especialmente la proteína C reactiva, α 1-antitripsina y α 1 glicoproteína ácida tienden a normalizarse. Sin embargo, la concentración de estas proteínas cambia conforme a la progresión del daño hepático. Además la albumina se puede encontrar normal o muy disminuida de acuerdo con la cronicidad y además se acompaña con un aumento de las gama-globulinas.¹²

1.5.2.1 Alfafetoproteína

Por otro lado, existen proteínas de fase aguda importantes como lo es la alfafetoproteína, la cual es sintetizada normalmente en bajas concentraciones, está considerada como una proteína oncofetal, sin embargo, tiene propiedades importantes cuando existe una alteración fisiopatológica en el hígado.

La Alfafetoproteína (AFP) es una glicoproteína con un peso molecular de 65 kDa aproximadamente sintetizada por las células del saco vitelino, y por el hígado.¹³ Esta proteína corre en las α 1-globulinas (Bergstrand y Czar). Se clasifica como un miembro de la superfamilia de los genes albuminoides que consiste en: albúmina, AFP, proteína de la vitamina D y alfa-albúmina. Los primeros estudios identificaron *isoformas* y variantes de fijación a lectina de la AFP que difieren en sus propiedades fisicoquímicas, pero no en la composición de aminoácidos.

Al igual que la albúmina, se sabe que la AFP sérica se une y transporta una multitud de ligandos tales como bilirrubina, ácidos grasos, retinoides, esteroides, metales pesados, colorantes, flavonoides, fitoestrógenos y diversos fármacos. Esta familia se caracteriza estructuralmente por residuos de cisteína que se pliegan en capas que forman bucles dictados por puentes de disulfuro, dando como resultado un dominio triple, estructura molecular en forma de U (figura 6).

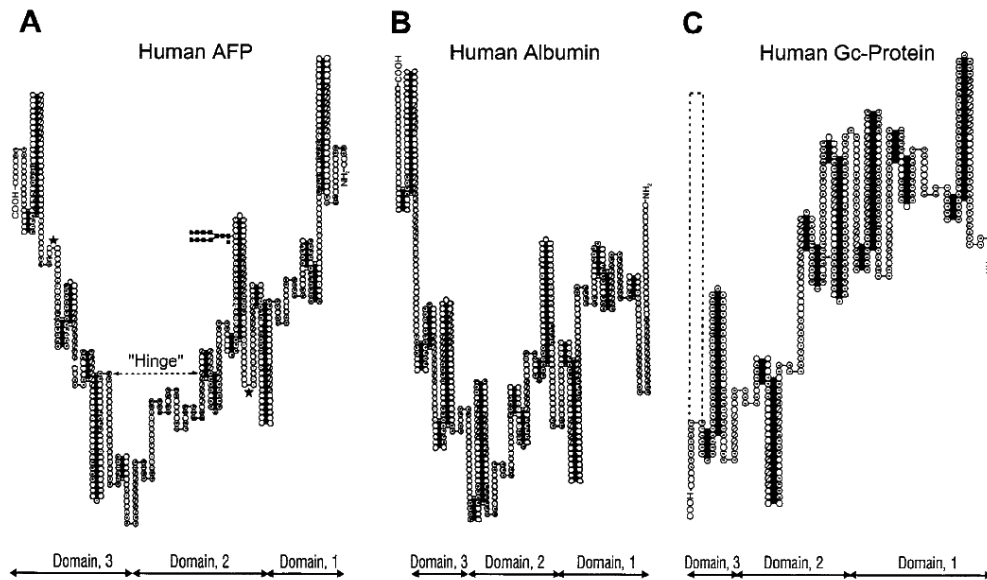


Fig. 6 a) molécula de AFP humana, b) molécula de albumina humana y c) molécula de proteína de la vitamina D (Tomado de Gerald J. Mizejewski 2001)

En humanos, los cuatro genes albuminoides se encuentran en el cromosoma 4 dentro de la región 4q11-q22, abarcando 15 exones y 14 intrones.¹⁴

Está bien establecido que la forma de AFP humana detectada en la mayoría de los radioinmunoensayos (RIA) y los inmunoensayos enzimáticos (EIA) representa el polipéptido de 69.000 a 70.000 kD (2.2 kb). Como se demostró en una revisión filogenética de la AFP (Gerald J. Mizejewski), es la porción amino-terminal (dominio 1) la que distingue la AFP de ratas de otras formas de mamífero como la humana. El dominio 3 exhibe mayor identidad de secuencia de aminoácidos entre los diversos mamíferos que los dominios 1 y 2. El dominio 3 también es conocido por contener un sitio de unión hidrofóbico principal sobre AFP humana. Los dominios 1 y 2 contienen sitios de unión tanto para ácidos grasos como para bilirrubina; sin embargo, el dominio 2 también muestra secuencias de aminoácidos relacionadas con las regiones de adherencia de la matriz celular extracelular, (ECM) y lleva sitios para la fijación de carbohidratos por unión a asparagina.

Tiene una vida media plasmática es de 5.5 días, el nivel más alto en el plasma fetal (3 mg/mL) se alcanza durante las semanas 12 a 14 de la gestación; a partir de la semana 16 el nivel sérico empieza a descender hasta llegar a valores de 8 ng/mL en

los primeros años de vida.¹³ Cifras de AFP entre 100 y 350 ng/mL sugieren carcinoma hepático y valores >400 ng/mL generalmente confirman la neoplasia. El incremento de la concentración de AFP en suero en adultos sugiere el desarrollo de diversos procesos patológicos, en primer lugar se ha descrito los tumores malignos como el cáncer de hígado primario, sin embargo, también se ha visto incrementado en pacientes con hepatitis aguda.

En humanos, la estructura del glicano en la AFP producida por un hepatoma difiere de la producida por un tumor del saco vitelino. Las cadenas de azúcar no están codificadas genéticamente, sino que dependen del conjunto de enzimas de glicosilación presentes en el retículo endoplásmico (RE) y el complejo de Golgi de la célula huésped. Sin embargo, estas enzimas tienen diferentes distribuciones tisulares, y las variantes de la AFP se deben a las diferentes vías específicas del tejido implicadas. Así, la AFP derivada del saco vitelino difiere de la AFP de origen hepático. Las dos formas, encontradas en hepatoma y suero fetal, presentan puntos isoeléctricos de pH 4,8 y 5,2 respectivamente.

Estudios recientes informan que la AFP tiene diferentes funciones en el organismo, tal parece que puede regular el crecimiento mediante varios mecanismos, que pueden incluir la regulación apoptótica, la modulación de señalización citoplásmica y la desensibilización del receptor en células del hígado siguiendo varias vías de señalización. Además, otra función que se ha atribuido el transporte de ácidos grasos en células que proliferan activamente, lo que requiere un mayor suministro de energía, por otro lado, AFP puede interactuar efectivamente con los macrófagos, estimular la proliferación y diferenciación de diversos tipos celulares, sin embargo, a pesar de un estudio intensivo, muchas funciones de la AFP siguen siendo bastante misteriosas y contradictorias.¹⁴

1.5.3 Regeneración

Los casos de daño importante de tejido, especialmente en los tejidos derivados del endodermo, los órganos afectados tienen la capacidad de expandirse en tamaño e intentan restaurar la totalidad de la función original aumentando el tamaño del órgano

residual para aproximarse finalmente a la inicial. El hígado ha recibido atención especial debido a su gran capacidad regenerativa, ya que supera a otros órganos en la velocidad, magnitud y la capacidad de múltiples repeticiones de su respuesta regenerativa.

La pérdida de tejido en un entorno clínico se produce como resultado de una lesión difusa aguda, mediada por productos químicos tóxicos, virus, anormalidades metabólicas o trastornos vasculares agudos. Tales episodios conducen a una pérdida masiva de hepatocitos y comprometen la capacidad del órgano para proporcionar funciones vitales para la homeostasis del cuerpo. Tales episodios están asociados con el desarrollo paralelo de una respuesta tanto inflamatoria como regenerativa. Aunque las respuestas tisulares en el entorno agudo y crónico están probablemente mediadas por los mismos mecanismos de señalización, los resultados netos son a menudo diferentes, con ofensas crónicas que dan lugar a distorsión de la arquitectura del tejido hepático.

La proliferación de los hepatocitos progresa desde las áreas periportales a las áreas pericentrales del lobulillo, en condiciones basales los hepatocitos permanecen en estado “quiescente” o fase G0 (G cero) del ciclo celular, pero, a diferencia de otros tejidos, mantienen la capacidad de reiniciar el ciclo celular ante cualquier lesión, pérdida de tejido hepático o a estímulos exógenos (factores de crecimiento, mitógenos); es un proceso muy rápido que se inicia en segundos y termina en pocos días 5-7 días, dependiendo de la edad, el volumen de restauración hepático, los mecanismos que interviene en la señalización: autocrinos, paracrinos y endocrinos, los genes responsables de la proliferación celular, la morfogénesis y la regulación del metabolismo.¹⁵

La regeneración celular se inicia con el reconocimiento de patrones dependiendo la etiología, lo cual genera una respuesta inmune innata con la activación de las fracciones C3a y C5a del complemento, producción de TNF- α , síntesis de IL-6, IL-1, IL-18 que estimulan la división de los hepatocitos mediante la transición del estado basal G0 a la primera fase G1 del ciclo celular. Se ha descrito un aumento de los factores de transcripción preformados en el citosol como respuesta a la unión de las

citocinas a sus receptores: el transductor de señal y activador de la transcripción STAT3 (activador de la transcripción y transductor de la señal 3), factor nuclear Kappa-b (NF-Kb) y la proteína activadora 1 (AP-1); que estimulan la síntesis de proteínas y la expresión de los genes necesarios para iniciar el ciclo celular.

La proliferación celular se sucede en un orden cronológico y secuencial; primero se dividen los hepatocitos y posteriormente las células de Kupffer y endoteliales, seguido de la neoformación de vasos y de los canalículos biliares, hasta reproducir la estructura hepática.

A diferencia de otros órganos sólidos como la piel o el intestino, la regeneración hepática se debe a la proliferación de los hepatocitos maduros y de las células mesenquimales, y no a la proliferación - diferenciación de las células madre pluripotenciales.^{5, 15}

1.6 Factores de riesgo

Las enfermedades crónicas no transmisibles causan aproximadamente dos terceras partes de las muertes en el mundo. Los principales factores de riesgo que se asocian son: el consumo de tabaco, una dieta inadecuada, sedentarismo y el abuso del alcohol.

Las enfermedades del hígado (EH) son relativamente frecuentes y generalmente asintomáticas, por lo tanto los individuos no son diagnosticados a tiempo, lo cual tiene un gran impacto en la salud pública, ya que el diagnóstico y tratamiento precoz puede evitar que miles de personas desarrollen en silencio una cirrosis o cáncer de hepático. Algunos factores de riesgo para el desarrollo de EH son: género, historia familiar, factores genéticos, factores metabólicos, factores culturales; dentro de este rubro, el consumo excesivo de alcohol es la principal causa del desarrollo de EH, además de otras prácticas actuales entre los jóvenes como la combinación de bebida con otras como son las bebidas energizantes.¹⁶

1.6.1 Consumo de alcohol

El alcohol/etanol es una sustancia de bajo peso molecular (PM = 46) lo cual le confiere la volatilidad, su fórmula química: $\text{CH}_3 - \text{CH}_2 - \text{OH}$. Es el principal componente de las bebidas alcohólicas. Otras características que lo definen es miscible en agua, lo que le permite llegar a cualquier célula del organismo; además su liposolubilidad es suficiente para permitir rebasar las barreras lipídicas que se oponen a su penetración en las estructuras celulares como son las membranas. Es un líquido incoloro y su densidad es de 0.79 gr/cc. Además es un producto energético, cada gramo de etanol genera a través del metabolismo oxidativo 7.2 Kcal.^{17, 18}

Según la OMS, el alcohol es una sustancia psicoactiva con propiedades causantes de dependencia, que ha sido utilizado ampliamente en muchas culturas durante siglos.¹⁹ Además el alcohol es tóxico para el organismo ya que puede generar daños en diferentes tejidos incluso la muerte cuando es ingerido en cantidades excesivas. Estas bebidas se obtienen por los procesos de fermentación o destilación y dependiendo de su procedimiento se conseguirán bebidas de diferente graduación alcohólica. El etanol o alcohol es probablemente la droga más antigua que se conoce.¹⁹

□ Vodka

El vodka o 'wodka', es la bebida alcohólica nacional de Rusia y Polonia, su significado es el de 'agüita', una forma de llamar al agua.²⁰ La elaboración del vodka pasa por varias etapas desde la fermentación hasta la adición de agua, siendo este proceso que detonará su sabor final y la graduación (40°) junto con aromatizantes y saborizantes, actualmente el consumo de esta bebida en los jóvenes se realiza en combinación con bebidas energizantes.²¹

▫ Epidemiología

El consumo de alcohol tiene un impacto socio-económico, lo que es un problema sanitario de primer orden; cada año se producen 3.3 millones de muertes en el

mundo aproximadamente, en México es la cuarta causa de mortalidad (8.4%), el uso nocivo de este es un factor casual en más de 200 enfermedades según la OMS.¹⁹

Los patrones de consumo de alcohol varían según la cultura, el país, el género, el grupo de edad, las normas sociales. El consumo de bebidas alcohólicas entre jóvenes es un tema controversial, pues al mismo tiempo en que hay prohibiciones de venta y oferta de esas sustancias, la obtención y el consumo son prácticas frecuentes e inclusive incentivadas en el hogar y hasta en ambientes públicos. La sociedad se muestra ambivalente ante esa cuestión: por un lado condena el abuso y por otro permite que se estimule el consumo con imágenes divulgadas a través de los medios de comunicación, principalmente la televisión. Por lo que el alcohol es unas de las sustancias psicoactivas que los jóvenes consumen más precozmente. La prevalencia corresponde al grupo de 12-24 años con un mayor índice en hombres que en mujeres.²²

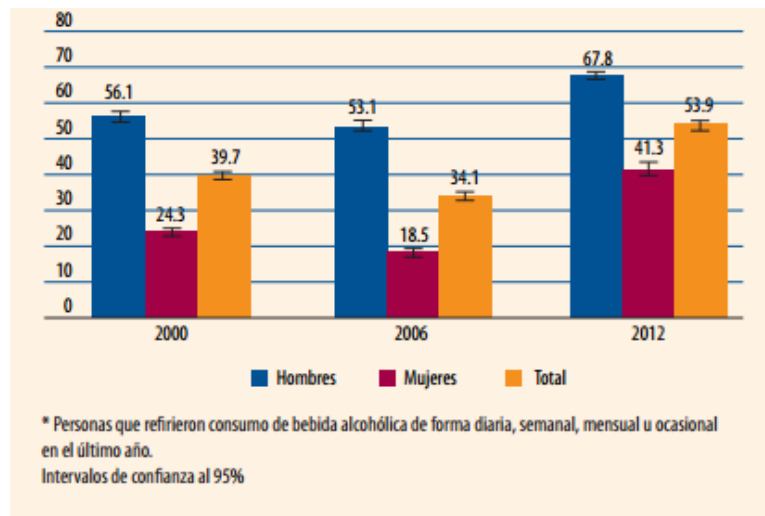


Fig. 7 Consumo actual de alcohol.* Población de 20 años o más. México, ENSA 2000, ENSANUT 2006 y 2012 (Tomado de Encuesta Nacional de Salud 2012)

México mantiene restricciones para la venta y el consumo de alcohol en personas menores de 18 años de edad; sin embargo, de acuerdo a la Encuesta Nacional de Adicciones (ENA), del 2008 a 2011 creció el número de bebedores; esta práctica tiene un inicio temprano, poco más de la mitad (55%) de la población que ha consumido alcohol, inició antes de los 17 años.¹⁸

□ Metabolismo del etanol

Después de ser ingerido el etanol pasa al sistema digestivo, 30% de él es absorbido por el estómago y el resto por el duodeno y yeyuno; pasa rápido al torrente sanguíneo y se distribuye en el agua corporal total (0.5 a 0.7 L/kg) 30 minutos después de ingerido, si el estómago está vacío, se alcanzan las concentraciones máximas en la sangre.²³ Una vez en el torrente sanguíneo a través de las venas que forman la vena porta, el etanol llega al hígado, en este se metaboliza aproximadamente de un 80 a un 90%. En promedio, un individuo adulto puede metabolizar entre 7 y 10 g de alcohol por hora. Sin embargo, esta tasa varía entre individuos y es influenciada por los polimorfismos de la enzima alcohol deshidrogenasa (ADH) y la actividad del sistema de oxidación microsómica del etanol (CYP450 2E1).²⁴ En el hepatocito existen tres vías metabólicas que oxidan al etanol a acetaldehído:

A) *VÍA DE LA ALCOHOL DESHIDROGENASA*

Es la principal vía, involucra la enzima alcohol deshidrogenasa (ADH), una familia de las enzimas citosólicas que catalizan la conversión de alcohol en acetaldehído (Fig. 8). Estas enzimas se localizan principalmente en el hígado, pero están presentes en pequeñas cantidades en otros órganos, como el cerebro y estómago. Existen variaciones genéticas considerables de las enzimas ADH, se han identificado 5 clases de isoenzimas de ADH hepáticas (I a V) con distinta afinidad por el etanol y codificadas en 7 locus genéticos diferentes, lo que repercute en la velocidad con que se metaboliza el etanol.

En el proceso de conversión de etanol en acetaldehído por acción de la ADH, el ion hidrógeno se transfiere del alcohol al cofactor dinucleótido de nicotinamida y adenina (NAD⁺) para formar NADH. Como resultado neto, la oxidación de alcohol genera un exceso de equivalentes reductores en el hígado, principalmente en forma de NADH. La producción excesiva de NADH parece contribuir a los trastornos metabólicos que acompañan al alcoholismo crónico.

B) SISTEMA DE OXIDACIÓN MICROSÓMICA DEL ETANOL (MEOS)

Este sistema enzimático está localizado en el retículo endoplásmico del hepatocito y es el mecanismo principal de adaptación en el alcoholismo crónico cuando se encuentra saturada la capacidad de la ADH. Utiliza NADPH como cofactor en el metabolismo del etanol y está constituido principalmente por la forma 2E1 del citocromo P-450 (Fig. 8). Produce un exceso de radicales libres (anión superóxido O_2^- , peróxido de hidrógeno H_2O_2 , radical hidróxilo OH^-) y subsiguiente estrés oxidativo con daño hepatocitario.²⁵

c) VÍA DE LA CATALASA

Se localiza en los peroxisomas y mitocondrias de los hepatocitos y su papel en el metabolismo del etanol es mínimo, limitado por la cantidad de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) que genera esta reacción (Fig. 8).²⁶ Sin embargo, en el alcoholismo crónico parece tener un papel más destacado, principalmente en órganos extrahepáticos como el sistema nervioso.

El acetaldehído (ACH) producido por las tres vías metabólicas antes mencionadas es metabolizado a acetato por la enzima acetaldehído deshidrogenasa (ALDH) que se encuentra en la mitocondria del hepatocito, esta enzima necesita del NAD^+ como cofactor para oxidar al acetaldehído por lo que se incrementa NADH en la mitocondria. El producto de esa reacción que es el acetato, se puede degradar hasta CO_2 y agua, o usarse para formar acetil-CoA.^{25, 27}

La velocidad de eliminación del etanol es de 100 mg/kg/h, las vías de eliminación son: pulmonar (50-60%), entero hepática (25-30%), orina (5-7%), sudor, lágrimas, jugo gástrico, saliva y leche materna.²⁴

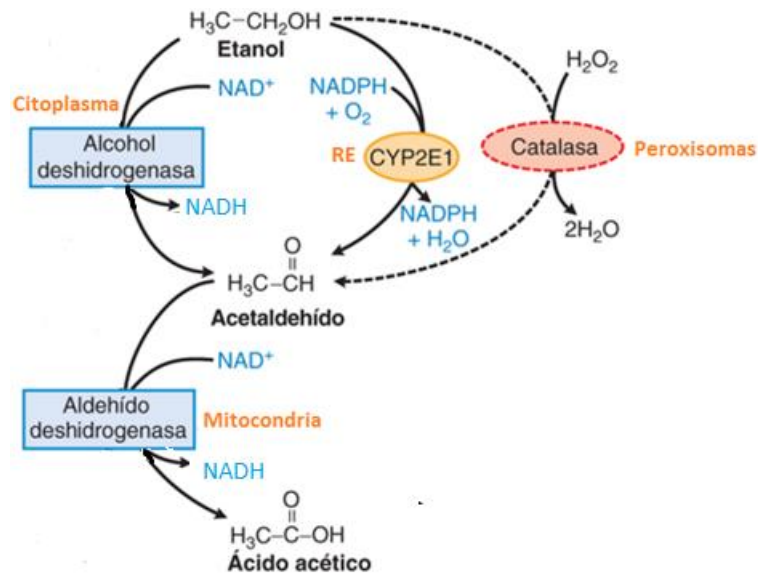


Fig. 8 Metabolismo del etanol por las tres vías (Modificado Schuckit MA. 2016)

□ Intoxicación por el etanol

La intoxicación es un síndrome clínico producido por el consumo de bebidas alcohólicas de forma brusca y en cantidad superior a la tolerancia individual de la persona. De acuerdo con el tiempo de consumo las intoxicaciones pueden ser: *agudas*, si la exposición es de corta duración con absorción rápida debido a dosis únicas o múltiples en un periodo breve. El trastorno se manifiesta con rapidez, y la muerte o curación tienen lugar a corto plazo; y *crónicas*, que son por exposición repetida al tóxico durante un tiempo prolongado y que resulta en procesos agudos dentro de la intoxicación o cuadros crónicos por dosis única del tóxico.²⁷

□ Diagnóstico clínico

Algunos estudios tienen alta sensibilidad, pero la mayoría son poco específicos para detectar una hepatopatía además pueden alterarse en otros procesos. Entre estas pruebas se encuentra:

- ✓ Concentración de ASAT y ALAT,
- ✓ Niveles de gamma-glutamil transferasa
- ✓ Proteínas totales, albumina
- ✓ Prolongación del tiempo de protrombina

También existen otras herramientas para el diagnóstico con las pruebas de imagenología, exploración física, además existen otro tipo de estudios que son invasivos como la biopsia hepática. Sin embargo todos estos biomarcadores se encuentran alterados o con un cambio significativo cuando existe una etapa de progresión de daño tardía.^{13, 26}

1.6.2 Consumo de bebidas energizantes

Desde hace algunos años el mercado ha sido inundado por las bebidas denominadas “energizantes”, estas bebidas surgieron en Escocia y en Japón, y fueron creadas para incrementar la resistencia física, tener una mayor concentración, aumentar el estado de alerta mental, evitar el sueño, proporcionar sensación de bienestar, estimular el metabolismo, por lo que el mercado de estas bebidas está orientado a la gente joven, estudiantes y deportistas básicamente.^{28,29}

Las bebidas energizantes (BE) son bebidas sin alcohol generalmente gasificadas compuestas por: cafeína, carbohidratos (sacarosa, glucosa, glucorolactona, fructosa), taurina, guaraná, inositol, vitaminas (grupo B) y otros ingredientes como aditivos, conservantes, saborizantes y colorantes.³⁰

Sin embargo, en los últimos años estas bebidas son utilizadas como un acompañante de bebidas alcohólicas, dejando atrás los efectos fisiopatológicos que puede ocasionar esta combinación.²⁸

□ Epidemiología

El uso de BE se ha popularizado y ha alcanzado altos niveles de ventas, actualmente el consumo de estas bebidas inicia desde los 12 años, el 07 de octubre de 2016 en México se emitió un comunicado por parte de la Procuraduría Federal del Consumidor (PROFECO) y la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS) para evitar el consumo de bebidas alcohólicas con bebidas energizantes, ya que anteriormente no existía alguna norma que regulara este consumo.²⁴ No obstante la venta de estas bebidas está autorizada por la Secretaría de Salud como suplementos alimenticios por lo que la COFEPRIS busca introducir

cambios en la Norma Oficial Mexicana 218 para obligar a las empresas fabricantes a clarificar las leyendas en sus etiquetas y advertir a los consumidores de los peligros que implica beberlas junto con alcohol, además del consumo precoz en menores de edad.^{23,24}

□ Metabolismo de los componentes de las BE

El hígado metaboliza los ingredientes que contienen este tipo de bebidas, los cuales son absorbidos y llegan por la vena portal.

A) Metabolismo de los carbohidratos

Los principales carbohidratos que provienen de las BE son glucosa, fructosa, la conducción de la glucosa y otras hexosas la efectúan transportadores específicos que se localizan en la membrana del hepatocito, en particular el receptor GLUT-2, este se sitúa en la membrana sinusoidal y tiene la característica de ser insensible a la acción de la insulina. Una vez en el interior del hepatocito, la glucosa sigue dos caminos: la glucólisis o la síntesis de glucógeno.³¹

B) Metabolismo de la cafeína

La cafeína se absorbe en el intestino delgado, tiene una biodisponibilidad del 100%, alcanza la concentración plasmática máxima en 30-60 minutos, se metaboliza en el hígado por el sistema enzimático del citocromo P-450 principalmente por la isoenzima CYP1A2, por lo que el metabolismo de este componente varía entre cada individuo debido a la capacidad de dicha isoenzima.

La cafeína por desmetilación se transforma en paraxantina (84%), teobromina (12%) y teofilina (4%). Posteriormente se metaboliza también por la CYP1A2 en monoxantinas, que serán sustrato de la xantina-oxidasa.³⁵

La enzima xantina-oxidasa se encuentra exclusivamente en el hígado y la mucosa del intestino delgado, esta enzima al oxidar a las monoxantinas dará la formación de ácido úrico, cuando la BE se consume en exceso habrá una acumulación de producto, lo cual puede causar problemas al organismo como la enfermedad de gota. Su eliminación es vía renal.³⁵

□ Metabolismo de la taurina

La cisteína se metaboliza de manera irreversible para producir ya sea taurina, sulfato inorgánico, o glutatión (GSH). Por lo tanto, la utilización de cisteína para la generación de GSH y para la generación de la taurina son competitivos. Lo cual puede ser regulado por la necesidad de GSH en los sistemas biológicos en dependencia de la necesidad celular.

La concentración de la taurina en un tejido específico está determinada no sólo por su capacidad de síntesis, sino además por la captación de la taurina que realizan los tejidos desde el plasma sanguíneo, mediante fenómenos de transporte. Se sabe que la taurina comparte junto a la β -alanina, la glicina y la hipotaurina, el mismo carrier o transportador ya que éstos compuestos tienen semejanza estructural con este aminoácido. En hepatocitos, el transporte de este aminoácido se asocia a un sistema de consumo de oxígeno que requiere energía. Sin embargo, la biosíntesis de taurina en el hígado es limitada, particularmente en el caso de una enfermedad hepática, donde la capacidad biosintética podría reducirse. Por lo tanto, la absorción exógena a través de la dieta (incluyendo BE), es en gran parte responsable del mantenimiento de la alta concentración intracelular de taurina que explica sus múltiples funciones fisiológicas y farmacológicas, incluyendo la estabilización de la membrana plasmática celular, osmoregulación, neuromodulación, neurotransmisión, la antioxidación, la destoxificación de ácidos biliares en el hígado.

Adicionalmente, es importante remarcar que las principales sales biliares en los mamíferos, es decir las formas ionizadas de ácidos biliares, se sintetizan a partir del colesterol en el hígado y luego conjugarse (N-acil amidados) con glicina o taurina. La composición de sales biliares biliar en el ser humano difiere significativamente de la de la rata. En los seres humanos, la mayoría de las sales biliares se conjugan con glicina, mientras que, en las ratas, la mayoría de las sales biliares se conjugan con taurina. La bilis humana, pero no la bilis de rata, contiene amidación sulfatada y no sulfatada de litocolato, por esta razón es importante resaltar que un sobre consumo de taurina en las bebidas energizantes puede promover una mayor formación de sales biliares que alteren el funcionamiento celular.^{36, 37}

1.7 Enfermedades hepáticas

En la clínica las enfermedades hepáticas por lo general se presentan agrupadas en patrones que suelen clasificarse como: hepatocelulares, colestásicos (obstructivos) o mixtos. En las enfermedades *hepatocelulares* (como las hepatitis virales o la hepatopatía alcohólica) predominan lesión, inflamación y necrosis hepática. En las enfermedades *colestásicas* (como colelitiasis, obstrucción maligna, cirrosis biliar primaria o muchas enfermedades hepáticas inducidas por fármacos) predominan las características de inhibición del flujo biliar. En la forma *mixta* se observan signos de lesiones hepatocelular y colestásica (como en las formas colestásicas de la hepatitis viral y en muchos trastornos del hígado inducidos por fármacos).

La valoración de los pacientes con hepatopatía debe dirigirse a:

- a) Establecer el diagnóstico etiológico: El diagnóstico debe centrarse en el tipo de enfermedad (p.ej. hepatocelular, colestásica o mixta)
- b) Determinar la gravedad de la enfermedad (grado): El grado se refiere a la valoración de la gravedad o actividad de la enfermedad: activa o inactiva y leve, moderada o grave.
- c) Establecer el estadio de la enfermedad (estadificación). En la estadificación se estima el curso de la evolución natural de la enfermedad, si es aguda o crónica, precoz o tardía, precirrótica, cirrótica o terminal.³³

Por otro lado la *enfermedad hepática aguda* aparece de forma abrupta en un corto período de tiempo debido a la ingestión de sustancias tóxicas (fármacos o toxinas), infecciones (hepatitis vírica) o a la perfusión sanguínea inadecuada (hepatitis isquémica). Sin embargo cuando se mantiene la lesión de modo continuo en los hepatocitos durante un período superior a 6 meses, se produce una *enfermedad hepática crónica*, la cual se caracteriza por la inflamación y la necrosis hepática acompañada de diversos grados de fibrosis. Las causas pueden ser variadas, como una ingestión excesiva de drogas o etanol, hepatitis vírica activa, hemocromatosis, enfermedad de Wilson o enfermedades autoinmunes, como la cirrosis biliar primaria. La lesión hepática crónica puede estar descompensada o estar compensada y cursar

de forma asintomática. El hepatocarcinoma es una de las complicaciones de la enfermedad crónica.³⁴

1.7.1 Fibrosis

Las enfermedades hepáticas que cursan con un proceso inflamatorio durante cierto tiempo, producen una acumulación progresiva de fibras de colágeno en el parénquima hepático llamada *fibrosis*. La fibrosis hepática ocurre frecuentemente cuando se produce una lesión crónica. Se inicia con la activación de las células de Kupffer, que producen citocinas, como el factor de crecimiento transformante β (TGF- β), el factor de necrosis tumoral α (TNF- α), el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), IL-10 y radicales libres que, a su vez, provocan la activación y transformación de las células de Ito o células estelares en miofibroblastos proliferativos. Estas células producen proteínas, como colágeno I y colágeno III, elastina o fibronectina que se depositan en la matriz extracelular.³⁸ La distribución de este material fibroso en el lobulillo hepático depende del tipo de hepatopatía, por ejemplo, en la hepatopatía alcohólica, la fibrosis se localiza inicialmente en la zona perisinusoidal y pericentral conduciendo al desarrollo de conexiones fibrosas entre las estructuras vasculares, seguidas de la pérdida tanto de la naturaleza fenestrada del endotelio sinusoidal como de las microvellosidades de los hepatocitos, incidiendo a su vez no solo en la acumulación de matriz extracelular (tejido conjuntivo no funcional), sino también en la interrupción de la vascularización normal del lóbulo hepático, lo que contribuye al deterioro de la función del órgano.³⁹ En fases avanzadas, las bandas de colágeno son muy evidentes y unen varios espacios porta, que se denominan *puentes de fibrosis*. Esta condición precede a la formación de nódulos de regeneración y, por tanto, al desarrollo de cirrosis. Cuando existe una necrosis, el hígado tiene una gran capacidad de regeneración hepatocítica que sustituye en poco tiempo el tejido necrótico y reestablece la arquitectura hepática normal. Durante este proceso reparativo hay una reacción inflamatoria junto a un depósito de matriz extracelular constituido por colágeno no fibrilar, que servirá de tejido de sostén para los hepatocitos regenerados y que contribuye a recomponer el lobulillo hepático dañado. Sin embargo, si la necrosis hepática se mantiene, este

proceso reparativo se perpetúa, con el tiempo la capacidad de regeneración hepática disminuye, mientras que aumenta considerablemente la producción de matriz extracelular, que se deposita de manera desorganizada en el lobulillo hepático.

Al mismo tiempo, se altera el proceso de descomposición o degradación del colágeno, en un tejido sano existe equilibrio entre la síntesis (fibrogénesis) y la degradación (fibrólisis) del tejido matricial; la fibrosis aparece cuando se altera ese equilibrio, es decir, cuando el tejido se acumula a un ritmo más rápido del que puede ser degradado y eliminado por el hígado. ^{38,39}

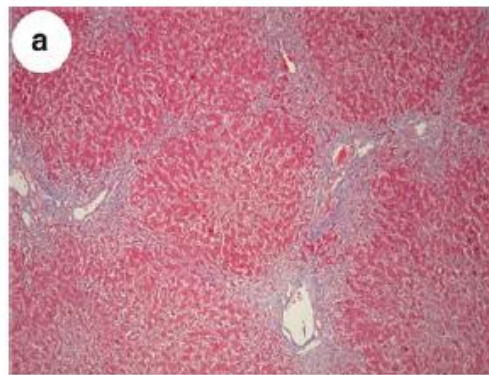


Fig. 9 Fibrosis (Tricrómica de Masson) (Modificado de Monga 2011)

1.7.2 Cirrosis

Se puede definir la cirrosis hepática como un “síndrome anatomoclínico” que corresponde a la fase terminal de muchas enfermedades hepáticas de etiología diversa que tienen una historia natural progresiva. Es una alteración histopatológica difusa del hígado caracterizada por pérdida del parénquima hepático, formación de septos fibrosos y nódulos de regeneración estructuralmente anormales, dando lugar a una distorsión de la arquitectura hepática normal y a una alteración de la anatomía de la vascularización hepática y de la microcirculación. Deriva de la palabra griega σκίρροϋς en latín (scirro) que se traduce tanto por “amarillo grisáceo” como por “duro” y se refiere a la coloración y consistencia que adquiere el hígado en este proceso.

Los siguientes mecanismos fisiopatológicos son importantes en el desarrollo de cirrosis hepática de cualquier etiología:

- a) Necrosis o lisis de hepatocitos con pérdida del parénquima hepático e inflamación.
- b) Fibrogénesis (depósito de matriz extracelular).
- c) Cambios en el crecimiento celular (hiperplasia, regeneración).
- d) Alteraciones vasculares y circulatorias.

La necrosis y lisis de hepatocitos e inflamación crónica y continua constituyen un estímulo y factor perpetuador de proliferación y crecimiento de los hepatocitos y del proceso de fibrogénesis. En la cirrosis de igual forma se producen citocinas profibrogénicas tales como factor transformante del crecimiento $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) que inician y perpetúan la activación de las células estelares hepáticas transformadas en el fenotipo de miofibroblastos. Los miofibroblastos se contraen, proliferan y producen colágeno y otros componentes de la matriz extracelular. La destrucción del parénquima combinada con la regeneración e hiperplasia de células parenquimatosas, la estrangulación fibrótica del tejido hepático y las alteraciones vasculares contribuyen a la transformación nodular del hígado.⁴⁰ Debe señalarse que la arquitectura del hígado puede variar y que dentro del mismo hígado se pueden observar grados variables de regeneración. Los nódulos parenquimatosos creados por las bandas de fibrosis que entrecruzan el parénquima pueden variar en tamaño y constituirse en micronódulos (menos de 3 mm de diámetro) o macronódulos (3 mm a varios centímetros de diámetro). La cirrosis hepática predispone al desarrollo de hepatocarcinoma. Por otro lado, las complicaciones de la cirrosis son las mismas independientemente de la causa, por lo que se pueden clasificar la cirrosis en compensada y descompensada según las características que presente los pacientes.⁴¹

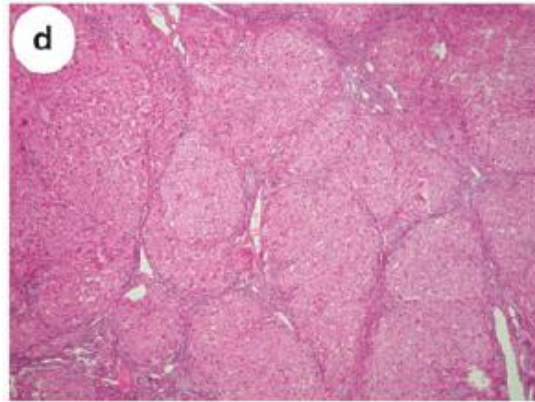


Fig 10. Cirrosis (Tricrómica de Masson 10X) (Modificado de Monga 2011)

1.7.3 Cáncer

El hepatocarcinoma (HC) (originado de los hepatocitos) constituye el tumor hepático primario más común. Los pacientes con cirrosis, sin importar la causa son los que tienen mayor riesgo de desarrollar este padecimiento. El HC se caracteriza por vías angiogénicas activadas, proliferación de células endoteliales, aumento de la densidad de la microvasculatura y un aporte sanguíneo casi exclusivo por parte de ramas derivadas de la arteria hepática. Esta arterialización evoluciona gradualmente desde los nódulos displásicos hasta el HC y produce el patrón hipervascularizado típico del HC. La angiogénesis tumoral en el HC no es autolimitada en el tiempo y conlleva a formación de vasos anormales caracterizados por lumen amplio, dilataciones aneurismáticas, flujo sanguíneo irregular, regiones de estasis, alta permeabilidad, filtraciones o sangrados.⁴²

Macroscópicamente el HC se presenta como una masa grande con nódulos satélites o como múltiples nódulos diseminados en todo el hígado. Microscópicamente las células semejan o difieren de los hepatocitos de acuerdo a su diferenciación. Los núcleos pueden ser de homogéneos a grandes y pleomórficos y el citoplasma puede contener inclusiones de grasas, bilis, glóbulos hialinos que contienen globulinas o fetoproteínas. Las células neoplásicas se disponen en cordones, hojas, mantos, estructuras nodulares o nidos, con patrones compactos, pseudoglandulares, macrotrabeculares (Fig. 11).⁴³

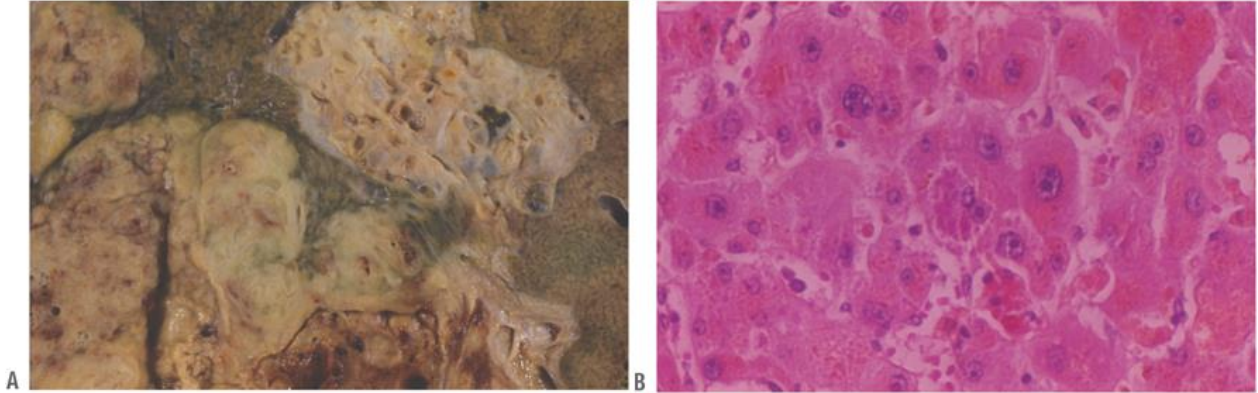


Fig. 11 A) Aspecto macroscópico de un hepatocarcinoma; nódulos irregulares, lobulados, mal limitados con áreas de necrosis y otras blanquecinas, “carnosas”, sólidas. B) Aspecto microscópico de hepatocarcinoma; las células neoplásicas son semejantes a los hepatocitos, grandes, con leve variación en la forma y tamaño de los núcleos. (Modificado de Valencia y cols. 2015)

El desarrollo de un HC avanzado incluye una serie de intrincadas alteraciones que son producidas por sucesos epigenéticos (cambios potencialmente heredables que no se encuentran codificados en el ADN, como la adición de grupos metilo a las citocinas).⁴⁴

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El consumo indiscriminado de la combinación de alcohol y otras sustancias como son las bebidas energizantes dentro de la población adulta joven representa un riesgo para la salud, ya que su consumo excesivo puede generar daños hepáticos irreversibles como fibrosis, cirrosis y cáncer. Durante la progresión del daño hepático que es producido por este tipo de consumos, existen cambios fisiopatológicos que alteran ciertas proteínas que son sintetizadas en este tipo de órgano.

La detección de cambios progresivos asociados al daño celular hepático crónico, se encuentra limitado por los laboratorios clínicos, debido a que los biomarcadores clásicos usados para dicho efecto son poco específicos de tejido, caso concretos transaminasas y algunas otras enzimas. Otras moléculas que se asocian con daño hepático como las bilirrubinas, se hallan en dependencia del catabolismo de la hemoglobina y el daño observado por cierre de canalículos biliares. Siendo estos poco específicos en estados tempranos de la alteración y presentando un grado de sensibilidad mayor cuando se asocian etapas tardías. Otras metodologías como son electroforesis de proteínas séricas presentan mayor sensibilidad, pero poca especificidad asociada al diagnóstico preciso, además de ser limitadas como pruebas de gabinete en la mayoría de los laboratorios. Es por ello que se ha planteado la siguiente pregunta científica:

3. PREGUNTA DE INVESTIGACION

¿La cuantificación de alfafetoproteína podrá servir como un biomarcador del grado daño-lesión en un modelo de consumo crónico de alcohol, bebida energizante y su combinación?

4. JUSTIFICACIÓN

Actualmente el consumo de alcohol en combinación con otras sustancias como las bebidas energizantes se ha visto incrementado en la población adulta joven, los consumidores hablan de una reducción en los efectos del alcohol que produce esta combinación, sin embargo, no se consideran los efectos adversos que puede provocar esta práctica. Debido a la poca eficacia diagnóstica de los paneles de daño hepático, es imprescindible que existan nuevos biomarcadores que puedan establecer el ambiente anatomofuncional con precisión.

La proteína alfa-fetoproteína, que tradicionalmente se ha considerado como un marcador tumoral, también es una proteína de respuesta de fase aguda, que muestra de manera interesante cualidades de expresión en estado de renovación acelerada en los hepatocitos, lo que le confiere una relevancia en el diagnóstico de enfermedades crónicas que sufre este tejido en sus etapas tempranas.

Es por ello que la finalidad de este proyecto es valorar a esta proteína en un modelo animal que permita hacer el seguimiento de progresión del daño, en relación a ello se sabe que el consumo de alcohol es un buen modelo de estudio de inflamación hepática crónica, adicionalmente a ello, la asociación con bebidas energizantes permitirá discriminar el tipo de lesión probablemente generada en población que consume en combinación o por separado a las bebidas.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Valorar el comportamiento de alfafetoproteína en hígado asociado al consumo crónico de alcohol, bebida energizante y su combinación en un modelo de ratas Wistar, como modelo de estudio de daño-lesión hepática.

5.2 Objetivos particulares

En animales con consumo crónico de alcohol, red bull y su combinación:

- Valorar el panel enzimático y proteico asociado al grado de lesión hepática.
- Evaluar las concentraciones de alfafetoproteína sérica y tisular (hepática).
- Determinar el grado de lesión/regeneración tisular asociado al consumo de las bebidas.

6. HIPÓTESIS

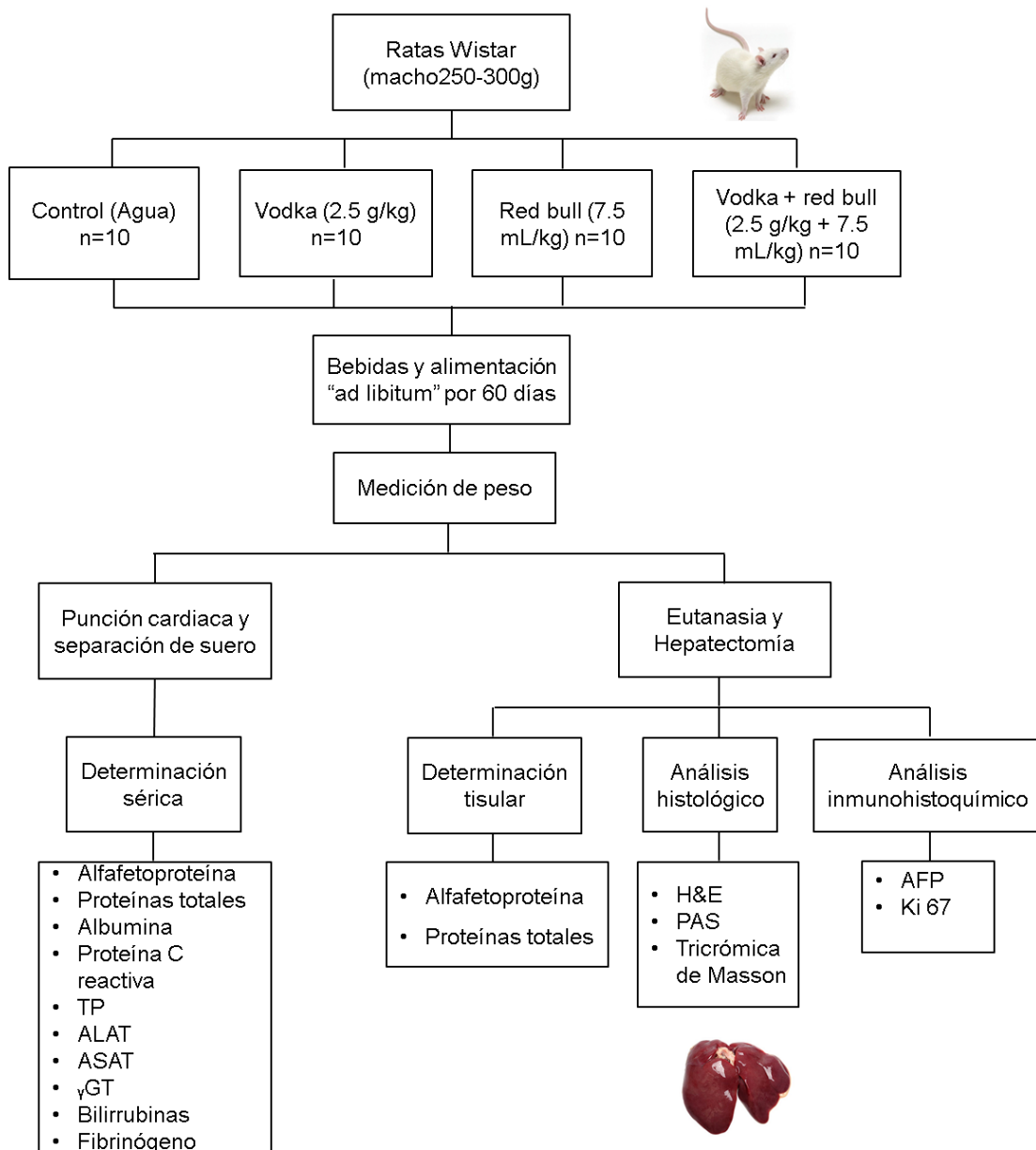
6.1 Hipótesis nula

No existen cambios en alfafetoproteína durante el consumo crónico de alcohol, red bull y su combinación, por tanto no puede ser utilizado como un biomarcador de daño hepático.

6.2 Hipótesis alternativa

Existen cambios en alfafetoproteína como un marcador sérico e histológico durante el consumo crónico de alcohol, red bull y su combinación, por lo que puede ser utilizado como un biomarcador de daño hepático.

7. DIAGRAMA DE TRABAJO



8. METODOLOGÍA

8.1 Material y métodos

8.1.1 Animales de experimentación

Se utilizaron 40 ratas Wistar macho adultas con un peso de 250-300g del Bioterio Claude Bernard de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Las cuales se alojaron en una jaula de policarbonato, en una habitación con las instalaciones de clima controlado ($22 \pm 20^{\circ}\text{C}$) y luz regulada, con 12:12h ciclos día-noche, con acceso libre a comida y agua. Todos los procedimientos están descritos en la norma NOM-062-ZOO-1999.

8.1.2 Grupos experimentales

El estudio se conformó por cuatro grupos: control [C] (agua potable), alcohol [A] (2.5 g/Kg), bebida energizante [BE] (7.5 mL/kg) y la combinación de alcohol y bebida energizante [A+BE] (2.5 g/kg + 7.5 mL/kg) (Díaz y cols.). Todo fue administrado por vía oral durante 60 días. Su alimentación fue con alimento 5001 de la marca comercial Labdiet Rodent.

8.1.3 Obtención de la muestra sanguínea.

Se suspendió el consumo de alimento y bebidas 4 a 5 horas antes de realizar el procedimiento. Tras anestesiarse a las ratas (ketamina + xilazina 0.2 ml/100 g, vía intraperitoneal) se procedió a tomar muestra por punción intracardiaca y se extrajo 700 μL de sangre (aproximadamente). La muestra se recolectó en un tubo eppendorf, se centrifugó a 8000 r.p.m. durante 10 minutos para la obtención del suero. Además se recolectó plasma en un tubo azul (citrato de sodio) y se centrifugó a 1500 g por 15 minutos.

8.1.4 Obtención y preparación de tejido hepático

Una vez extraída la muestra sanguínea se llevó a cabo la perfusión intracardiaca, para ello, se hizo pasar solución salina isotónica a través de la arteria que lleva

sangre del corazón al hígado para eliminar el exceso de sangre. Posteriormente se realizó la hepatectomía con una incisión a lo largo de la parte media del abdomen, posteriormente se identificó el hígado (órgano de color rojo purpúreo con forma de un cuadrilátero irregular aplanado) el cual se encuentra en el lado derecho fijado a la cara inferior del diafragma y a la pared ventral del abdomen.

Para la determinación tisular se realizó un homogenado con 50 mg de tejido en 300 µl de PBS, el cual se centrifugó a 12000 r.p.m. por 10 minutos. (Anexo 11)

8.1.5 Determinaciones séricas

Se midieron parámetros bioquímicos séricos de: alfafetoproteína, proteínas totales, albúmina, bilirrubinas, ALAT, ASAT, γ GT, proteína C reactiva, TP, fibrinógeno después de la obtención del suero y plasma.

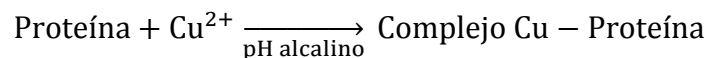
□ Alfafetoproteína

La cuantificación de alfafetoproteína se realizó por inmunoensayo enzimático (ELISA) mediante una fase sólida de inmunoadsorción unido a enzima, basado en el principio del sándwich. El sistema utiliza un anticuerpo anti-AFP para la inmovilización en fase sólida (pocillos de microtitulación) y otro anticuerpo anti-AFP monoclonal de ratón en la solución conjugada anticuerpo-enzima (peroxidasa de rábano). La muestra problema (suero) se añade a los pocillos de microtitulación revestidos con anticuerpo AFP y se incuba con el buffer. Si la AFP humana está presente en la muestra, se combinará con el anticuerpo en el pocillo. El pocillo se lava a continuación para eliminar cualquier espécimen residual, y se añade anticuerpo AFP marcado con peroxidasa de rábano (conjugado). El conjugado se unirá inmunológicamente a la AFP en el pocillo, dando como resultado que las moléculas de AFP se encuentren entre la fase sólida y los anticuerpos unidos a la enzima. Después de una incubación a temperatura ambiente, los pocillos se lavan para eliminar los anticuerpos marcados no fijados. Se añade una solución de TMB y se incuba durante 20 minutos, dando un color azul como resultados de la reacción enzimática que se llevó a cabo. Se para la reacción mediante la adición de HCl 2N, y el color se cambia a amarillo y se mide

espectrofotométricamente a 450 nm. La concentración de AFP es directamente proporcional a la intensidad de color de la muestra de ensayo. (Anexo 1)

□ Proteínas totales

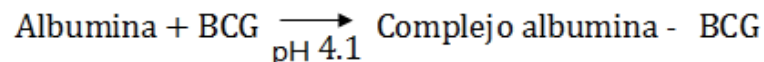
Los enlaces peptídicos de las proteínas en un medio alcalino reaccionan con el ion cúprico, lo cual forma un complejo color violeta azulado; además contiene yoduro como antioxidante. Según la reacción siguiente:



La intensidad del color formado es proporcional a la concentración de proteínas totales en la muestra. (Anexo 2)

□ Albúmina

La albúmina se combina con el verde de bromocresol a pH ligeramente ácido, produciéndose un cambio de color del indicador, de amarillo verdoso a verde azulado proporcional a la concentración de albúmina presente en la muestra. (Anexo 3)



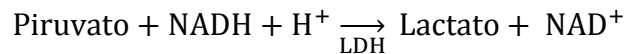
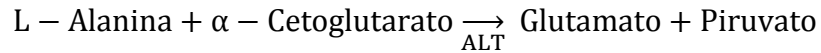
□ Bilirrubinas

La bilirrubina se convierte en azobilirrubina mediante el ácido sulfanílico diazotado midiéndose fotométricamente. De las dos fracciones presentes en suero, bilirrubin-glucurónido y bilirrubina libre ligada a la albúmina, sólo la primera reacciona en medio acuoso (bilirrubina directa) precisando la segunda la solubilización con cafeína para que reaccione (bilirrubina indirecta). En la determinación de la bilirrubina indirecta se determina también la directa, correspondiendo el resultado a la bilirrubina total.

La intensidad del color formado es proporcional a la concentración de bilirrubina presente en la muestra ensayada. (Anexo 4)

□ ALAT

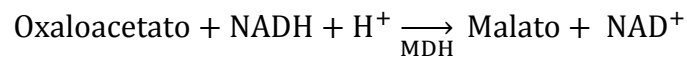
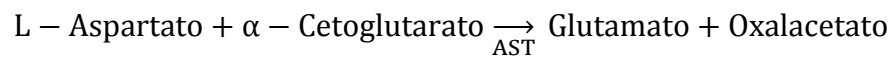
La alanina aminotransferasa (ALAT) cataliza la transferencia reversible de un grupo amino de la alanina al α -cetoglutarato con formación de glutamato y piruvato. El piruvato producido es reducido a lactato en presencia de lactato deshidrogenasa (LDH) y NADH, siguiendo la reacción:



La velocidad de disminución de la concentración de NADH en el medio, determinado fotométricamente, es proporcional a la concentración catalítica de ALT en la muestra ensayada. (Anexo 5)

□ ASAT

La aspartato aminotransferasa (ASAT) cataliza la transferencia reversible de un grupo amino del aspartato al α -cetoglutarato con formación de glutamato y oxalacetato. El oxalacetato producido es reducido a malato en presencia de malato deshidrogenasa (MDH) y NADH; según la reacción:



La velocidad de disminución de la concentración de NADH en el medio, determinada fotométricamente, es proporcional a la concentración catalítica de ASAT en la muestra. (Anexo 6)

□ γ GT

La γ -glutamil transferasa (γ -GT) cataliza la transferencia de un grupo γ - glutamilo de la γ -glutamil-p-nitroanillida al dipéptido aceptor glicilglicina, según la siguiente reacción:

L – γ – Glutamil – 3 – carboxi – 4nitroanilida + Glicina

$\xrightarrow{\gamma\text{-GT}}$ L – γ – Glutamil – glicilglicina + Ácido 5 – amino – 2 – nitrobenzoico

La velocidad de formación del ácido 5-amino-2-nitrobenzoico determinado fotométricamente, es proporcional a la concentración catalítica de γ -GT en la muestra. (Anexo 7)

□ Proteína C reactiva

La prueba usa el método de inmunodetección en sándwich, de tal manera que el anticuerpo detector en el buffer se une al CRP en la muestra y los complejos antígeno-anticuerpo son capturados por otro anticuerpo CRP que han sido inmovilizados en la tira de prueba mientras la mezcla migra a través de la matriz de nitrocelulosa. La intensidad de la señal de fluorescencia del anticuerpo detector refleja la cantidad de antígeno capturado y esto es procesado por el lector ichroma™ que muestra la concentración de CRP en el espécimen. (Anexo 8)

□ TP

EL ensayo mide el tiempo transcurrido hasta la formación del coágulo después de la mezcla del plasma citratado con Tromboplastina (TP), el cual es un extracto de tejido rico en Factor Tisular, fosfolípidos, calcio y conservantes. La coagulación se inicia por activación del FVII con el Factor Tisular. La medida del tiempo de protrombina (TP) sirve como test rápido y sensible para determinar trastornos del sistema extrínseco de la coagulación (factores II, V, VII y X), además del control de la actividad hepática de síntesis en las enfermedades del hígado. (Anexo 9)

□ Fibrinógeno

El fibrinógeno (factor I) es una proteína sintetizada en el hígado, sirve para formar el coágulo, en presencia de un exceso de trombina, se transforma en fibrina. El tiempo de formación del coágulo es inversamente proporcional a la concentración de fibrinógeno presente en la muestra de plasma. La determinación de fibrinógeno por el tiempo de coagulación de trombina está basada en el método descrito por Clauss. En

presencia de altas concentraciones de trombina, el tiempo necesario para la formación del coágulo en el plasma diluido es inversamente proporcional a la concentración de fibrinógeno. (Anexo 10)

Las determinaciones bioquímicas se cuantificaron en un analizador automatizado de química clínica (AUTOKEM II), los reactivos que se utilizaron fueron de la marca SPINREACT, la determinación de alfafetoproteína se realizó en un fotómetro para pruebas de ELISA (STAT FAX 303) y fue del reactivo Diagnostic Automation / Cortez Diagnostics, Inc. Para la determinación de PCR se realizó en el lector i-CHROMA y los reactivos fueron de la misma casa comercial, además para la determinación de TP y fibrinógeno se ocupó el equipo Coatron M1, el reactivo utilizado para estas determinaciones fue de SPINREACT.

8.1.6 Determinaciones tisulares

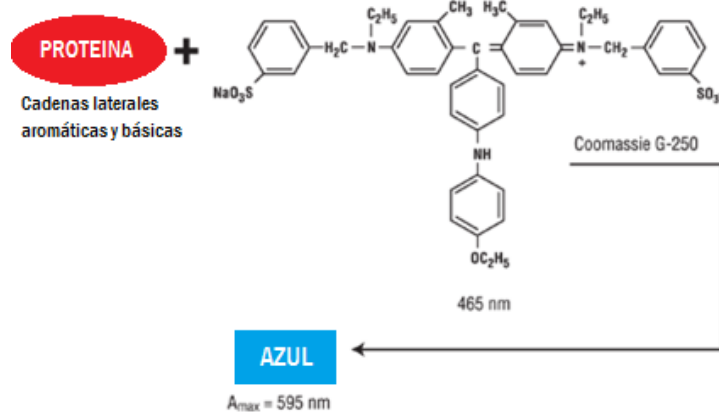
A partir del homogenado (Anexo 11) se realizó la cuantificación de alfafetoproteína y proteínas totales.

Alfafetoproteína

La cuantificación de alfafetoproteína se realizó por inmunoensayo enzimático (ELISA) mediante una fase sólida de inmunoadsorción unido a enzima, basado en el principio del sándwich, siguiendo el mismo procedimiento antes descrito. (Anexo 1)

Proteínas totales tisulares

Para la determinación de proteínas totales en el homogenado del tejido hepático se utilizó el método de Bradford, el cual se basa en la unión específica del colorante azul de Coomassie brillante G250 (CBBG) a los residuos de Arg, Trp, Tyr, His y Phe de las proteínas. El CBBG se une a los residuos de las proteínas produciendo una absorbancia máxima a 595 nm; es necesario construir una curva de calibración para determinar la concentración de las muestras. (Anexo 12)



La determinación de proteínas tisulares únicamente se utilizó para la ajustar la concentración de AFP en el tejido.

8.1.7 Análisis histológico

Los tejidos obtenidos tras la hepatectomía se fijaron en formalina buferada al 4%, se deshidrataron los tejidos por medio de xiloles y alcoholes, estos últimos a diferentes porcentajes y finalmente se realizó el infiltrado con parafina hasta la completa inclusión del tejido, tomando en cuenta la orientación del tejido. Los tejidos fueron cortados en un micrótomó Leica RM2125 (Anexo 13) a un grosor de 3µm y colocados en portaobjetos previamente embebidos en poli-L-lisina al 0.1% para las tinciones histológicas e inmunohistoquímicas. Posteriormente se tiñeron los cortes siguiendo los protocolos correspondientes a las técnicas de tinción para hematoxilina-eosina, Tricrómica de Masson, y la tinción de Ácido Peryodico de Schiff (PAS) e inmunohistoquímicas AFP y Ki 67.

El análisis de las fotomicrografías para H&E y Tricrómica de Masson se utilizó el índice de METAVIR, para la tinción de PAS y las inmunohistoquímicas se utilizó un contador de células, ImageJ.

□ Tinción de H&E

Esta técnica se basa en la afinidad ácido-base. Es una coloración topográfica para el estudio de la estructura general de los tejidos.

La hematoxilina es un colorante básico, el cual tiñe los componentes ácidos de los tejidos como los núcleos celulares por su contenido en ADN, se observan de color azul-violáceo. Por otro lado la eosina es un colorante ácido, que tiñe los componentes básicos de los tejidos como las proteínas citoplasmáticas, se observan de distintas tonalidades (rosa, naranja y rosa). (Anexo 14)

□ Tricrómica de Masson

Como su nombre indica esta tinción emplea tres colorantes, hematoxilina, fucsina y azul de anilina. Esta tinción es muy útil para poner de manifiesto las fibras de colágeno tipo I, y el tejido conectivo en general; además estos colorantes usados pueden diferenciar el núcleo celular y el citoplasma. (Anexo 15)

□ Ácido Peryódico de Schiff (PAS)

El ácido peryódico oxida glucógeno, mucoproteínas y otros carbohidratos de alto peso molecular a aldehídos. Estos reaccionan con el reactivo incoloro de Schiff, y tiñen de un color rojo rosado brillante. La intensidad de la tinción depende del número de grupos aldehídos liberados por el ácido peryódico. (Anexo 16)

□ Score de METAVIR

El índice o score de METAVIR define el grado de fibrosis y el grado de necroinflamación asociada a un daño hepático crónico por la evaluación histopatológica en una biopsia. Para la necroinflamación se define como: 0, sin daño; A1, daño leve; A2, daño moderado, A3; daño grave. Para la fibrosis la clasificación está dada de F0-F4, es decir, F0, ausencia de fibrosis; F1, fibrosis portal sin septos; F2, fibrosis portal con algunos septos; F3, fibrosis en puente (varios septos); F4, cirrosis. (Anexo 17)

8.1.8 Análisis inmunohistoquímico

La inmunohistoquímica se fundamenta en la reacción antígeno–anticuerpo, el cual tiene por objeto la identificación de componentes biomoleculares presentes en los tejidos.

Para esto la parafina fue removida con calor seco a 50-60°C y las secciones fueron rehidratadas (Anexo 18). Después se prosiguió con el protocolo correspondiente para las inmunohistoquímicas: AFP (sc-130302 Santa Cruz Biotechnology) y Ki-67 (sc-56319 Santa Cruz Biotechnology) (Anexo 19) Las fotografías obtenidas fueron analizadas por el programa ImageJ.

□ Alfafetoproteína

El anticuerpo monoclonal AFP está destinado para utilizarse en la identificación cualitativa por microscopia óptica de la proteína alfafetoproteína en tejidos fijados en formalina e incluidos en parafina, mediante tinción inmunohistoquímica.

□ Ki-67

Ki-67 es un anticuerpo monoclonal de ratón descrito por Gerdes et al., (1983), el cual reacciona con un antígeno nuclear que se encuentra en células en las fases proliferativas del ciclo celular (G1, S, G2, M). Sin embargo no reacciona con células quiescentes que se encuentran en la fase G0.

El antígeno es sintetizado por la propia célula para su proliferación, por lo que es útil para cuantificar la proporción de células en proliferación en un área determinada de tejido.

8.2 Manejo estadístico de los datos y pruebas estadísticas

Los datos se analizaron estadísticamente por ANOVA (análisis de varianza) el cual nos sirve para comparar varios grupos en una variable cuantitativa, además de que si y se quiere saber si existe diferencia significativa entre ellos.

El análisis post hoc, es por el ajuste Bonferroni, esta técnica estadística ajusta el nivel de significación en relación al número de pruebas estadísticas realizadas simultáneamente sobre un conjunto de datos.

8.3 Aspectos bioéticos

El manejo de los animales se llevó a cabo de acuerdo a los lineamientos del Comité para el cuidado de los animales de laboratorio cumpliendo los criterios establecidos por la Norma Oficial Mexicana “Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio” NOM-062-ZOO-1999. Además siguiendo las medidas de seguridad bajo la NORMA Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002, Protección ambiental-Salud ambiental-Residuos peligrosos biológico infecciosos-Clasificación y especificación de manejo y las Normas establecidas por el Laboratorio Clínico Especializado “Los Ángeles” Puebla.

9. Resultados

9.1. *Valoración del daño hepático*

En un panel de función hepática, la mayoría de las pruebas utilizadas generalmente son indicativas de un daño, ya que pocas son las que determinan la función de este

órgano. En este trabajo para evaluar la presencia de daño utilizamos la actividad de tres enzimas séricas más utilizadas clínicamente como; alanino aminotransferasa (ALAT), aspartato aminotransferasa (ASAT) y gamma-glutamil transferasa (γ -GT).

Los resultados obtenidos del suero después del tratamiento (**Tabla 1**) para la ALAT, reveló que el grupo tratado con alcohol tuvo un incremento del 30% estadísticamente significativo en comparación con el grupo control; el grupo tratado con la BE tuvo un ligero incremento (9%) sin embargo, no es estadísticamente representativo; por el contrario el grupo tratado con la combinación mostró un decremento (2%). De igual forma la ASAT mostró el mismo comportamiento que la enzima anterior, es decir, tuvo un incremento significativo del 107% en el grupo tratado con alcohol respecto al grupo control, mientras los grupos tratados con la bebida energizante tuvo un incremento de 53% y la combinación una disminución de 8% sin ser estadísticamente significativos.

La otra enzima que se evaluó fue la gamma-glutamil transferasa (γ -GT), esta enzima se encuentra en la membranas celulares, la cual mostró un comportamiento diferente a las otras dos enzimas evaluadas (**Tabla 1**). los resultados muestran un incremento significativo en el grupo tratado con la combinación (A+BE) del 43% respecto al control, el grupo tratado con alcohol incrementó ligeramente (13%) sin ser estadísticamente significativo, por otro lado el grupo con la BE disminuyó 20% sin importancia estadística.

Por otro lado, se realizó la cuantificación de la bilirrubina como un marcador de daño hepático, debido a su conjugación en este tejido. En la **tabla 1** se observan los resultados obtenidos para las bilirrubinas, en donde se muestra un patrón similar, es decir, tanto para la bilirrubina total, directa e indirecta hay un ligero incremento en los grupos tratados con alcohol (12%, 29% y 10%, respectivamente), y el grupo con la combinación de alcohol más BE (18%, 36% y 14%, respectivamente) sin presentar cambios significativos comparados con el grupo control. Por otro lado, para el grupo con consumo de BE para la determinación de bilirrubina total e indirecta se encontró una disminución de 2% y 3% respectivamente de igual forma no son

estadísticamente significativos, sin embargo, en la cuantificación de bilirrubina directa este grupo no presentó ningún cambio.

Tabla 1. Valoración de panel hepático.

	Control	Alcohol	BE	A+BE
ALAT (U/L)	599.83 ± 16.5	780.58 ± 42.5 ▲	655 ± 68.88	587.48 ± 20.21
ASAT (U/L)	305.48 ± 28.73	631.68 ± 56.01 ▲	466.77 ± 40.28	280.20 ± 14.57
γ-GT (U/L)	67.30 ± 8.75	76.30 ± 7.13	53.93 ± 1.43	96.28 ± 4.43 ▲
BT (g/dL)	0.83 ± 0.03	0.93 ± 0.03	0.81 ± 0.03	0.98 ± 0.04
BD (g/dL)	0.14 ± 0.01	0.18 ± 0.01	0.14 ± 0.02	0.19 ± 0.1
BI (g/dL)	0.69 ± 0.03	0.76 ± 0.04	0.67 ± 0.04	0.79 ± 0.04

Los datos corresponden a la media ± ESM. El análisis estadístico fue realizado por ANOVA de una vía y post-hoc de Bonferroni $p \leq 0.05$ (▲) indica diferencia significativa.

9.2. *Evaluación de síntesis proteica hepática (PT, ALB, globulinas, relación A/G, PCR, fibrinógeno, TP)*

Una de las funciones del hígado es sintetizar la mayoría de proteínas para el organismo, en este trabajo se llevó a cabo la evaluación de varios parámetros como las proteínas totales (**Figura 12-A**), las cuales se encuentran disminuidas en los grupos alcohol, bebida energizante y la combinación, 8%, 3% y 4% respectivamente, siendo el grupo tratado con alcohol significativamente diferente respecto al control. Otro parámetro evaluado fue la albúmina (**Figura 12-B**), esta es una de las principales proteínas producidas en el hígado; los resultados muestran una disminución en los grupos tratados con alcohol (3%), BE (3%) y la combinación de alcohol y bebida energizante (5%), sin embargo, no son estadísticamente significativos contra el control.

La (**Figura 12-C**) muestra la concentración de globulinas en la cual se observa una disminución de 11% en el grupo tratado con alcohol, 1% para el grupo tratado con BE y 3% para la combinación, sin embargo no existe alguna diferencia significativa.

Otro parámetro que se midió fue el tiempo de protrombina (TP), el cual es dependiente de la actividad de los factores de coagulación (I, II, V, VI, X) sintetizados en el hígado, este es uno de los indicadores de la severidad de la enfermedad, los resultados obtenidos se presentan en la **Figura 12-D**, donde los tiempos se prolongaron en los grupos alcohol con un 70%, BE 115% y la combinación 124% siendo significativamente diferente los grupos con BE y la combinación.

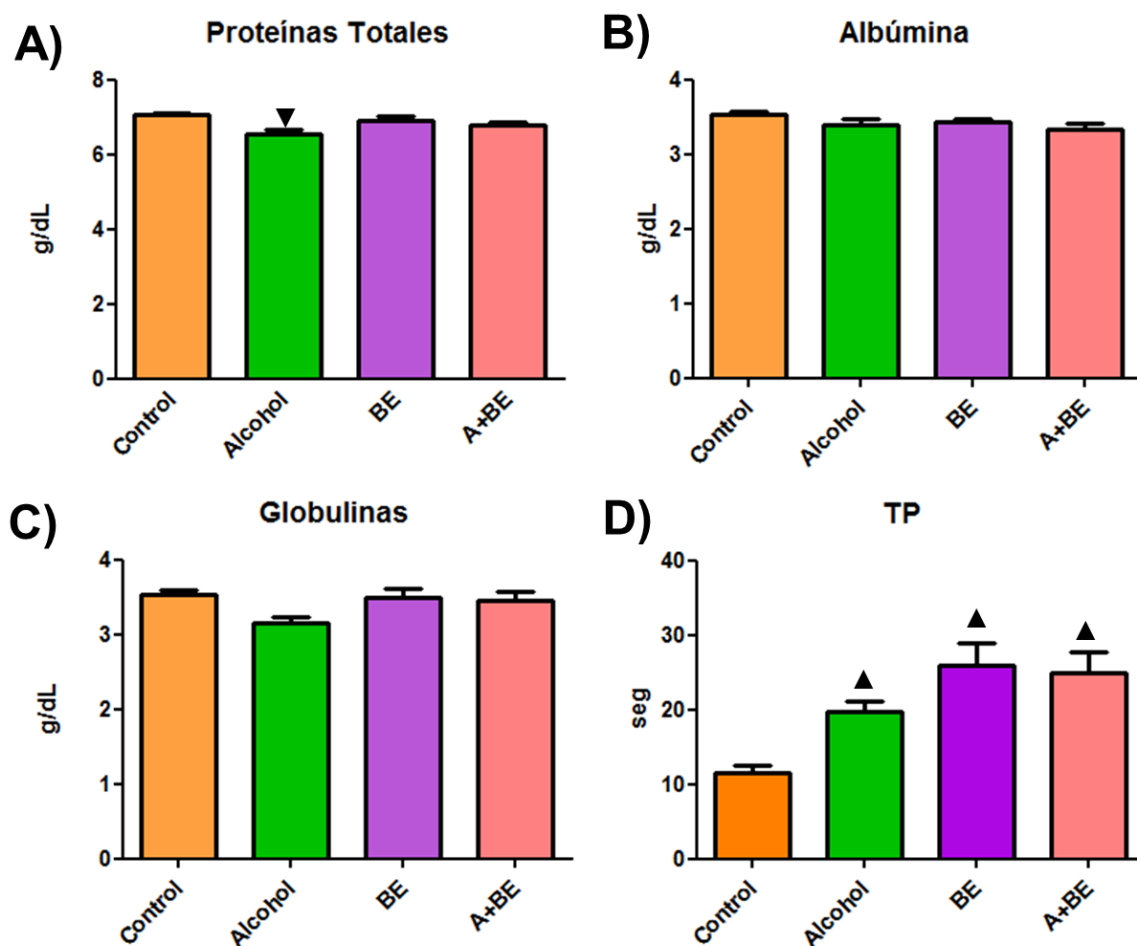


Figura 12. Actividad proteica. A) Proteínas totales B) Albúmina C) Globulinas. (▲ ▼) Indica diferencia significativa con un incremento o una disminución con respecto al grupo control, el análisis estadístico fue por ANOVA de una vía, post-prueba de Bonferroni $p \leq 0.05$.

Se realizó la relación A/G, la cual es una expresión de la correlación de albúmina a globulinas, para determinar los cambios de las proteínas. Con los datos obtenidos anteriormente de estos dos parámetros se determinó la relación y los resultados muestran que el grupo tratado con alcohol tiene un incremento de 8% (1.08), por otro lado, los grupos con consumo de BE y la combinación disminuyeron 1% (0.99) y 2% (0.98) respectivamente. Los datos corresponden a la media \pm ESM. El análisis estadístico fue realizado por ANOVA de una vía y post-hoc de Bonferroni $p \leq 0.05$.

Así mismo, el hígado produce proteínas en procesos inflamatorios llamadas proteínas de fase aguda o reactantes de fase aguda (RFA), los niveles plasmáticos de los RFA se elevan en tiempos diferentes, la proteína C reactiva comienza su elevación en 2 horas aproximadamente y alcanza un pico máximo en 48 hrs en humanos, por otro lado el fibrinógeno se incrementa horas después (8hrs aproximadamente). Sin embargo esta regla solo se lleva a cabo si este órgano no se encuentra comprometido, ya que cuando existe alguna alteración en el hígado este comportamiento es diferente, la concentración de fibrinógeno puede encontrarse disminuido.

Los resultados obtenidos muestran que la PCR (**Figura 13-A**) se incrementa significativamente en los grupos tratados con alcohol, BE y la combinación (A+BE) con un porcentaje de 1093%, 917% y 1602% respectivamente comparados contra el grupo control.

Por otro lado, el fibrinógeno (**Figura 13-B**) tiene un comportamiento diferente, es decir, sus niveles plasmáticos se encuentran disminuidos en los grupos de alcohol, BE y la combinación (A+BE) con valores de 42%, 13% y 29% respectivamente, siendo estadísticamente diferentes al control.

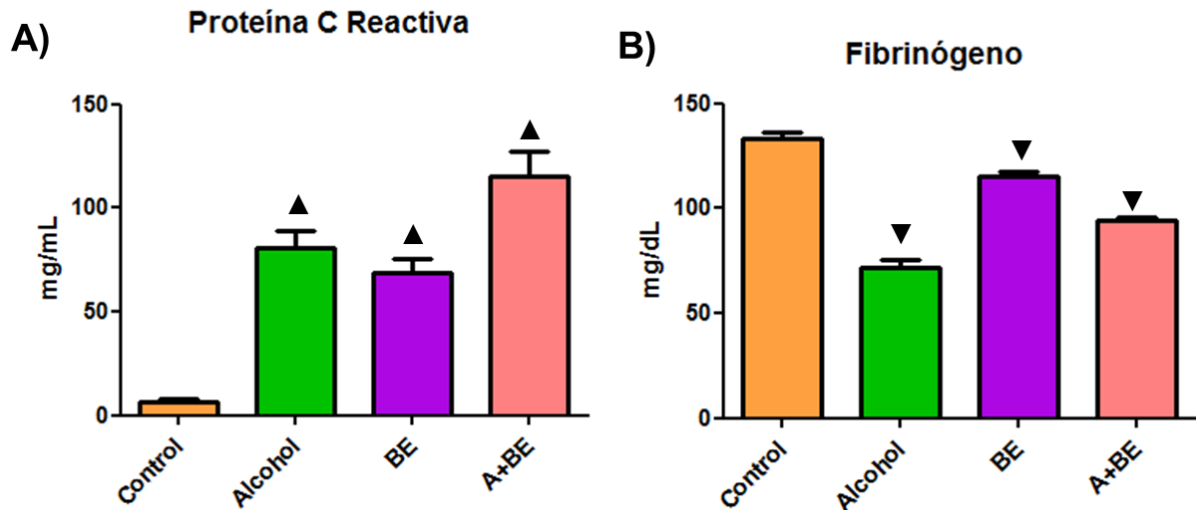


Figura 13. Proteínas de fase aguda. A) Proteína C Reactiva B) Fibrinógeno. (▲ ▼) Indica diferencia significativa con un incremento o una disminución con respecto al grupo control, el análisis estadístico fue por ANOVA de una vía, post-prueba de Bonferroni $p \leq 0.05$.

9.3. Valoración histológica del grado daño-lesión

Para evaluar el grado de daño-lesión se utilizaron tres tinciones, H&E, Tricrómica de Masson y PAS, se tomaron fotomicrografías a cada una de estas para posteriormente hacer la evaluación. Se utilizó el score de METAVIR el cual nos permite categorizar el daño sobre la histología del tejido hepático (necro-inflamatoria) y la determinación del grado de fibrosis, para estos dos parámetros las tinciones que se ocuparon fueron H&E y Tricrómica de Masson, respectivamente.

En el score para la determinación de la actividad necro-inflamatoria, se utilizan dos categorías, la necrosis fragmentada que se define de la siguiente manera, 0, ausente; 1, alteración focal de la placa periportal en algunos tractos; 2, alteración difusa de la placa periportal en algunos tractos; 3. Alteración difusa de la placa periportal en todos los tractos. La otra categoría que se emplea es la necrosis lobular focal, se define como 0, menos de un foco necroinflamatorio; 1, al menos un foco necroinflamatorio; 2, múltiples focos necroinflamatorios (como se indica en la sección de metodología). Las puntuaciones obtenidas de estos dos parámetros determina la daño total, se define como: 0, sin daño; A1, daño leve; A2, daño moderado, A3;

daño grave. Los resultados obtenidos se muestran en la **Figura 14**, donde se observa que el grupo con mayor daño es el grupo tratado con la combinación de las bebidas, ya que tuvo un puntaje de 3. Por otro lado, el grupo con consumo de alcohol tiene una actividad moderada, ya que se obtuvo un score de 2; estos dos tienen un incremento significativo comparado con el grupo control, sin embargo el grupo tratado con la bebida energizante muestra una actividad leve (1).

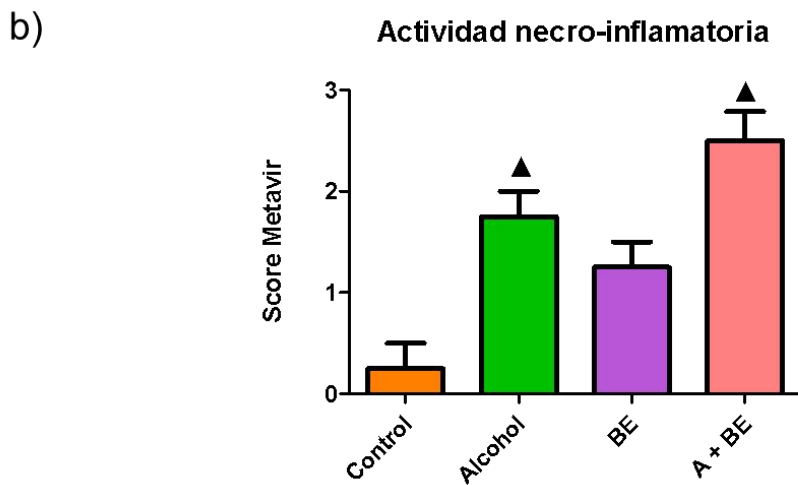
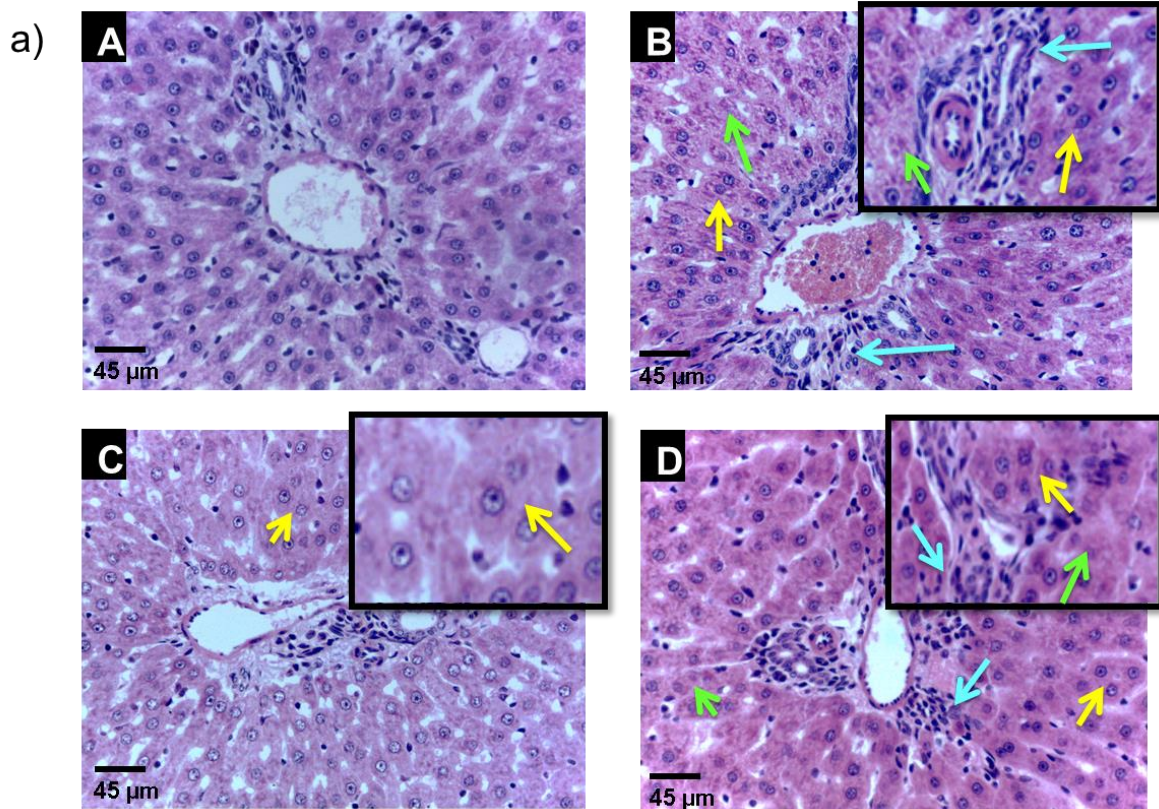


Figura 14. Tinción de H&E, corte histológico del lobulillo hepático. a) Fotomicrografía 40X. **A.** Grupo control tratado con agua **B.** Grupo tratado con alcohol **C.** Grupo tratado con bebida energizante **D.** Grupo tratado con la combinación alcohol con bebida energizante. (↔) Necrosis confluyente, (↔) necrosis lítica focal, (↔) infiltrado inflamatorio **b)** Evaluación cuantitativa de score de METAVIR de la actividad histológica. (▲) Indica diferencia significativa respecto al grupo control, el análisis estadístico fue por ANOVA de una vía, post-prueba de Bonferroni $p \leq 0.05$.

Por otro lado, para la determinación de fibrosis hepática la cual se localiza alrededor del área portal, se llevó a cabo de igual forma con base al score de METAVIR. La clasificación está dada de F0-F4, es decir, F0, ausencia de fibrosis; F1, fibrosis portal sin septos; F2, fibrosis portal con algunos septos; F3, fibrosis en puente (varios septos); F4, cirrosis. En la **Figura 15** muestra la evaluación de la fibrosis, donde se al observar las laminillas del grupo control (**Figura 15-A**) sin fibrosis (F0), al igual que la fotomicrografía del grupo con consumo con BE (**Figura 15-B**). Por otro lado, el grupo tratado con alcohol (**Figura 15-C**) tiene un score de F2, ya que se observa la fibrosis portal con la formación de septos en escasa cantidad. Así mismo, el grupo con consumo de alcohol y BE observó una escala F2 (**Figura 15-D**).

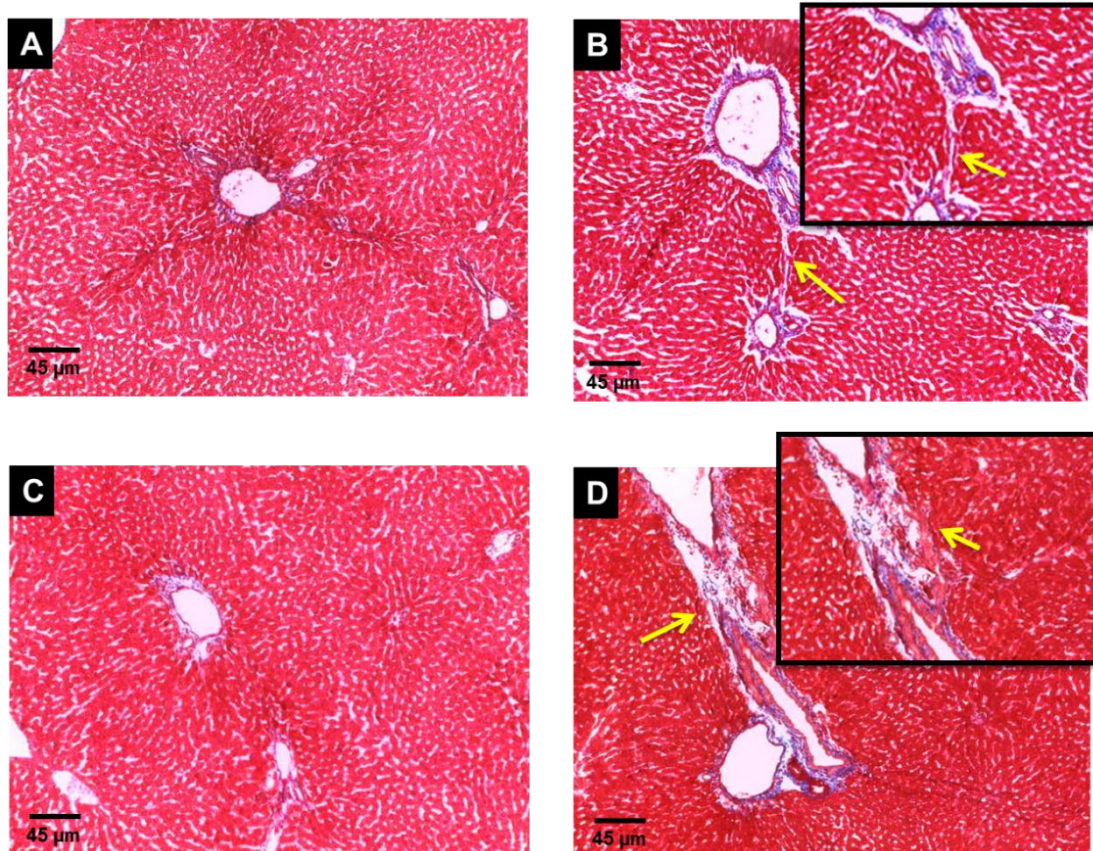


Figura 15. Corte histológico del lobulillo hepático. Fotomicrografía muestra la presencia de fibrosis al término del tratamiento. Técnica Tricrómica de Masson, 10X. (←) formación de pequeños septos **A.** Grupo control tratado con agua **B.** Grupo tratado con alcohol **C.** Grupo tratado con bebida energizante **D.** Grupo tratado con la combinación alcohol con bebida energizante. El análisis cualitativo del grado de fibrosis se expresó en puntos de acuerdo al Score de METAVIR.

También se realizó la tinción de PAS, la cual nos ayuda a determinar si existe una glicación en las células hepáticas, para ello se realizó la cuantificación de células positivas para PAS y los resultados que se obtuvieron fueron los siguientes, en la **Figura 16-A** la cual es el grupo control se encontró un 40% de células positivas. Para el grupo tratado con el alcohol (**Figura 16-B**) se observó un 26% de células positivas con diferencia significativa comparado con el control, ya que existe una disminución del número de células PAS positivo. Sin embargo, en el grupo tratado con la bebida energizante (**Figura 16-C**) se encontró un incremento significativo de células PAS positivo de un 171%, lo que nos indica que hay un incremento en el proceso de

glaciación o resguardo de glucógeno, asociado a los ingrediente de este tipo de bebidas; por otro lado, el grupo con la combinación (**Figura 16-D**) tuvo 59% de células PAS positivos, sin diferencia significativa.

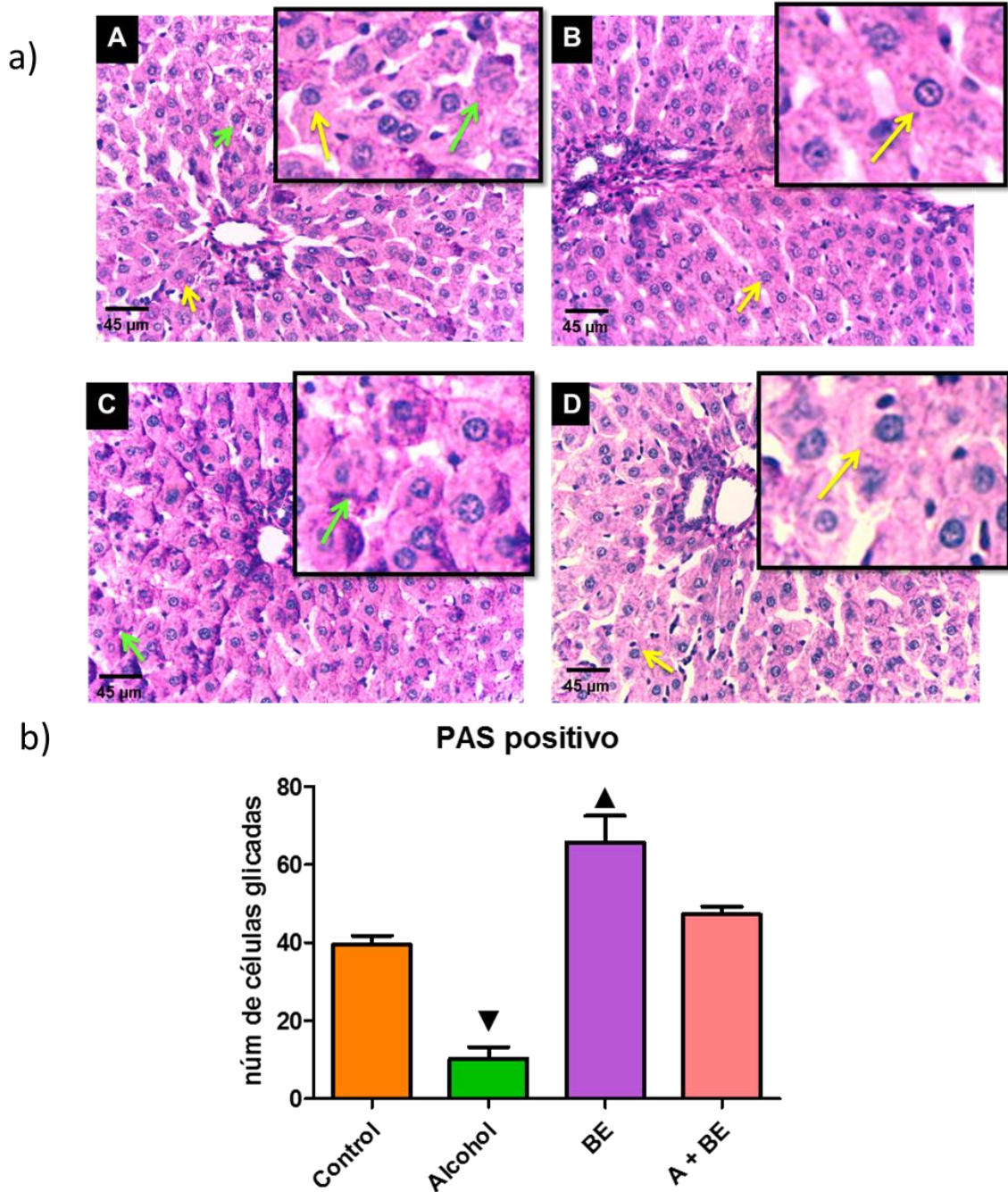


Figura 16. Corte histológico del lobulillo hepático. a) Fotomicrografía tinción PAS 40X. **A.** Grupo control tratado con agua **B.** Grupo tratado con alcohol **C.** Grupo tratado con bebida energizante **D.** Grupo tratado con la combinación alcohol con bebida energizante. (←) Célula con glicación, (←) Célula con glicación.

células sin glicación, **b)** Evaluación cuantitativa de células positivas para PAS. El análisis cuantitativo se expresó en número de células (▲▼) Indica diferencia significativa respecto al grupo control, el análisis estadístico fue por ANOVA de una vía, post-prueba de Bonferroni $p \leq 0.05$.

9.4. Evaluación de AFP sérica y tisular

Complementariamente a las proteínas de respuesta inflamatoria y a los cambios histológicos evidenciados, se evaluó la concentración de AFP sérica **Figura 17-A**, los resultados obtenidos de la concentración en los grupos tratados con alcohol, BE y alcohol más BE incrementan un 1133%, 117% y 433% respectivamente, todos los grupos fueron comparados contra el control lo cual revela que existe una diferencia significativa.

Con la finalidad de corroborar el hallazgo sérico, la evaluación de la concentración de AFP también se realizó a nivel tisular. En la **Figura 17-B**, muestra un incremento con diferencia significativa contra el grupo control en los grupos de alcohol (261%) y la combinación (269%), el grupo de la bebida energizante un incremento del 168%.

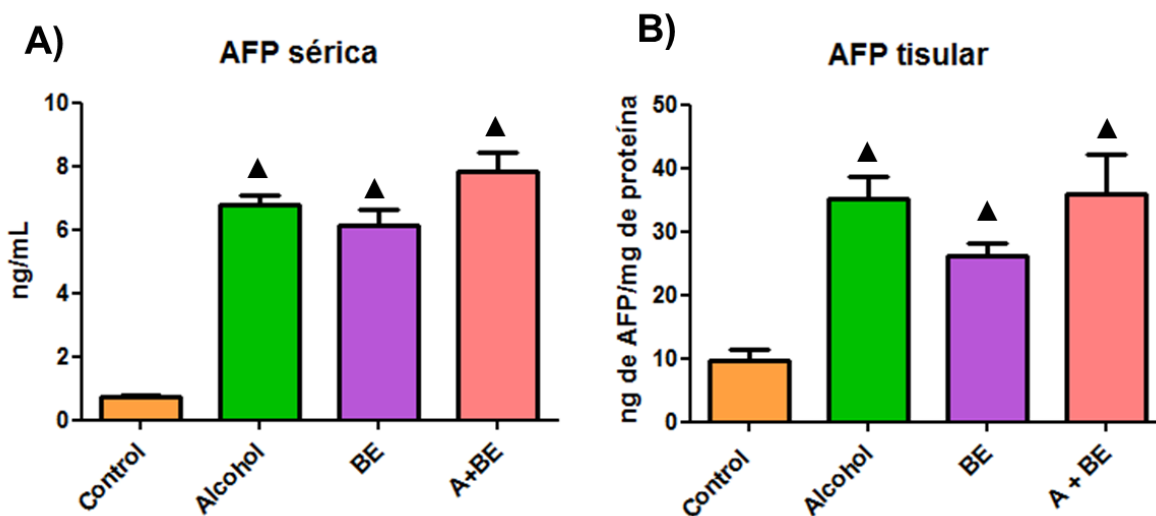


Figura 17. AFP sérica y tisular. **A)** Concentración de AFP sérica. **B)** Concentración de AFP tisular, la cual se expresa ng de AFP por mg de proteína en tejido. (▲) Indica diferencia significativa respecto al grupo control, el análisis estadístico fue por ANOVA de una vía, post-prueba de Bonferroni $p \leq 0.05$.

9.5. Valoración inmunohistoquímica para AFP y Ki-67

Además de la evaluación de la concentración tisular de AFP, se realizó la inmunohistoquímica para esta proteína con la finalidad de mostrar evidencia histológica a la cuantificación por ELISA. El antígeno de AFP se encuentra en el citoplasma de los hepatocitos por lo que el marcaje será observado de color café y solo fue tomada dicha marca citoplasmática. En la **Figura 18-A** se muestra al grupo control en el cual la marca es difusa y escasa. Para el grupo tratado con alcohol (**Figura 18-B**) su marcaje es evidentemente, ya que existe una síntesis acelerada de esta proteína, por lo que se puede corroborar con los datos anteriores obtenidos, sin embargo, en la **Figura 18-C** se observa que la marca de AFP es débil, ya que tiene zonas localizadas positivas sin embargo estas se encuentran ampliamente difundidas a lo largo del tejido. Por otro lado, el grupo tratado con la combinación (**Figura 18-D**) tiene la mayor producción de esta proteína, ya que su marcaje se observa en casi todas las células.

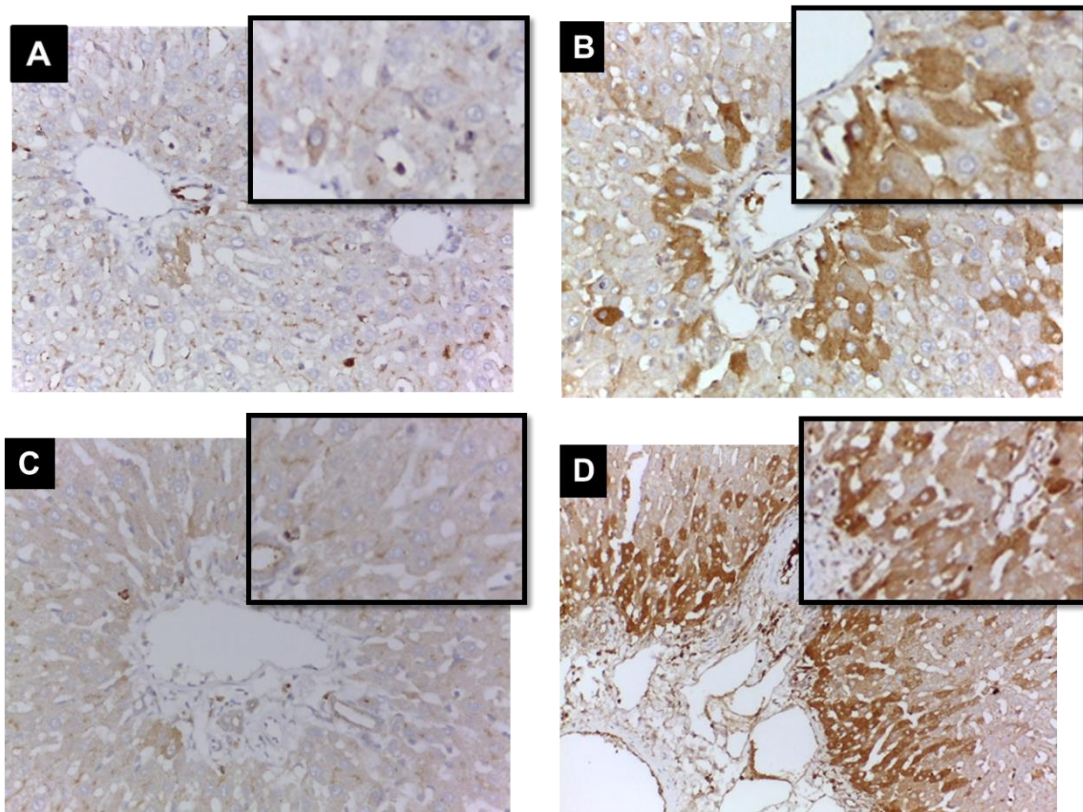


Figura 18. Inmunohistoquímica AFP del lobulillo hepático (40X). **A.** Grupo control tratado con agua **B.** Grupo tratado con alcohol **C.** Grupo tratado con bebida energizante **D.** Grupo tratado con la combinación (alcohol con bebida energizante).

Para poder establecer la dinámica de la AFP es necesario corroborar el efecto hiperplásico con el cual se ha asociado clínicamente, debido a que el hígado es capaz de regenerarse, y es un tejido normalmente proliferativo, se realizó el marcaje para la proteína Ki-67, el cual es un antígeno nuclear que se encuentra en células mitóticas en fases G1, S, G2, M del ciclo celular. Los resultados que se observaron fueron los siguientes, en la **Figura 19-A** la cual es el grupo control se encontró un 3% de células positivas, para el grupo tratado con la BE (**Figura 19-C**) se observó un 5% de células positivas, sin embargo, en los grupos tratados con alcohol (**Figura 19-B**) y la combinación (**Figura 19-D**) se observó un 84% y 78% de células positivas respectivamente, teniendo diferencia significativa, lo que nos indica que existe una mayor proliferación celular en estos grupos.

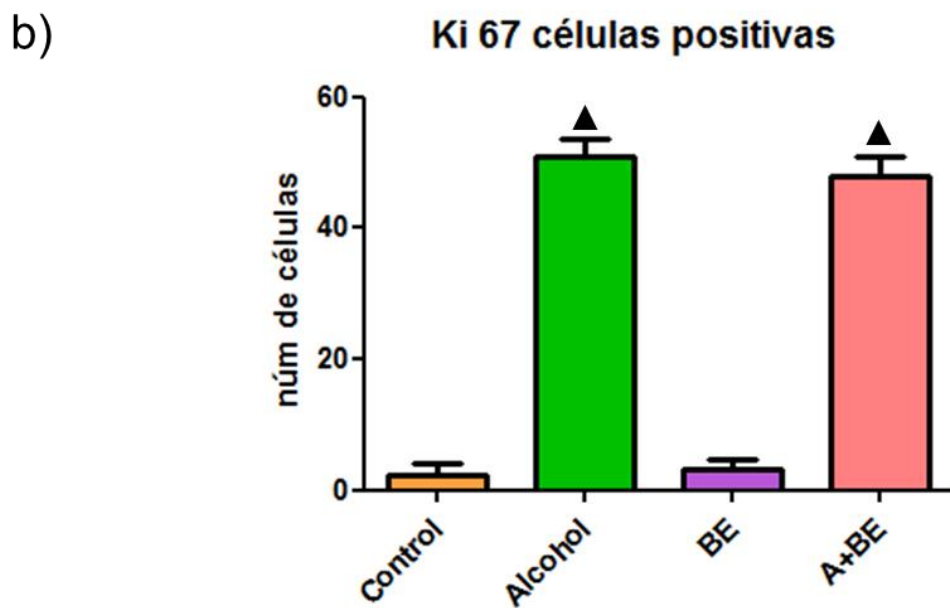
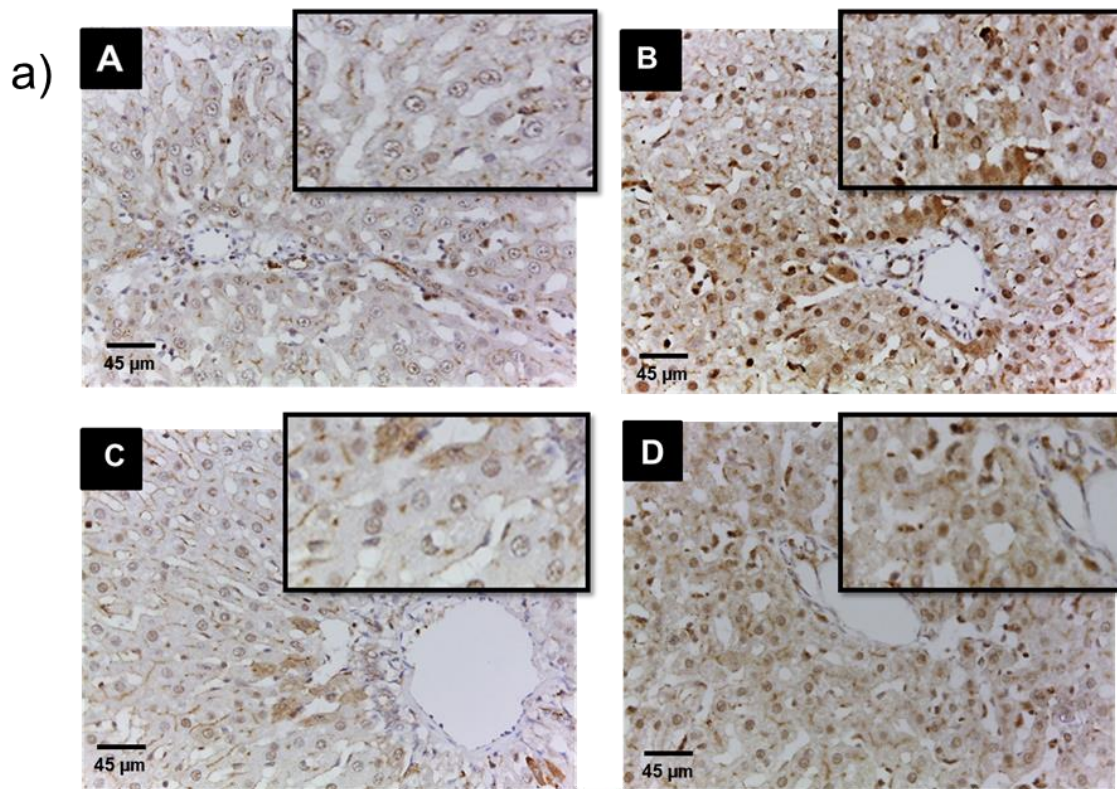


Figura 19. Inmunohistoquímica Ki-67 del lobulillo hepático. a) Fotomicrografía muestra el marcaje para Ki 67 después del tratamiento. A. Grupo control tratado con agua B. Grupo tratado con alcohol C. Grupo tratado con bebida energizante D. Grupo tratado con la combinación alcohol con bebida energizante. b) Evaluación cuantitativa de células positivas de la marca nuclear para Ki 67. El análisis cuantitativo se expresó en número de células (▲) Indica diferencia significativa respecto al grupo control, el análisis estadístico fue por ANOVA de una vía, post-prueba de Bonferroni $p \leq 0.05$.

10. DISCUSIÓN

En el presente trabajo se evaluó las alteraciones serológicas de un perfil hepático clásico en modelos murinos en combinación y por separado del consumo de bebidas alcohólicas y energizantes. Así mismo, fueron evaluados los cambios sobre la función de producción proteica, y se evaluó la presencia de daño histológico a nivel hepático, después de 60 días de consumo.

El hígado es un órgano implicado en la mayoría de los procesos metabólicos, donde regula y detoxifica sustancias irrigadas por vía portal por la cual distribuye metabolitos necesarios y no necesarios, así como, almacena y elimina de forma selectiva y adecuada lo que permite la mantención de la homeostasis en el organismo.³⁴

En la práctica clínica diaria, los métodos para valorar al hígado son inespecíficos e insuficientes, ya que de forma breve, las pruebas funcionales hepáticas están divididas en: pruebas de posible lesión hepatocelular, pruebas relacionadas al metabolismo de las bilirrubinas y pruebas que analizan la síntesis hepática; sin embargo, generalmente suelen alterarse sin correlación evidente en una variedad la cual lleva a la pérdida de especificidad diagnóstica cuando el daño es crónico o progresivo.⁴⁵

Lo primero que se realizó fue la valoración del daño hepático, clínicamente está asociada a un perfil hepático clásico compuesto por: transaminasas, alanino aminotransaminasa y aspartato aminotransaminasa (ALAT y ASAT), gamma-glutamil transferasa (γ -GT) y bilirrubinas en sus formas conjugada y no conjugada (total, directa e indirecta). Desde el punto de vista bioquímico, se ha observado que en la hepatitis crónica alcohólica existe un aumento en los niveles de aminotransferasas y γ -GT según estudios anteriores (Suthat 2009 et al, Ugwuja et al. Repetto M.).^{46,47} Sin embargo, esto también se ha visto en otras enfermedades como: hepatitis vírica, hemocromatosis hereditaria, hepatitis autoinmune, etc.⁴⁸ Por otro lado, el consumo de bebidas energizantes también provoca cambios en las concentraciones de estas enzimas, lo que pone de manifiesto agresiones lesivas sobre los hepatocitos.⁴⁹

Las transferasas son enzimas intracelulares y pueden encontrarse exclusivamente en el citoplasma como la ALAT, la cual se encuentra en el citoplasma (60%) y en la mitocondria (40%), o fijadas a distintas organelas como la ASAT en el citoplasma (40%) y en la mitocondria (60%), la γ -GT se localiza en la membrana citoplasmática, así como del retículo endoplásmico liso, en microsomas, en la fracción soluble del citoplasma de hepatocitos y células canaliculares de los conductillos biliares. Sin embargo, estas enzimas no siempre son buenos indicadores, ya que son sensibles pero poco específicas del daño de los hepatocitos. Siendo la ALAT más específica que la ASAT, debido a que esta última no solo se encuentra en el hígado, sino también en músculo, corazón, páncreas, eritrocitos. Por tanto, las concentraciones tanto de ALAT como ASAT pueden variar, incluso encontrarse normales aunque las células hepáticas estén sufriendo algún daño (inflamación, necrosis de baja intensidad, formación de tejido cicatricial).^{50,51} La γ -GT puede también encontrarse elevada en procesos tumorales, en la colestasis intrahepática o extrahepática por proliferación de conductillos biliares, además su síntesis es inducida por el consumo y metabolismo de alcohol, así como por barbitúricos.⁸ Las concentraciones alcanzadas de estas enzimas están determinadas por la concentración intracelular, localización de la enzima, la cantidad liberada por la célula y el grado de depuración de la circulación.⁵⁰

Nuestros resultados muestran un incremento en las aminotransferasas a nivel sérico en los grupos con consumo de alcohol y bebida energizante, siendo significativo el aumento en el grupo con alcohol. Estos resultados coinciden con otros estudios realizados anteriormente.^{48,49} Por otro lado, la γ -GT se encuentra de igual forma elevada en el grupo con consumo de alcohol, pero únicamente en el grupo de la combinación de las bebidas se encontró una elevación significativa, esto probablemente puede explicarse por un mecanismo de inducción enzimática, siendo el alcohol responsable de la síntesis aumentada de esta enzima por parte de los microsomas de la célula hepática, debido a que la γ -GT regula los niveles de glutatión (GSH), el alcohol por su parte genera especies reactivas de oxígeno (ROS) que a su vez, pueden provocar diferentes efectos (expresión de citocinas, modificación de biomoléculas, formación de lipoperoxidación, etc.). El glutatión actúa

como antioxidante ya que neutraliza ROS, la γ -GT por tanto, se encuentra incrementada para proporcionar más GSH y proteger a la célula de dicha oxidación, además de cambios inflamatorios; se asume que esto puede suceder en ausencia de lesión hepática alcohólica.⁵² Sin embargo, en el grupo con consumo con bebida energizante se ve una disminución, probablemente esta disminución sea por un ingrediente que contiene este tipo de bebidas como es la taurina, ya que tiene propiedades antioxidantes y también ayuda en la estabilización de la membrana celular siempre y cuando las cantidades de consumo sean controladas ya que puede presentar eventos adversos.³⁶

El incremento de las enzimas puede deberse a que el etanol comprende alteraciones de las propiedades de las membranas celulares, en un consumo crónico, suele ocasionar disminuciones compensatorias en la fluidez de las membranas subcelulares, que pueden alterar los receptores ligados a las membranas y las actividades enzimática, por lisis de los hepatocitos (necrosis) o una alteración transitoria de la permeabilidad de la membrana (inflamación). El consumo de alcohol también acelera la producción de ROS.^{53,54}

El alcohol, en su biotransformación produce un incremento de NADH asociado a aldehídos lo que provoca la generación de radicales libres, además, la exposición crónica al alcohol activa a las células de Kupffer que a su vez promueve citocinas e interleucinas inflamatorias que amplifican señales autócrinas y parácrinas que generan la expresión del factor de necrosis tumoral α (TNF- α), que posteriormente estimula a la mitocondria a aumentar la producción de más especies reactivas de oxígeno (ROS), lo que induce necrosis y apoptosis del hepatocito.⁵⁵

Por otro lado, los ROS promueven la peroxidación de los lípidos, lo que induce no solo una mayor inflamación, sino también la progresión de fibrosis. La inflamación se inicia por efecto del acetaldehído (producto de degradación del alcohol), que forma conjugados antigénicos al unirse de manera covalente con las proteínas celulares. Las primeras alteraciones a nivel histológico se localizan de manera predominante alrededor de la vena central.⁵⁵ Ebuehi y cols (2011), encontraron que las BE afectan la actividad de las enzimas hepáticas, en su estudio compararon dos marcas

comerciales (Power Horse y Red Bull), este efecto puede deberse según sus datos experimentales a la concentración de cafeína que contienen ambas bebidas.⁵⁶

Así mismo, la concentración de bilirrubina el cual es un producto de la degradación y catabolismo de la hemoglobina, que está presente en el suero de manera no conjugada (bilirrubina indirecta, liposoluble), o conjugada (bilirrubina directa, hidrosoluble); esta última, es metabolizada en el retículo endoplásmico liso del hepatocito por la glucuronil-transferasa.⁴⁵ La bilirrubinemia total está separada en estas dos fracciones, prácticamente toda la bilirrubina presente en el suero representa la fracción no conjugada. El aumento de producción de la bilirrubina, está ligada a una alteración en el transporte a los hepatocitos o la conjugación defectuosa de estos, asociándose principalmente con un incremento de la fracción no conjugada.⁵³ Sin embargo, el origen de su elevación puede deberse a etiologías y mecanismos diversos, que engloban desde alteraciones en la captación y transporte intrahepatocitario, problemas en la glucuronoconjugación o alteraciones en la excreción.⁴⁵ Los resultados obtenidos en nuestro estudio arrojaron un incremento en la bilirrubina total y sus dos fracciones en los grupos alcohol y la combinación, sin embargo, el grupo de la bebida energizante tuvo una ligera disminución en la bilirrubina total y la fracción indirecta, mientras que la fracción directa no mostró diferencias frente el grupo control. Las concentraciones de bilirrubina son estables hasta que haya ocurrido un daño hepático considerable y la cirrosis esté presente, dicho esto, pensamos que el daño producido por el consumo de alcohol y bebida energizante y su combinación en los animales no es lo suficientemente crónica como para producir cambios en las concentraciones de las bilirrubinas.

Los resultados en general del perfil hepático clásico, no muestran un cambio significativo del daño que se está produciendo por el consumo de bebidas energizantes o la combinación (A+BE), sin embargo, los grupos tratados con alcohol se comparten diferente ya que en la mayoría de las determinaciones si se observa un mayor cambio, para discriminar la cuestión daño-efecto natural, se realizó la evaluación de la función hepática, ya que el hígado está relacionado al mantenimiento proteico metabólico, ya que está implicado en la síntesis de proteínas

plasmáticas, considerando que algunas de estas tienen una vida media larga, y tomándose en cuenta que el hígado posee una elevada capacidad de reserva funcional, por lo que la concentración de proteínas puede mantenerse normal hasta que la lesión hepática es grave, lo que ocasiona un descenso paulatino de estas.³⁴

Para esto se evaluó los cambios sobre las proteínas totales, donde los resultados obtenidos mostraron una disminución significativa en el grupo con consumo con alcohol, sin embargo, los otros grupos tratados con bebida energizante y la combinación tuvieron un ligero decremento siendo no significativo; las proteínas totales es una medición aproximada de todas las proteínas plasmáticas presentes en el suero, las fracciones proteicas involucradas son la albúmina y las globulinas. Clínicamente esta última es determinada por la diferencia de las proteínas totales y la albúmina. En el consumo crónico de alcohol se ha observado una disminución en la síntesis de proteínas a causa del acetaldehído formado de la oxidación del etanol, parece ser la consecuencia de la ineficiencia hepática para oxidar el exceso de equivalentes reductores generados durante la oxidación del etanol, por lo que existe un estado altamente reducido del citosol lo que pudiera afectar a la síntesis de proteínas ribosómicas; aunado a la elevación en los niveles de NADH citosólica conduciendo a la desviación de piruvato en lactato por lo que hay disminución notable de piruvato, aumentando la relación lactato/piruvato. El piruvato está en relación a la síntesis de aminoácidos como alanina, valina, leucina e isoleucina. Sin embargo, el mecanismo por el cual esta alteración interfiere con la síntesis de proteínas es desconocido.^{57,58} Por otro lado, el acetaldehído perjudica las funciones celulares y la expresión génica mediante la formación de aductos con proteínas, esto se produce mediante la interacción con el grupo amino épsilon de la lisina o el grupo α amino de los aminoácidos N-terminales. Los aductos de acetaldehído estables alteran la estructura y función de proteínas, incluyendo enzimas.⁵⁹ Además afecta la secreción de las mismas a niveles de los microtúbulos, debido a que el acetaldehído es capaz de unirse a la tubulina e inhibir su polimerización,^{60,61} aunado al daño que se está produciendo estructuralmente en la membrana mitocondrial como de los hepatocitos debido a la lipoperoxidación causada por el incremento de NADH y por la

conversión de acetaldehído (ACH) por la aldehído deshidrogenasa (ALDH), lo cual genera un estrés oxidativo en las células hepáticas.⁶²

Por otro lado, la albúmina como se sabe, es la principal proteína plasmática sintetizada y secretada por el hígado, tiene una semivida en plasma de 20 días aproximadamente, y un descenso significativo ocurre lentamente si hay una síntesis reducida, esta proteína contribuye mayormente a la presión oncótica, además de ser la principal proteína transportadora. No obstante, es posible que no se reconozca una alteración grave de la concentración de la albúmina sino hasta después de un daño severo.^{60,61} Cuando existe una alteración que afecta a las células hepáticas, el hepatocito pierde su capacidad de sintetizar albúmina, existen varias causas que disminuyen la concentración en suero de esta proteína las cuales pueden ser: desnutrición, neuropatías, síndrome nefrótico, etc.^{45,60} Nuestros resultados arrojan una ligera disminución en los tres grupos (alcohol, BE y A+BE) sin embargo, no son significativos.

De igual forma, la concentración de globulinas que fue otro parámetro que se evaluó el cual mostró una disminución en los tres grupos (alcohol, BE y A+BE) no significativa. Las globulinas involucran 4 grupos, según su corrimiento electroforético: globulinas alfa 1 y 2, globulinas beta, globulinas gamma; algunas de estas globulinas se clasifican como reactantes de fase aguda.⁶³

Además, con los resultados obtenidos de albúmina y globulinas se realizó la relación albúmina/globulina (A/G), la cual es una expresión de la correlación de albúmina a globulinas para determinar los cambios en las proteínas, en condiciones normales esta tasa es mayor de 1. Cuando existe una disminución paulatina de la masa celular (pérdida de la citoarquitectura), disminuye progresivamente la concentración de albúmina, por otro lado, se ha descrito que la concentración de gamma globulinas incrementa, esto es debido a que las alteraciones vasculares hacen que sustancias antigénicas, absorbidas desde el intestino, eludan el proceso de filtrado de las células de Kupffer de los sinusoides y estimulando la síntesis de inmunoglobulinas (G y A),⁶² por lo que se ve una disminución en la relación A/G. Sin embargo, nuestros resultados obtenidos para esta relación no muestran un cambio significativo.

Otra prueba que está íntimamente ligada al daño hepático y que se evaluó fue el tiempo de protrombina (TP). Este es dependiente de la actividad de los factores de coagulación de la vía extrínseca y además incluye la vía común (I, II, V, VI y X), todos estos sintetizados en el hígado, por ello es la prueba con mayor utilidad para detectar anomalías en la coagulación asociadas con daño hepático.^{8,45} Los resultados que se muestran en el trabajo son tiempos prolongados en los tres grupos (Alcohol, BE y la combinación); se sabe que en pacientes con consumo crónico de alcohol, el TP se encuentra prolongado, debido a la deficiencia en la síntesis de los factores, sin embargo, las bebidas energizantes también muestran un cambio en la dinámica, lo cual estaría en relación a un retardo en la producción de la proteína.⁶⁴ La disminución en la combinación es debido al efecto del alcohol exacerbado con la bebida energizante, probablemente las bebidas energizantes y alguno de sus ingredientes provoca un mecanismo similar a la del alcohol para inhibir la síntesis de estos factores por lo que encontramos tiempos prolongados.

Los factores y proteínas (C y S) sintetizados en el hígado sufren una gamma carboxilación de residuos específicos de ácido glutámico dependientes de la vitamina K, necesarios para la unión de cationes divalentes como el ión calcio y su posterior unión a fosfolípidos o a la membrana plasmática, requeridos para su activación, ya que estas proteínas son secretadas al suero sanguíneo como zimógenos y deben ser activadas a serín proteasas para funcionar en la cascada de la coagulación. Las enfermedades hepáticas crónicas, normalmente están asociadas con trastornos de la coagulación como resultado de la síntesis disminuida de estos factores de la coagulación y trastornos de la función del sistema retículoendotelial.⁶⁵

Así mismo, tenemos otras proteínas que son sintetizadas en el hígado como respuesta a un proceso inflamatorio, estas proteínas son las llamadas “reactantes de fase aguda (RFA)”. Para la expresión o síntesis de RFA existe una serie de eventos, iniciado por las células fagocíticas activadas (células de Kupffer), los fibroblastos y las células endoteliales (células estelares) que liberan citoquinas pro-inflamatorias (IL-1, IL-6, TNF- α). Las citoquinas se unen a un receptor donde activan señales intracelulares a través de la fosforilación de tirosina interviniendo c-Jun/c-fos, el factor

nuclear NF- κ B hepático o el CCATT/potenciador de la unión a proteínas (C/EBPs), además de la fosforilación de la tirosina, así como la activación de las tirosin-kinasas intracelulares (JAKs), el factor de transcripción citoplasmático latente, el STAT1, el STAT3 y el STAT5 (activadores de la transcripción) y las proteínas activadas por mitógenos (MAPK's), donde todas estas señales promueven la transcripción, traducción de los RFA.^{5,66}

Los niveles plasmáticos de los RFA se elevan en tiempos diferentes posterior al evento lesivo o inflamatorio censado por el hígado. Dentro de las primeras horas se incrementa la concentración plasmática de proteína C reactiva y α 1 antitripsina; 12 horas después, se elevan la α 1 glicoproteína ácida, la haptoglobina, la fracción C4 del complemento y el fibrinógeno. Todas alcanzan su máxima concentración entre 2 y 5 días. El aumento en la síntesis de las proteínas de la fase aguda, es acompañada por una disminución de la prealbúmina, albúmina y transferrina, que constituyen los llamados reactantes de fase negativa. Por lo general, las proteínas de fase aguda forman parte del grupo de las alfa 1 y 2 globulinas.¹¹

Las proteínas evaluadas en el presente trabajo fueron: la proteína C reactiva (PCR) y el fibrinógeno; donde los resultados mostraron que la PCR incrementó significativamente su concentración en los grupos de alcohol, BE y la combinación (A+BE). En este sentido, se sabe que el alcohol y las bebidas energizantes en un consumo crónico pueden provocar procesos inflamatorios, lo cual induce la síntesis de RFA. La elevación de la PCR en plasma se produce a las 2 horas, y alcanza su máxima concentración a las 48 horas. La cinética de los niveles séricos de la PCR se correlaciona bien con el estímulo inflamatorio. Luego de un estímulo inflamatorio agudo, la concentración de PCR aumenta rápidamente, una vez el estímulo desaparece, sus niveles disminuyen hasta su estado basal, teniendo una vida media de unas 18 horas; sin embargo, permanece elevada en procesos inflamatorios crónicos como el consumo de alcohol,¹¹ aunque por primera vez se muestran evidencias en el consumo crónico de bebidas energizantes y la combinación con bebidas alcohólicas. Por otro lado, los resultados obtenidos para fibrinógeno se observó una disminución significativa en los grupos con tratamiento (alcohol, BE y la

combinación). Estos resultados son probablemente debido al daño que se está causando en el hígado, ya que en un proceso de respuesta aguda de inflamación natural, el fibrinógeno es liberado en mayor cantidad por los hepatocitos, de manera que sus niveles se ven considerablemente aumentados, sin embargo, en las enfermedades hepáticas crónicas, la concentración de fibrinógeno disminuye.^{11,67} Esta disminución podemos pensar que es debido de igual forma a causa de la producción de acetaldehído en el caso del alcohol lo cual provoca una disminución en la síntesis, para las bebidas energizantes no hay estudios que soporten este resultado, sin embargo, debido a la dinámica que se presenta es sugestiva de que alguno de los componentes de este tipo de bebida altere y comprometa la función sintética como se ha visto en los resultados anteriores.⁶⁸

Teniendo en cuenta los resultados, el grupo tratado con alcohol muestra evidencia de daño con cambios significativos en la dinámica de producción proteica. Los mecanismos por los cuales el consumo crónico de alcohol conduce al daño hepático irreversible aún no se conocen por completo, sin embargo, diversas evidencias apuntan a una íntima relación con la acumulación de grasa (hígado graso alcohólico), la cual produce una inducción de proteínas microsomales, así como de las proteínas fijadoras de ácidos grasos, y tiene lugar a la retención de proteínas secretorias y agua. La inflamación de los hepatocitos puede comprometer de forma adicional la oxigenación de dichas células en la zona perivenosa y también puede estimular la síntesis de colágeno. En el hígado de la rata después de la ingestión prolongada de alcohol, aumenta el consumo de oxígeno y se induce un estado hipermetabólico. El consumo aumentado de oxígeno, junto con el flujo sanguíneo disminuido en la zona perivenosa del hígado, puede inducir necrosis y fibrosis.⁵³ No obstante, la bebida energizante a pesar de que no muestra un daño severo sobre la conducta enzimática como se vio anteriormente, si presenta una modificación sobre la conducta de función y secreción de ciertas proteínas, lo cual nos sugiere probables cambios citoestructurales. Para evaluar los probables cambios tisulares se utilizaron diferentes tinciones las cuales se relacionaron con el índice de METAVIR. El índice o score de METAVIR, propuesto por un grupo francés, define el grado de fibrosis y el grado de necroinflamación asociada a un daño hepático crónico por la evaluación

histopatológica en una biopsia. El índice de METAVIR es uno de los sistemas más ampliamente aceptados.⁶⁹

Con ayuda de la tinción de H&E, se logró observar zonas que presentaron necrosis fragmentada, la cual se refiere a los tractos portales con extensión a las regiones periportales adyacentes, además de necrosis lobular (parénquima hepático). Estos patrones de inflamación están probablemente relacionados con las diferentes vías por las cuales las células inflamatorias circulantes pueden acceder al hepatocito, es decir, las células inflamatorias migran a través del endotelio de los vasos portales pasan al tejido conectivo portal, sitio rico en células dendríticas que presentan antígenos o migran a través del endotelio de los sinusoides hepático, teniendo acceso directo al parénquima hepático. Un infiltrado inflamatorio predominantemente portal es una de las características histológicas de la hepatitis crónica.⁶⁹

El propósito principal en la identificación de diferentes patrones de actividad necro-inflamatoria es que estos pueden indicar diferencias en el estado funcional y pronóstico en términos de progresión a la fibrosis y, finalmente, cirrosis. Nuestros resultados muestran una actividad moderada en el grupo con consumo de alcohol ya que se observó la presencia de necrosis confluyente, la cual se caracteriza por ser un área que cubre el espacio ocupado por cuatro a cinco hepatocitos, además infiltrado inflamatorio leucocitario principalmente dado por neutrófilos que rodean a los hepatocitos necrosándolos, sin embargo, también están presentes células mononucleares, probablemente ejerciendo actividad inflamatoria, adicionalmente la observación de necrosis lítica la cual observa un colapso completo del trama reticular con un citoplasma de aspecto pálido. La actividad en el grupo con la BE fue catalogada como leve, ya que solo se observó necrosis confluyente. Sin embargo, la actividad del grupo tratado con la combinación obtuvo un puntaje de 3, es decir, un daño grave, esto seguramente es por el consumo de alcohol y la bebida energizante la cual exacerba un ambiente de estrés, lo que presentó un mayor acúmulo de nódulos de infiltrado inflamatorio debido al derrame celular en el medio ambiente extracelular que provoca la necrosis, donde se observa claramente el hinchamiento de las células acompañado de la formación de “ampollas” de la membrana y ruptura

celular, lo cual nos indica la necrosis lítica. Seguido de la observación de varios focos de 3-5 hepatocitos lo que indica la necrosis confluyente. Por lo que el alcohol muestra evidencia de daño no solo funcionalmente sino estructuralmente debido a la necroinflamación que se está presentando.

Por otro lado, por medio de la tinción Tricromica de Masson la cual evidencia fibras de colágeno, se determinó la formación de fibrosis que es definida como la acumulación progresiva de fibras de colágeno en el parénquima hepático, y en el que intervienen de manera activa diversos tipos celulares y citocinas profibrogénicas la cual se localiza alrededor del área portal. Con base al score de METAVIR, se observa que el grupo con alcohol y la combinación nuevamente resaltan en este score, debido a que el puntaje que obtuvieron se clasifica en F2, lo que significa que existe la presencia de fibras de colágeno en el área portal con la formación de algunos septos. Las células estelares hepáticas activadas se consideran la principal fuente de matriz extracelular durante la fibrosis y son la primera población celular fibrogénica identificada. Las células estelares quiescentes son residentes en el hígado y están localizadas en el espacio perisinusoidal, entre las células endoteliales y los hepatocitos. En respuesta a un daño agudo o una agresión crónica, una red compleja de señales autocrinas/paracrinas fibrogénicas promueve la transdiferenciación de estas células quiescentes a un fenotipo miofibroblástico caracterizado por la expresión de α -actina de músculo y la pérdida de retinoides y gotas lipídicas, y la expresión de novo de receptores para factores fibrogénicos, quimiotácticos y mitogénicos. El factor de crecimiento transformante β (TGF- β) y el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) son dos de los factores de crecimiento más importantes que contribuyen a la activación y proliferación de las células estelares. Además muchas otras citocinas, vías de señalización intracelular y factores de transcripción están involucrados en el proceso.^{5,70}

Por otro lado, los fibroblastos portales se diferencian de los miofibroblastos y juegan un papel importante en el proceso fibrogénico en enfermedades hepáticas biliares y colestásicas. Contribuyen también a la formación de los septos fibróticos originados desde los tractos portales en otras enfermedades hepáticas crónicas. Las células

estelares activadas y los miofibroblastos portales activados expresan algunos marcadores comunes, pero se ha visto que el perfil genético puede diferenciar a las dos poblaciones por marcadores específicos, como interleucina (IL) 6, elastina, Thy-1 y cofilina para los miofibroblastos portales y desmina, reelina, proteasa P100, citoglobina, α 2-macroglobina y sinaptofisina en el caso de las células estelares activadas. La activación de los macrófagos residentes del hígado o células de Kupffer contribuye a la activación de las células estelares, principalmente por la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS). En fases avanzadas, las bandas de colágeno son muy evidentes y unen varios espacios porta, que se denominan puentes de fibrosis.⁷⁰ Sin embargo, el grupo tratado con la bebida no presentó ningún indicio de fibrosis, ya que no se observó formación de fibrillas.⁷⁰

El daño se ha asociado con un incremento del acetaldehído derivado del catabolismo del alcohol, el cual es un factor que modifica químicamente los fosfolípidos de membrana, proteínas, glutatión y los componentes del citoesqueleto. El daño al citoesqueleto puede contribuir a la inhibición de la secreción hepática de proteínas y además puede ocasionar la inflamación del hepatocito. El transporte anormal de proteínas a través del aparato de Golgi puede alterar también las propiedades, por ejemplo, el grado de glucosilación; y la función de las proteínas destinadas a ser incorporadas a la membrana plasmática.⁵³ Por lo que también se determinó la glicación, haciendo la cuantificación de las células positivas para PAS, ya que esta tinción nos ayuda a el reconocimiento de polisacáridos en tejidos, tanto glucógeno como mucopolisacaridos.

La glicación implica una reacción en la cual los azúcares (glucosa en general, pero no exclusivamente), reaccionan no-enzimáticamente con las proteínas (y en menor grado lípidos). La glicación produce diferentes modificaciones en las proteínas y sus efectos sobre estas también pueden ser variados: insolubilidad, resistencia a las enzimas de degradación, no reconocimiento por los receptores habituales y generación de autoinmunidad, entre otros.⁷¹

Los resultados muestran una disminución significativa en la glicación del grupo alcohol, lo cual puede estar en relación a un desequilibrio redox (NAD^+/NADH) por la

oxidación del etanol lo que provoca hipoglucemia por inhibición de la gluconeogénesis y por tanto hay un consumo de los depósitos de glucógeno, como lo han mostrado diversos estudios. 14 Por el contrario hubo un aumento significativo en el grupo de bebida energizante, se cree que es debido a los ingredientes de este tipo de bebidas los cuales contiene carbohidratos como glucosa, glucorolactona, fructosa en algunos casos, entre otros.⁷² El consumo crónico de estas bebidas incrementa la disponibilidad de azúcares, cualquier azúcar que posea un grupo carbonilo libre puede reaccionar con los grupos amino primarios de las proteínas para formar bases de Schiff. De hecho, los azúcares fosfato, que son azúcares reductores de gran importancia en el interior celular, poseen mayor capacidad glucosilante que la glucosa dada su mayor proporción de forma carbonílica. Debe ser señalado que la fructosa es extremadamente potente como agente de glucosilación, superando ampliamente a la glucosa.^{71,72} Por otro lado, la combinación se mantuvo en un estatus normal de producción de glicación comparado con el control, se cree que es debido al equilibrio que puede existir entre los efectos del alcohol y las bebidas.

Con base a los estudios realizados, la evidencia proteica e histológica observada en el consumo crónico de alcohol y bebidas energizantes durante 60 días provocó un daño tisular. En los grupos problema tratados con alcohol y su combinación fueron más evidentes dichas modificaciones en comparación con el grupo de bebida energizante. Sin embargo, serológicamente solo tuvo cambio significativo el grupo con consumo con alcohol. El daño tisular, provocado por la inflamación aunado al estrés oxidativo puede posteriormente llevar a un daño más agresivo provocado por el estímulo persistente, ya que al sufrir inflamación los hepatocitos pueden tomar varias vías de señalización, incluso llevando al desarrollo de lesiones más graves como cáncer.

Por lo que el hígado respondiendo a este proceso inflamatorio puede tomar dos rutas, la adaptación donde puede proliferar o hipertrofiarse, o en definitiva tomar vías que conduzcan a la muerte celular. En el consumo crónico de alcohol, uno de los mecanismos ampliamente descritos es el sistema citocromo P450, el cual se

encuentra localizado predominantemente en el retículo endoplásmico, también contribuye a la oxidación del alcohol en el hígado, la CYP2E1 inducida por el consumo crónico de alcohol, tiene un papel importante en el metabolismo del etanol a acetaldehído, además de catalizar la producción de especies reactivas de oxígeno que lleva a estrés oxidativo, que intervienen en la peroxidación lipídica de las membranas microsomales. El incremento de NADH mitocondrial en los hepatocitos debido al metabolismo de acetaldehído contribuye a la saturación de la NADH deshidrogenasa. La inducción de la actividad de ADH y de la CYP2E1 produce un incremento del consumo de oxígeno que lleva a hipoxia centrolobulillar, promoviendo de igual forma el estrés oxidativo. Esta depleción causa una reducción en la síntesis de glutatión (GSH), el glutatión es un antioxidante celular.⁷³

Por otro lado, el TNF- α ha sido considerado tradicionalmente una citocina clave, tiene acción en la mitocondria lo que induce apoptosis en hepatocitos por activación de diferentes vías. Este efecto es principalmente mediado por el receptor 1 de TNF, la unión de TNF- α al TNFR-1 lleva al reclutamiento de varias proteínas adaptadoras que activan la cascada de quinasas (JUNK) desencadenando la proliferación celular.⁷³ El TNF- α también activa la caspasa 8, la cual cliva la proteína citosólica Bid, un miembro de las proteínas relacionadas con Bcl-2. Esta forma truncada de Bid es redistribuida a las membranas mitocondriales y permite la liberación de factores mitocondriales que incluyen citocromo c oxidasa, que activa caspasa 3 y finalmente ocasiona la muerte celular por apoptosis. Además, los ROS contribuyen a la activación de factores de transcripción sensibles a oxidantes como en NF- κ B, necesarios para la síntesis de factores de supervivencia celular que protegen a la mitocondria. De tal manera, que los hepatocitos responden a la acción de TNF- α a través de la modulación de señales que pueden llevar a apoptosis y necrosis, así como también a señales que promueven la supervivencia y proliferación celular. El efecto nocivo de TNF- α puede ser incrementados a nivel hepático por la depleción mitocondrial de GSH y por el incremento de la lipoperoxidación, ocurriendo como consecuencia la apoptosis de los hepatocitos dañados por el alcohol, sin embargo, los hepatocitos parecen ser resistentes a la acción pro-apoptótica del TNF- α por un mecanismo mediado por la acción anti-apoptótica de NF- κ -B.^{5,73}

Cuando los hepatocitos responden promoviendo la supervivencia y proliferación celular, se encuentra una proteína llamada alfafetoproteína (AFP) la cual pertenece a la familia de los albuminoides, y es sintetizada en el hígado en concentraciones normales casi indetectables séricamente, el mecanismo por el cual esta proteína es inducida en la regulación del crecimiento sigue siendo investigada, Mizejewski G. informó que la AFP podría estar implicada en la interacción proteína-proteína en el curso de las cascadas de señalización citoplásmica, Por lo tanto, es concebible que la AFP podría interactuar con receptores, proteínas de unión, factores de transcripción, quinasas, coactivadores y reguladores del ciclo celular en el citoplasma antes de su translocación nuclear. Además otra hipótesis es que la AFP y/o sus péptidos derivados podrían modular el crecimiento celular mediante la interrupción de la transducción de la señal acoplada a los receptores de la proteína G en un proceso denominado "desensibilización agonista". A diferencia de la señalización citoplásmica discutida anteriormente, esta cascada de señalización se produce en la membrana celular. Después de la unión a los receptores acoplados a proteína G de la superficie de la célula, se generan receptosomas endocitados con clatrina. La vía endocítica de clatrina atrae a una proteína adaptadora asociada a la proteína G denominada arrestina y dinamina.⁷⁴

Así mismo, otra de las posibles funciones de la AFP es sobre los procesos de inflamación y el estrés oxidativo en el hígado ya que está clasificada dentro de las proteínas de fase aguda, pero en la actualidad se utiliza como un marcador tumoral, sin embargo, tiene diferentes propiedades las cuales nos hace pensar que podría servir no solo como indicativo de un daño grave irreversible, sino cuando existe un daño menos severo, en este trabajo se evaluó la alfafetoproteína. Esta es una proteína que corre en la electroforesis en la fracción de las alfa 1, estudios anteriores describen esta proteína como una proteína oncofetal donde se ve incrementada en diferentes carcinomas principalmente del hígado, sin embargo, las funciones de esta proteína se siguen investigando, ya que algunos autores le confieren propiedades de transporte, actividad inmunosupresora, reguladora del crecimiento mediante varios mecanismos, como la regulación apoptótica, estimulación de la proliferación y diferenciación de distintos tipos celulares.⁷⁵

En la última década, las propiedades reguladoras del crecimiento de AFP han despertado interés como resultado de estudios que implican el crecimiento ontogénica y oncogénica en modelos de cultivo de células y animales. Esto sugiere que la AFP no es simplemente una forma fetal de proteína transportadora de ligandos y un marcador para el cáncer, así como en trastornos fetales. Sin embargo, podría ser considerado como un factor potencial asociado con la regulación del crecimiento, la diferenciación, la regeneración, la apoptosis y transformación en ambos procesos de crecimiento ontogénicos y oncogénicos,^{74,76} por lo que nosotros medimos la concentración de alfafetoproteína en suero y en tejido, los resultados obtenidos muestran un incremento significativo en los tres grupos (alcohol, BE y A+BE) tanto en suero como en tejido, lo que sugieren estos resultados y correlacionando los anteriores, podemos deducir, que la concentración de AFP es un indicador no oncogénico en hígado, ya que como se pudo observar en la histología, el tejido presenta focos de necro inflamación asociados al consumo de alcohol, bebida energizante y su combinación pero sin llegar a la formación de nódulos o fibrosis sin formación de septos largos colagenoides y de puentes de la misma estirpe.

Por otro lado, además de la cuantificación por ELISA se realizó una inmunohistoquímica para AFP para mostrar la evidencia histológica, donde se muestra la correlación entre la cuantificación expresada y el marcaje del anticuerpo de la proteína que se encuentra ubicada en el citoplasma de los hepatocitos. Dado que existe una dinámica celular en los hepatocitos asociados a cambios de vías de adaptación, donde el incremento de AFP se ve vinculado a estos procesos, ya que el hígado como órgano regenerativo realiza procesos de proliferación adaptativa como mecanismos de adaptación, sobre procesos de muerte celular. En condiciones basales los hepatocitos permanecen en estado “quiescente” o fase G0 (G cero) del ciclo celular, pero, a diferencia de otros tejidos, mantienen la capacidad de reiniciar el ciclo celular ante cualquier lesión, pérdida de tejido hepático o a estímulos exógenos (factores de crecimiento, mitógenos).⁵

Para asegurar que el incremento de AFP fuese una consecuencia neoplásica maligna, sino por el efecto hiperplásico benigno compensatorio, se llevó a cabo la inmunohistoquímica para Ki 67, esta proteína es antígeno nuclear que se encuentra en las células mitóticas en fase G1, S, G2, M del ciclo celular. Los resultados obtenidos muestran un incremento de células positivas para el grupo alcohol y la combinación significativamente, sin embargo, a pesar de esta positividad en estos grupos la morfología del tejido no muestran nódulos compuestos por células con diferenciación hepatocelular, con densidad celular aumentada, trabeculación doble o triple, acinos, eosinofilia o basofilia aumentadas lo cual se presenta en un hepatocarcinoma, esto nos permite diferir que esta positividad que presentan los grupos, solo es debido a que el tejido hepático se encuentra en regeneración y proliferación, sin embargo, si se sigue presentando el estímulo (consumo de alcohol y su combinación) pudiera llevar a la formación de nódulos focalizados por la formación de cicatrices lo que conlleva a cirrosis y en casos más graves a una neoplasia maligna incluso llevando a la metástasis. Por otro lado, el grupo tratado con bebida energizante mostró una positividad leve y focalizada, por lo que solo hay ciertos puntos en donde existe proliferación celular. Lo que confirma que en dependencia del estímulo el tejido puede modular su dinámica de regeneración / proliferación y por ende su ciclo celular.⁷⁷

11. CONCLUSIÓN

1. Al valorar el panel de daño hepático el grupo expuesto a alcohol incrementó la actividad sérica de ALAT y ASAT, dando evidencias de daño hepático. Mientras que las bebidas energizantes y su combinación con alcohol consumido de manera crónica a pesar de los ingredientes que contienen no mostraron evidencia de daño / lesión hepática.
2. La función proteica hepática por su parte mostró alteraciones importantes ante la exposición crónica a las bebidas y su combinación, incrementando la proteína C reactiva y disminuyendo el fibrinógeno, además de prolongar el tiempo de actividad de protrombina.
3. La evidencia histológica en nuestros grupos problema fue marcada hacia procesos necroinflamatorios. Siendo el más afectado el grupo alcohol debido a la inducción de fibrosis; mientras que los grupos de la bebida energizante y su combinación sólo mostraron necroinflamación de baja intensidad.
4. Se evidenció por primera vez la sobreexpresión de AFP en relación al consumo de bebidas energizantes y su combinación con alcohol como un marcador temprano de inflamación hepática no oncogénico.

12. RECURSOS

12.1 Recursos humanos

pQFB. Nataly Sánchez Rojas

DC. Samuel Treviño Mora

DC. Alfonso Daniel Díaz Fonseca

12.2 Recursos materiales

Guantes, cubrebocas, balanza, jeringas de 1mL, y agujas de insulina, jaulas, bebederos tubos eppendorf, gradilla, campana de extracción.

1. Reactivos de TP, albumina, proteína C reactiva, alfafetoproteína, bilirrubinas y transaminasas
2. Micropipetas de 25, 50, 100, 10 y 1000 μ L
3. Baño María KIT LAB Modelo:BK49D
4. Espectrofotómetro (AUTOKEM II)
5. Centrifuga Kitlab Modelo:CK-18
6. Agitador Vortex Kitlab Modelo:BK49-D
7. Coatron M2

12.3 Recursos financieros

Los recursos financieros serán aportados por el tesista y los directores de tesis.

13. Bibliografía

1. López F. *Anatomía y fisiología del hígado*. In: Torres E, Francis J, Sahagún F, Stalnikowitz D. eds. *Gastroenterología*. New York, NY: McGraw-Hill; 2015.<http://accessmedicina.mhmedical.com/content.aspx?bookid=1475&Sectionid=101524350>. Accessed octubre 17, 2016.
2. Wojciech Pawlina. *Histología. Texto y atlas color con biología celular y molecular*. 5ª. ed. México: Médica Panamericana; 2007.
3. Khalili M, Burman B. Enfermedad del hígado. In: Hammer GD, McPhee SJ. eds. *Fisiopatología de la enfermedad, 7e*. New York, NY: McGraw-Hill; 2015.<http://accessmedicina.mhmedical.com/content.aspx?bookid=1584&Sectionid=103056630>. Accessed octubre 17, 2016.
4. Guyton Hall *Tratado de fisiología médica*. 10ª. e. México: Mc Graw Hill; 2001.
5. Satdarshan M. *Molecular pathology of liver diseases*. New York: Springer 2011
6. Tresguerres JA, Ruiz C, Cachofeiro V, Cardinali DP, Escriche E, Gil-Loyzaga PE, Juliá V, Teruel F, Pardo M, Menéndez J. eds. *Fisiología humana, 4e*. New York, NY: McGraw-Hill; 2016. <http://accessmedicina.mhmedical.com/content.aspx?bookid=1858&Sectionid=134368703>. Accessed octubre 17, 2016.
7. Segarra E. *Fisiología de los aparatos y sistemas*. Universidad de Cuenca; 2006
8. Fernández E., Moreno I., y cols. *Aproximación al diagnóstico de enfermedades hepáticas por el laboratorio clínico*. Medicina & laboratorio, 2008; Vol. 14:533-546
9. Martínez-Subiela *Proteínas de fase aguda: conceptos básicos y principales aplicaciones clínicas en medicina veterinaria* An. Vet. (Murcia) 17: 97-114 2001
10. Kushner I. Acute phase reactants Julio, 2015 https://www.bibliocatalogo.buap.mx:3715/contents/acute-phase-reactants?source=search_result&search=reactantes%20de%20fase%20aguda&selectedTitle=1~150

11. Iglesias I., Padilla D., Dorta A., Junco R., Agüera P., y cols. *Reactantes de fase aguda en reumatología*. Revista Cubana de Reumatología, 2014; vol. 15: 59-62
12. Guibarra Escobar Víctor Hugo, Lliulli Morante Yamir. *Proteínas de fase aguda*. Rev. Act. Clin. Med [revista en la Internet]. [citado 2016 Oct 21]. Disponible en:
http://www.revistasbolivianas.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2304-37682011001000008&lng=es
13. Nilson a. y cols. Introducción a los marcadores tumorales séricos Vol. 13, núm. 3, 2016 Disponible en: <http://www.medigraphic.com/pdfs/medsur/ms-2006/ms063a.pdf>
14. Gerald J. Mizejewski *Alpha-fetoprotein structure and function: Relevance to isoforms, epitopes, and conformational Variants* Exp Biol Med 2001 226: 377
15. Cienfuegos J. y cols *Regeneración hepática; el secreto mejor guardado. Una forma de respuesta al daño tisular*. Rev Esp Enferm Dig Madrid Vol. 106, N.º 3, pp. 171-194, 2014
16. Ribera M., Villar M., *Factores de riesgo para el consumo de alcohol en escolares de 10 a 18 años, de establecimientos educativos fiscales en la ciudad de la Paz - Bolivia (2003 - 2004)*. Rev Latino Enfermagem 2005; vol 13
17. Roldán J., Frauca C., Dueñas A. *Intoxicación por alcoholes* ANALES Sis San Navarra 200; Vol. 26 (129-139)
18. Comisión Nacional Contra las Adicciones. *Análisis del Consumo de Sustancias en México*. Secretaria de salud. 2012 disponible en :
http://www.conadic.salud.gob.mx/pdfs/informe_alcohol.pdf
19. Organización Mundial de la Salud. Enero 2015 disponible en:
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs349/es/>
20. Pérez Barqueros SA. *El vodka: origen, tipo y proceso de elaboración* España 2016
21. Con alcohol 2010 Disponible en: <http://www.conalcohol.com/vodka-marcas>

22. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2012. *Consumo de alcohol en México, 2000-2012: estrategias mundiales para reducir su uso nocivo*. disponible en: <http://ensanut.insp.mx/doctos/analiticos/ConsumoAlcohol.pdf>
23. Schuckit MA. Etanol y metanol. In: Brunton LL, Chabner BA, Knollmann BC. eds. *Goodman & Gilman: Las bases farmacológicas de la terapéutica*, 12e. New York, NY: McGraw-Hill; 2016. <http://accessmedicina.mhmedical.com/content.aspx?bookid=1882&Sectionid=138610721>. Accessed octubre 31, 2016.
24. Centro de información toxicológica de Veracruz *Guía de diagnóstico y tratamiento de intoxicación por alcohol etílico o etanol*. Secretaria de Salud del Estado de Veracruz 2013
25. Trevor AJ. Alcoholes. In: Katzung BG, Trevor AJ. eds. *Farmacología básica y clínica*, 13e. New York, NY: McGraw-Hill; 2016. <http://accessmedicina.mhmedical.com/content.aspx?bookid=1832&Sectionid=126877609>. Accessed octubre 31, 2016.
26. Pérez M., Castellano G. *Hígado y alcohol*. Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid; 2010 Disponible en: https://www.aegastro.es/sites/default/files/archivos/ayudas-practicas/55_Higado_y_alcohol.pdf
27. Torres Magdalena Mora. Intoxicación alcohólica. *Med. leg. Costa Rica* [Internet]. 2016 Dec [cited 2016 Nov 02]; 33(2): 66-76. Available from: http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1409-00152016000200066&lng=en
28. Castellanos R., et cols. *Efectos fisiológicos de las bebidas energizantes* *Rev. Fac. Cienc. Méd.* Junio; 2006
29. Cote M., et cols. *Bebidas energizantes: ¿Hidratantes o estimulantes?* *Rev Fac Med.* 2011; 59:255- 266.
30. Melgarejo M. *El verdadero poder de las bebidas energéticas*. *Revista Enfoque Alimentación* N° 6 Diciembre 2004 disponible en: <http://www.oxygensportclub.com/articulo%20red%20bull.pdf>

31. Chávez Tapia NC, Méndez-Sánchez N, Uribe M. Fisiología hepática. In: Méndez-Sánchez N, Esquivel M. eds. *Gastroenterología, 2e*. New York, NY: McGraw-Hill; 2015. <http://accessmedicina.mhmedical.com/content.aspx?bookid=1480&Sectionid=92816962>. Accessed noviembre 05, 2016
32. Álvarez García Y, Pardo Lozano R, Barral Tafalla D, Farré Albaladejo M, Cafeína: un nutriente, un fármaco, o una droga de abuso. *Adicciones* 2007;19:225-238. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=289122084002>. Fecha de consulta: 5 de noviembre de 2016.
33. Ghany M, Hoofnagle JH. *Estudio del paciente con enfermedad hepática*. In: Longo DL, Kasper DL, Jameson J, Fauci AS, Hauser SL, Loscalzo J. eds. *Harrison. Principios de Medicina Interna, 18e*. New York, NY: McGraw-Hill; 2015. <http://accessmedicina.mhmedical.com/content.aspx?bookid=1622&Sectionid=101846785>. Accessed octubre 24, 2016.
34. Gonzáles A. *Principios de bioquímica clínica y patología molecular*. Elsevier, España: 2010
35. Calle S. *Determinación analítica de la cafeína en diferentes productos comerciales* Universidad Politécnica de Catalunya Barcelona, 2011
36. Higgins J. and cols Energy Beverages: Content and Safety *Mayo Clin Proc*. November 2010;85(11):1033-1041
37. Chao-Jen Lin, Chun-Ching Chiu, Yi-Chen Chen, Mu-Lin Chen, Tsai-Ching Hsu, and Bor-Show Tzang. *Taurine Attenuates Hepatic Inflammation in Chronic Alcohol-Fed Rats Through Inhibition of TLR4/MyD88 Signaling* *J Med Food* 18 (12) 2015, 1291–1298
38. Associació Catalana de Malalts d' Hepatitis *Fibrosis y cirrosis hepáticas* Barcelona; 2013 disponible en: <http://asscat-hepatitis.org/fibrosis-cirrosis-hepaticas/>

39. Domínguez M., Colmenero J., Ramón B. *Tratamiento de la fibrosis hepática*. Gastroenterología y Hepatología. Elsevier Vol. 32. Núm. 9. España 2009
40. García L., González F. y Moreno R., *Cirrosis hepática*. Medicine 2012; Vol. 11(11):625-33 España
41. Kershenobich D, Gutiérrez Reyes G. *Cirrosis hepática*. In: Torres E, Francis J, Sahagún F, Stalnikowitz D. eds. *Gastroenterología*. New York, NY: McGraw-Hill; 2015. <http://accessmedicina.mhmedical.com/content.aspx?bookid=1475&Sectionid=101524748>. Accessed octubre 24, 2016.
42. Lecuna Aguerrevere Pablo. Hepatocarcinoma. Gen [Internet]. 2009 Dic [citado 2016 Oct 26]; 63 (4): 298-301. Disponible en: http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0016-35032009000400013&lng=es
43. Valencia Mayoral PF, Serrano Bello CA, Diazconti M. Patología del hígado. In: Valencia Mayoral P, Ancer Rodríguez J. eds. *Patología*. New York, NY: McGraw-Hill; 2015. <http://accessmedicina.mhmedical.com/content.aspx?bookid=1493&Sectionid=102871553>. Accessed octubre 26, 2016.
44. Domínguez López A, Canizales Quinteros S, Sánchez Muñoz F. Biología molecular y ciencias genómicas aplicadas a la gastroenterología. In: Méndez-Sánchez N, Esquivel M. eds. *Gastroenterología, 2e*. New York, NY: McGraw-Hill; 2015. <http://accessmedicina.mhmedical.com/content.aspx?bookid=1480&Sectionid=92813546>. Accessed octubre 26, 2016.
45. Cortés L., Montoro M. *Datos de laboratorio: pruebas hepáticas alteradas* Cap. 48 Hígado p 701-722
46. Liangpunsakul S. and cols *Novel serum biomarkers for detection of excessive alcohol use Alcohol Clin Exp Res*. 2015 March; 39(3): 556–565.

47. Ugwuja E., Ugwu N., Nwachi U. *Hematological and biochemical parameters of diabetic rats administered either energy drink alone or energy drink mixed with alcohol*. J Pharm Biomed Sci. 2013 October; 35(35): 1808-1813.
48. Camean A. *Toxicología avanzada* ed. Díaz de Santos S. A España, 1995
49. Ugwuja E. *Biochemical Effects of Energy Drinks Alone or in Combination with Alcohol in Normal Albino Rats* Advanced Pharmaceutical, Nigeria: 2014, 4(1), 69-74.
50. García M., Zurita A. *Transaminasas: Valoración y significación clínica* Gastroenterología, Hepatología y Nutrición Pediátrica SEGHP-AEP pp. 267-275
51. Brandan N., Barrios B. y col. *Enzimas* Universidad Nacional del Nordeste, Facultad de Medicina.
52. Bataller-Sifre Ramón, Guiral-Olivan Victoria, Bataller-Alberola Luis. *New clinical and toxicological scenario of gamma-glutamyltranspeptidase*. Rev. Esp. Enferm. Dig. [Internet]. 2011 Nov [citado 2017 Mayo 29] ; 103(11): 586-590. Disponible en: http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1130-01082011001100006&lng=es. <http://dx.doi.org/10.4321/S1130-01082011001100006>
53. William K. *Medicina interna* 2da edición Ed. Panamericana Argentina:1992
54. Mol tó L. Ballesteros A. *Aumento aislado de transaminasas: aproximación diagnóstica*. Formación activa en pediatría de atención primaria España: 2013, vol. 6, nº 1
55. Conde de la Rosa L., Moshage H., Nieto N. *Estrés oxidativo hepatocitario y hepatopatía alcohólica*. Rev. Esp. Enferm. Dig. [Internet]. 2008 Mar [citado 2017 Mayo 29]; Disponible en: http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1130-01082008000300006&lng=es
56. Khayyat, L. and col. *Histological, Ultrastructural and Physiological Studies on the Effect of Different Kinds of Energy Drinks on the Liver of Wistar albino Rat* Am Sci 2012;8(8):688-697].

57. Michael W King *Metabolismo del etanol* 2015 Disponible en: <https://themedicalbiochemistrypage.org/es/ethanol-metabolism-sp.php>
58. Baraona E, Pikkarainen P., and cols *Acute Effects of Ethanol on Hepatic Protein Synthesis and Secretion in the Rat* *Gastroenterology* 79:104-111, 1980
59. Mashiko Setshedi, Jack R Wands, Suzanne M de la Monte Acetaldehyde adducts in alcoholic liver disease *Oxid Med Cell Longev.* 2010 May-Jun; 3(3): 178–185.
60. Gaw A, Cowan R., and cols. *Bioquímica clínica* 2da edición Ed. ELSEVIER España: 2006
61. Hernández M. *Alteraciones metabólicas en el alcoholismo* *Revista Cubana Aliment Nutr* 1996;10(1)
62. Hernández-Rodríguez S, Gutiérrez-Salinas J, GarcíaOrtiz L, Mondragón-Terán P y col. *Estrés oxidativo y nitrosativo como mecanismo de daño al hepatocito producido por el metabolismo del etanol.* *Med Int Mex* 2014;30:295-308.
63. Pagana K., Pagana T. *Laboratorio clínico. Indicaciones e interpretación de resultados* Ed. Manual Moderno 2015
64. Téllez-Ávila Felix I, Chávez-Tapia Norberto C, Torre-Delgadillo Aldo. Trastornos de coagulación en el cirrótico. *Rev. Invest. Clín.* [revista en la Internet]. 2007 Abr [citado 2017 Mayo 29]; 59(2): 153-160. Disponible en: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-83762007000200010&lng=es
65. Gonzales de Buitrago *Bioquímica Clínica* McGraw – Hill. Madrid 2000
66. García de Lorenzo y Mateos A., Rodríguez Montes J. A.. Hepatotoxicidad en el paciente crítico: El hígado bajo agresión aguda grave. *Nutr. Hosp.* [Internet]. 2008 Mayo [citado 2017 Mayo 29] ; 23(Suppl 2): 19-24. Disponible en: http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0212-16112008000600004&lng=es
67. S. Martínez-Subiela, F. Tecles, M. Parra, J. Cerón *Proteínas de fase aguda: conceptos básicos y principales aplicaciones clínicas en medicina veterinaria* *An. Vet. (murcia)* 17: 97-114 (2001). España

68. Jeejeebhoy K., Phillips M., Bruce-Robertson A., Sodtke u. *The Acute Effect of Ethanol on Albumin, Fibrinogen and Transferrin Synthesis in the Rat* Biochem. J. (1972) 126, 1111-1126
69. Gamal Shiha and Khaled Zalata *Ishak versus METAVIR: Terminology, Convertibility and Correlation with Laboratory Changes in Chronic Hepatitis C* Internal medicine department & pathology department, Mansoura faculty of medicine Egypt
70. Ruiz G., Bucio L., y cols *Mecanismo Celular y Molecular de la Fibrosis Hepática* Instituto Nacional De Ciencias Médicas Y Nutrición Salvador Zubirán 2016
71. Aponte Ramírez Liudmila, Ramírez Zayas Roger, Hernández González Silvia, Somontes Zamora Dariel. *Los procesos de glucosilación no enzimática*. AMC [Internet]. 2009 Dic [citado 2017 Mayo 29] ; 13(6). Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1025-02552009000600020&lng=es
72. Gugliucci A. *Glicación de proteínas: rol protagónico de la hiperglicemia en las complicaciones crónicas de la diabetes mellitus*. Rev Med Uruguay 2000; 16: 58-75
73. Dominguez M. *Hepatitis alcohólica: estratificación pronóstica e identificación de mecanismos patogénicos* Barcelona: 2009 Facultad de medicina.
74. Mizejewski G. *Alpha-fetoprotein Structure and Function: Relevance to Isoforms, Epitopes, and Conformational Variants* Exp Biol Med (Maywood) 2001 226: 377
75. A. A. Terentiev & N. T. Moldogazieva. *Alpha-fetoprotein: a renaissance* Tumor Biol. (2013) 34:2075–2091
76. Meng-Sen Li, Ping-Feng Li, Shi-Peng He, Guo-Guang Du, Gang Li *The promoting molecular mechanism of alpha-fetoprotein on the growth of human hepatoma Bel7402 cell line* World J Gastroenterol. 2002 Jun 15; 8(3): 469–475
77. Colina F., Ibarrola C., y cols *Protocolo y guía para el diagnóstico histopatológico de carcinoma hepatocelular* Revista Española de Patología Vol. 40, n.º 3, 2007

ANEXOS

Anexo N°1

Determinación de la concentración de alfafetoproteína sérica y tisular

Método: inmunoensayo enzimático (ELISA)

Longitud de onda: 450 nm

Pocillos de microtitulación

Se estima que la concentración mínima detectable de AFP por este ensayo es de 2.0ng / mL.

Reactivos:

Pocillos de microtitulación recubiertos con anticuerpo AFP

Tampón cero

Reactivo de la enzima conjugada

Buffer de lavado (50X)

Sustrato TMB

Solución stop (HCl)

Procedimiento:

1. Dispensar 20 μ L de muestra en los pocillos.
2. Dispensar 100 μ L de buffer cero a cada pocillo.
3. Mezclar durante 10 segundos. Sin generar burbujas.
4. Incubar a temperatura ambiente (18-22°C) durante 30 minutos.
5. Después de la incubación sacudir enérgicamente el contenido de los pocillos.
6. Lavar los pocillos 5 veces con solución buffer de lavado.
7. Realizar un golpe de los pocillos contra el papel absorbente para eliminar las gotas residuales.
8. Adicionar 150 μ L de la enzima (AFP) a cada pocillo. Mezclar suavemente durante 5 segundos
9. Incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente.
10. Después de la incubación sacudir enérgicamente el contenido de los pocillos.

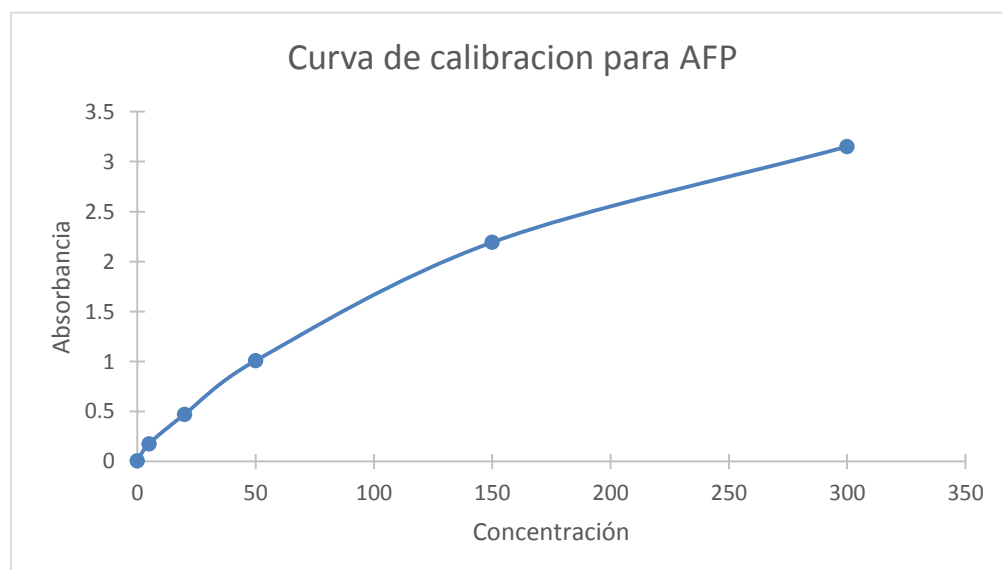
11. Enjuague los pocillos 5 veces con buffer de lavado.
12. Realizar un golpe de los pocillos contra el papel absorbente para eliminar el agua residual.
13. Dispensar 100 μL de sustrato de TMB en cada pocillo y mezclar suavemente por 5 segundos.
14. Incubar a temperatura ambiente por 20 minutos.
15. Detener la reacción añadiendo 100 μL de solución stop (HCl) a cada pocillo.
16. Mezcle suavemente durante 30 segundos para asegurarse de que el color azul cambie completamente a amarillo
17. Leer la absorbancia en 15 minutos.

Cálculos

Leer la absorbancia que da el equipo y con la curva de calibración extrapolar.

Concentración	Absorbancia
0	0.0075
5	0.178
20	0.472
50	1.009
150	2.193
300	3.151

La curva de calibración se realizó con los controles que trae el reactivo.



Anexo N°2

Determinación de la concentración de proteínas totales séricas

Método: colorimétrico (Biuret)

Longitud de onda: 540 (530 -550) nm

Cubeta: 1 cm paso de luz

Temperatura: 37°C / 15-25°C

Rango de medida: Desde el límite de detección de 0.001 g/dL hasta el límite de linealidad de 14 g/dL. Si la concentración de la muestra es superior al límite de linealidad, diluir 1/2 con NaCl 9 g/L y multiplicar el resultado final por 2.

Reactivos:

R Biuret: Potasio sodio tartrato 15 mmol/L

Yoduro sódico 100 mmol/L

Yoduro de potasio 5 mmol/

Sulfato de cobre (II) 5 mmol/L

Hidróxido de sodio 1000 mmol/L

Calibrador PT Patrón primario de Albúmina Bovina 7 g/dL

Procedimiento:

1. Ajustar el espectrofotómetro a cero frente a agua destilada.
2. Pipetear en una tubo de ensaye:

	Blanco	Patrón	Muestra
R (mL)	1	1	1
Patrón (µL)	-	25	-
Muestra (µL)	-	-	25

3. Mezclar e incubar 5 minutos a 37°C o 10 minutos a T ambiente.
4. Verter en una cubeta

5. Leer la absorbancia (A) del Patrón y la muestra, frente al Blanco de reactivo.
El color es estable como mínimo 30 minutos.

Cálculos

La concentración de proteínas totales en la muestra se calcula a partir de la siguiente formula:

$$\frac{(A)\text{Muestra}}{(A)\text{Patrón}} \times 7 (\text{Conc. Patrón}) = \text{g/dL de proteínas totales}$$

Anexo N°3

Determinación de la concentración de albúmina sérica

Método: colorimétrico (Verde bromocresol)

Longitud de onda: 630 (600 -650) nm

Cubeta: 1 cm paso de luz

Temperatura: 37°C / 15-25°C

Rango de medida: Desde el límite de detección de 0.0349 g/dL hasta el límite de linealidad de 6 g/dL. Si la concentración es superior al límite de linealidad, diluir la muestra 1/2 con NaCl 9 g/L y multiplicar el resultado final por 2.

Reactivo:

R Verde bromocresol pH 4.2 (50 mmol/L)

Calibrador albúmina Patrón primario acuoso de Albúmina 5 g/dL

Procedimiento:

1. Ajustar el espectrofotómetro a cero frente a agua destilada.
2. Pipetear en una tubo de ensaye:

	Blanco	Patrón	Muestra
R (mL)	1	1	1
Patrón (µL)	-	5	-
Muestra (µL)	-	-	5

3. Mezclar e incubar 5 minutos a 37°C o 10 minutos a T ambiente.
4. Verter en una cubeta
5. Leer la absorbancia (A) del Patrón y la muestra, frente al Blanco de reactivo.
El color es estable 1 hora a temperatura ambiente

Cálculos

La concentración de albúmina en la muestra se calcula a partir de la siguiente fórmula:

$$\frac{(A)\text{Muestra} - (A)\text{Blanco}}{(A)\text{Patrón} - (A)\text{Blanco}} \times 5 (\text{Conc. Patrón}) = \text{g/dL de albúmina}$$

Factor de conversión: g/dL x 144.9 = μmol/L

Anexo N°4

Determinación de la concentración de bilirrubinas

Método: colorimétrico (Jendrassik-Grof)

Longitud de onda: 540 nm

Cubeta: 1 cm paso de luz

Temperatura: 15-25°C

Rango de medida: Desde el límite de detección de (T) 0.0926 mg/dL (D) 0.0453 mg/dL hasta el límite de linealidad de 20 mg/dL (T y D). Si la concentración de la muestra es superior al límite de linealidad, diluir 1/2 con NaCl 9 g/L y multiplicar el resultado final por 2.

Reactivo:

R 1 (D) Ácido sulfanílico 30 mmol/L

Ácido clorhídrico (ClH) 150 mmol/L

R 2 (T) Ácido sulfanílico 30 mmol/L

Ácido clorhídrico (ClH) 50 mmol/L

Dimetilsulfóxido (DMSO) 7 mol/L

R 3 Sodio nitrito 29 mmol/L

Calibrador de bilirrubinas

Procedimiento:

1. Ajustar el espectrofotómetro a cero frente a agua destilada.
2. Pipetear en una tubo de ensaye:

	B. Total	B. Directa	Blanco
R1 (µL)	200	200	200
R2 (gotas)	1	1	-
NaCl 9g/L (mL)	-	2	2
R3 (mL)	2	-	-

Muestra/calibrador(μL)	200	200	200
-------------------------------	-----	-----	-----

3. Mezclar e incubar 5 minutos a 15-25°C.
4. Verter en una cubeta
5. Leer la absorbancia (A) del calibrador y la muestra.

Cálculos

La concentración de bilirrubina en la muestra se calcula a partir de la siguiente formula:

$$\frac{(A)\text{Muestra} - (A)\text{Blanco muestra}}{(A)\text{Calibrador} - (A)\text{Blanco calibrador}} \times \text{Conc, calibrador} = \text{mg/dL de bilirrubina}$$

Factor de conversión: mg/dL x 17.1 = μmol/L

Anexo N°5

Determinación de la concentración de alanina aminotransferasa (ALAT)

Método: cinético UV. IFCC rec. (NADH) líquido

Longitud de onda: 340 nm

Cubeta: 1 cm paso de luz

Temperatura: 25°C / 30°C / 37°C

Rango de medida: Desde el límite de detección 0 U/L hasta el límite de linealidad 400 U/L. Si la concentración de la muestra es superior al límite de linealidad, diluir 1/10 con NaCl 9 g/L y multiplicar el resultado final por 10.

Reactivo:

R 1 Tampón TRIS pH 7.8 (100 mmol/L)

Lactato deshidrogenasa (LDH) 1200 U/L

L-Alanina 500 mmol/L

R 2 Substrato NADH 0.18 mmol/L

α -Cetoglutarato 15 mmol/L

Preparación: Reactivo de trabajo (RT): Mezclar: 1 vol. de (R2) Substrato + 4 vol. (R1) Tampón.

Procedimiento:

1. Ajustar el espectrofotómetro a cero frente a agua destilada o aire.
2. Pipetear en una tubo de ensaye:

RT (mL)	1
Muestra (μ L)	100

3. Mezclar e incubar 1 minuto.
4. Verter en una cubeta

5. Leer la absorbancia (A) inicial de la muestra, poner el cronometro y leer la absorbancia cada minuto durante 3 minutos.
6. Calcular el promedio de las diferencias de absorbancia por minuto ($\Delta A/\text{min}$).

Cálculos

La concentración de ALAT en la muestra se calcula a partir de la siguiente formula:

$$\Delta A/\text{min} \times 1750 = \text{U/L de ALAT}$$

Anexo N°6

Determinación de la concentración de aspartato aminotransferasa (ASAT)

Método: cinético UV . IFCC reac. (NADH) líquido

Longitud de onda: 340 nm

Cubeta: 1 cm paso de luz

Temperatura: 25°C / 30°C / 37°C

Rango de medida: Desde el límite de detección 0 U/L hasta el límite de linealidad 467 U/L. Si la concentración de la muestra es superior al límite de linealidad, diluir 1/10 con NaCl 9 g/L y multiplicar el resultado final por 10.

Reactivos:

R 1 Tampón TRIS pH 7.8 (80 mmol/L)

Lactato deshidrogenasa (LDH) 800 U/L

Malato deshidrogenasa (MDH) 600 U/L

L-Aspartato 200 mmol/L

R 2 Substrato NADH 0.18 mmol/

α -Cetoglutarato L 12 mmol/L

Preparación: Reactivo de trabajo (RT): Mezclar: 1 vol. de (R2) Substrato + 4 vol. (R1) Tampón.

Procedimiento:

1. Ajustar el espectrofotómetro a cero frente a agua destilada o aire.
2. Pipetear en una tubo de ensaye:

RT (mL)	1
Muestra (μL)	100

3. Mezclar e incubar 1 minuto.
4. Verter en una cubeta

5. Leer la absorbancia (A) inicial de la muestra, poner el cronómetro y leer la absorbancia cada minuto durante 3 minutos.
6. Calcular el promedio de las diferencias de absorbancia por minuto ($\Delta A/\text{min}$).

Cálculos

La concentración de ASAT en la muestra se calcula a partir de la siguiente fórmula:

$$\Delta A/\text{min} \times 1750 = \text{U/L de ASAT}$$

Anexo N°7

Determinación de la concentración de gama-glutamyl transferasa (γ -GT)

Método: cinético (Sustrato carboxilado) líquido

Longitud de onda: 405 nm

Cubeta: 1 cm paso de luz

Temperatura: 25°C / 30°C / 37°C

Rango de medida: Desde el límite de detección 2 U/L hasta el límite de linealidad 300 U/L. Si la concentración de la muestra es superior al límite de linealidad, diluir 1/10 con NaCl 9 g/L y multiplicar el resultado final por 10.

Reactivo:

R1 Tampón TRIS pH 8.25 100 mmol/L

R 2 Substrato Glicilglicina 100 mmol/L

L-g-glutamyl-3-carboxi-4-nitroanilida 3 mmol/L

Preparación Reactivo de trabajo (RT) depende de la referencia: Ref: 1001185
Disolver un comprimido de R 2 Substrato en un vial de R 1 Tampón. Tapar y mezclar suavemente hasta disolver su contenido.

Procedimiento:

1. Ajustar el espectrofotómetro a cero frente a agua destilada o aire.
2. Pipetear en una tubo de ensaye:

RT (mL)	1
Muestra (μ L)	100

3. Mezclar e incubar 1 minuto.
4. Verter en una cubeta
5. Leer la absorbancia (A) inicial de la muestra, poner el cronómetro y leer la absorbancia cada minuto durante 3 minutos.

6. Calcular el promedio de las diferencias de absorbancia por minuto ($\Delta A/\text{min}$).

Cálculos

La concentración de α -GT en la muestra se calcula a partir de la siguiente fórmula:

$$\Delta A/\text{min} \times 1190 = \text{U/L de } \alpha\text{-GT}$$

Anexo N°8

Determinación de Proteína C Reactiva

Método: inmunoensayo de fluorescencia

El rango de trabajo es de 2.5 a 300 mg/L y 2.5 mg/L.

Reactivos:

Cartucho de prueba

ID chip

Tampón detector (Anti-PCR marcado con fluorocromo IgG Anti conejo, PBS, suero de albúmina bovina)

Procedimiento:

1. Llenar el capilar con la muestra (suero)
2. Si es necesario limpie el exceso de muestra fuera del capilar usando una toallita de papel.
3. Ensamble el colector de muestra y el tubo.
4. Mezcle por inversión 10 veces o más hasta que la muestra salga del colector.
5. Remueva la tapa del tubo ensamblado. Descarte las primeras dos gotas.
6. Aplique sólo dos gotas de la mezcla dentro del pozo del cartucho.
7. Deje el cartucho a temperatura ambiente por 3 minutos antes meterlo al lector i-chroma
8. Para la lectura insertar el chip correspondiente y dar "Select"
9. Presione nuevamente el botón "Select" del lector ichroma para iniciar con el proceso de lectura. El lector ichroma inmediatamente leerá el cartucho cargado con la muestra.
10. Lea el resultado que se muestra en la pantalla del lector.

EL lector ichroma™ lee automáticamente el resultado, la concentración de PCR está en mg/L.

Anexo N°9

Determinación del tiempo de protrombina (TP)

Método: turbidez (tromboplastina)

Longitud de onda: 450 nm

Temperatura: 37°C

Reactivos:

PT Liofilizado: Tromboplastina de cerebro de conejo, cloruro cálcico, inhibidor de heparina, tampón y conservantes.

Preparación: Reconstituir el contenido de un vial con 2 mL (Ref. 1709223) de agua destilada (Los mL están dados según el número de referencia del reactivo). Tapar el vial y mezclar suavemente hasta disolver su contenido. Evitar la formación de espuma. Mantener 15 min. a temperatura ambiente (aprox. 25°C) agitando suavemente antes de cada uso.

Procedimiento:

1. Encender el quipo y esperar a que alcance la temperatura óptima (37°C)
2. Dejar que se atempere el reactivo de tromboplastina.
3. Después de que la luz indicadora de temperatura esté encendida, colocar 50 μ L del reactivo de tromboplastina en una copa e incubar por 1 minuto, por otro lado en una copa nueva precalentar la muestra.
4. Seleccionar test (PT) y posteriormente la tecla "Optic" para activar.
5. Después de incubar pasar la copa del reactivo en la posición de lectura.
6. Agregar 25 μ L de muestra presionando nuevamente la tecla "Optic".
7. Leer el resultado que se muestra en la pantalla.

Anexo N°10

Determinación de fibrinógeno

Método: turbidez (Clauss)

Longitud de onda: 450 nm

Temperatura: 37°C

Reactivos:

R 1 Trombina bovina □ 100 u NIH/mL

R 2 Tampón Imidazol, azida sódica

R3 Solución Caolín Opcional

Calibradores ref: 1709101 control normal ref: 1709104 control pathologic ref: 1709106

Preparación R1: Reconstituir en 2.0 mL de agua destilada. Tapar y mezclar suavemente hasta disolver su contenido.

Procedimiento:

1. Realizar una dilución 1:10 con buffer salino de imidazol (IBS): 25 µL muestra + 225 µL de buffer.
2. Encender el quipo y esperar a que alcance la temperatura optima (37°C)
3. Después de que la luz indicadora de temperatura esté encendida, colocar 100 µL de la dilución en una copa.
4. Añadir 10 µL de reactivo de solución caolín en la copa con la muestra e incubar por 1 minuto.
5. Seleccionar test (FiB) y posteriormente la tecla “Optic” para activar.
6. Después de incubar pasar la copa en la posición de lectura.
7. Agregar 50 µL de tromboplastina 100 NIH U/mL presionando nuevamente la tecla “Optic”.
8. Leer el resultado que se muestra en la pantalla.

Anexo N°11

Técnica del homogenado del tejido hepático

Se tomó una porción del hígado, se pesó 50mg del tejido y se colocó en un eppendorf manteniendo todo a 4oC ya que hay enzimas y proteínas termolábiles, después se agregó 300µL de Buffer (PBS pH:8) para evitar daño osmótico y se homogenizó con un taladro especial para llevar a cabo mecánicamente la ruptura de las celular.

Posterior a la homogenización mecánica, se centrifugó el líquido de consistencia espesa a 12000 rpm por 10 min para obtener el sobrenadante.

Anexo N°12

Determinación de proteínas totales tisulares

Método: colorimétrico (Bradford)

Longitud de onda: 595nm

Temperatura: 21°C

Cubeta: 1 cm paso de luz

Reactivo:

Azul de Coomassie brillante G250

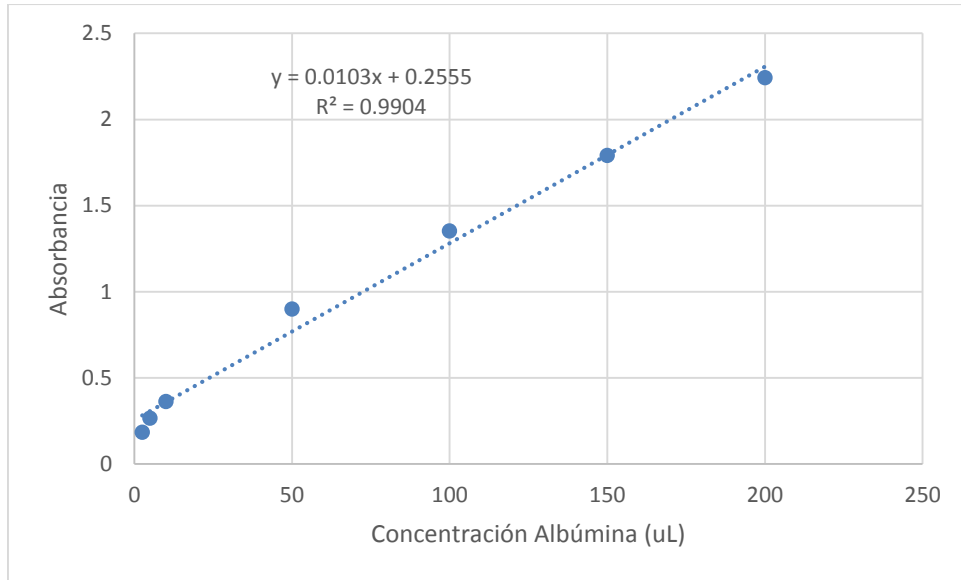
Procedimiento:

1. Colocar 15 μ L de muestra en un tubo de ensaye.
2. Añadir 500 μ L del colorante azul de Coomassie brillante G250 y 485 μ L de agua destilada.
3. Homogenizar e incubar 5 minutos a temperatura ambiente.
4. Pasarlo en una celda y leer la absorbancia.

Cálculos

Realizar una curva de calibración e interpolar el resultado de la muestra en esa curva.

Albúmina (μl)	Absorbancia (Promedio)
2.5	0.183
5	0.266
10	0.362
50	0.899
100	1.352
150	1.792
200	2.242



Anexo N°13

Técnica de deshidratación, embebido y corte de tejidos en parafina

Una vez obtenidos los tejidos en solución de formalina al 4% en PBS 1X, colocar los tejidos en casetes para inclusión, seguir el proceso:

1. PBS 1X durante 45 minutos para limpiar la formalina
2. Alcohol 70% por 1 hora
3. Alcohol 80% por 1 hora
4. Alcohol 96% (1) por 1 hora
5. Alcohol 96% (2) por 1 hora
6. Alcohol 100% (1) por 1 hora
7. Alcohol 100% (2) por 1 hora
8. Alcohol-xilol (1:1) por 1 hora
9. Xilol (1) por 1 hora
10. Xilol (2) por una hora
11. Xilol-parafina (1:1) por 1 hora
12. Parafina (1) por 1 hora
13. Parafina (2) por 1 hora
14. Parafina (3) inclusión

Corte de tejidos

Se obtuvieron 10 bloques de parafina de cada grupo, de los cuales se cortaron 10 laminillas de cada bloque a un espesor de 3 μ m, colocados en laminillas previamente sianilizadas. Se dejaron secar y para después realizar las tinciones e inmunohistoquímicas correspondientes.

Anexo N°14

Tinción hematoxilina-eosina

Método: coloración, afinidad acido-base

- Xilol
- Etanol de 96% y absoluto
- Hematoxilina de Mayer
- Eosina acuosa al 0.2%
- H₂O destilada
- H₂O corriente
- Medio de montaje

Procedimiento:

1. Desparafinar, xilol 2 cambios por 1.5 minuto cada uno
2. Eliminar el alcohol al 96% por 1.5 minuto
3. Hidratar con agua destilada por 1 minuto
4. Hematoxilina de Mayer por 7 minutos
5. Lavar con agua corriente hasta quitar el exceso de colorante
6. Eosina por 30 segundos
7. Lavar con agua destilada para quitar el exceso
8. Alcohol al 96% por 1.5 minutos
9. Alcohol absoluto por 1.5 minutos
10. Carbol-xilol por 1.5 minutos
11. Xilol por 1.5 minutos
12. Montar en resina con ayuda de un cubreobjetos.

Resultados:

- Núcleos: azul oscuro o purpura
- Citoplasma: rosado
- Colágeno: rosa pálido

Anexo N°15

Tinción Tricrómica de Masson

Método: coloración, empleo de tres colorantes

- Xileno
- Etanol de 50°, 70°, 80°, 90°, 96° y 100°
- Hematoxilina férrica de Weigert
- Fucsina escarlata
- Ácido fosfomolibdico al 5 %
- Azul de anilina
- H₂O destilada
- H₂O corriente
- Medio de montaje

Procedimiento

1. Desparafinar con xileno 2 cambios por 5 minutos
2. Alcohol absoluto, 96%, 80%, 50% cada uno 1.5 minutos
3. Agua destilada 1.5 minutos
4. Mordentar en solución de Bouin durante 1 hora en la estufa
5. Lavar con agua corriente hasta quitar el exceso de colorante amarillo
6. Teñir núcleos con hematoxilina de Weigert durante 5 minutos
7. Lavar con agua corriente
8. Solución Bierbich scarlet-fuchsin acida durante 2 minutos
9. Realizar baños con agua destilada
10. Aclarar con solución de ácido fosfotungstico-fosfomolibdico durante 10 minutos
11. Baños con agua destilada
12. Solución azul de anilina por 5 minutos
13. Baños de agua destilada
14. Aclarar con ácido acético glacial por 3 minutos
15. Deshidratar con alcohol al 96% y absoluto

16. Aclarar con xilol

17. Montar en resina con ayuda de un cubreobjetos.

Resultados:

Núcleos: negro

Citoplasma, queratina, fibras musculares e intracelulares: rojo

Colágeno: azul-morado

Anexo N°16

Tinción Acido peryódico de Schiff (PAS)

Método: coloración

- Xileno
- Etanol de 50°, 70°, 80°, 90°, 96° y 100°
- Ácido peryódico al 5 %
- Reactivo de Schiff
- Hematoxilina de Mayer
- H₂O destilada
- Agua corriente
- Medio de montaje

Procedimiento:

1. Desparafinar con xilol 2 cambios por 1.5 minutos
2. Alcohol absoluto, 96%, 80%, 50% cada uno 1.5 minutos
3. Agua destilada 1.5 minutos
4. Oxidar en solución de ácido peryódico 5 minutos
5. Baños con agua destilada
6. Reactivo de Schiff por 15 minutos
7. Lavar con agua corriente
8. Teñir los núcleos con hematoxilina de Harris por un minuto
9. Lavar bien con agua
10. Diferenciar con alcohol acido, baño rápido
11. Lavar con agua de la llave
12. Virar a color azzul con agua moniacal (baños)
13. Lavar con agua corriente
14. Deshidratar con alcohol al 96% y absoluto
15. Aclarar con xilol
16. Montar con resina con ayuda de un cubreobjetos.

Resultados

- Núcleos: azul
- Glucógeno, mucina, hongos, amibas, mucopolisacaridos: margenta

Anexo N°17

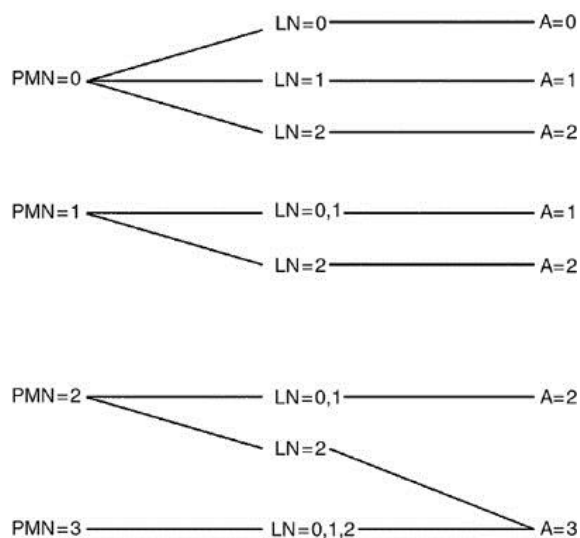
Índice de METAVIR

Para la *actividad necroinflamatoria* se clasifica dependiendo a:

Necrosis fragmentada: que se define de la siguiente manera, 0, ausente; 1, alteración focal de la placa periportal en algunos tractos; 2, alteración difusa de la placa periportal en algunos tractos; 3, alteración difusa de la placa periportal en todos los tractos.

Necrosis lobular focal: se define como 0, menos de un foco necroinflamatorio; 1, al menos un foco necroinflamatorio; 2, múltiples focos necroinflamatorios.

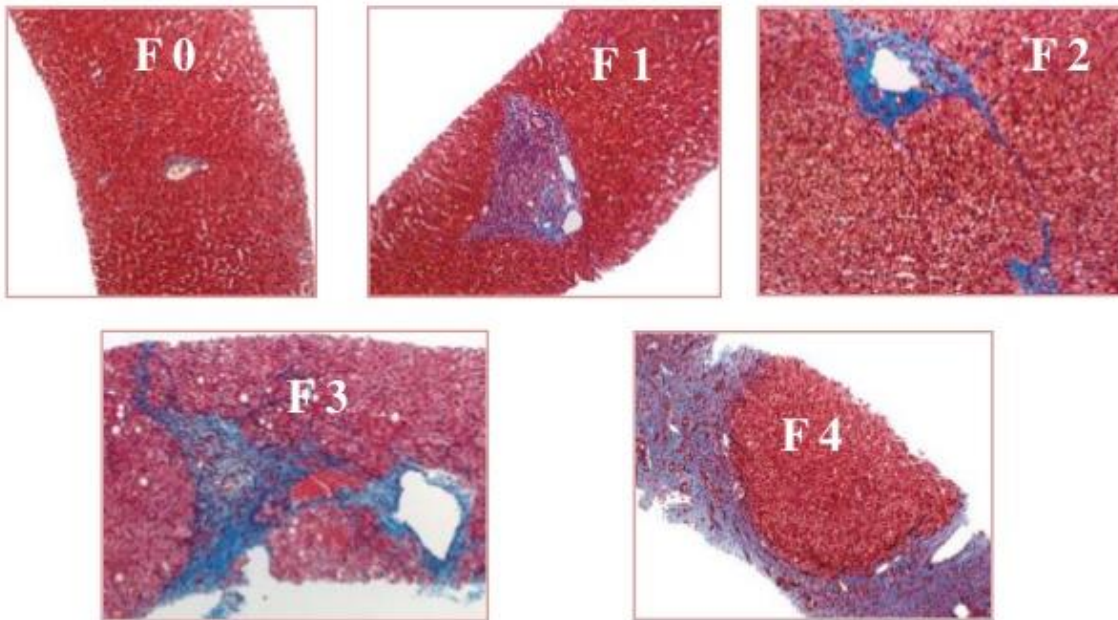
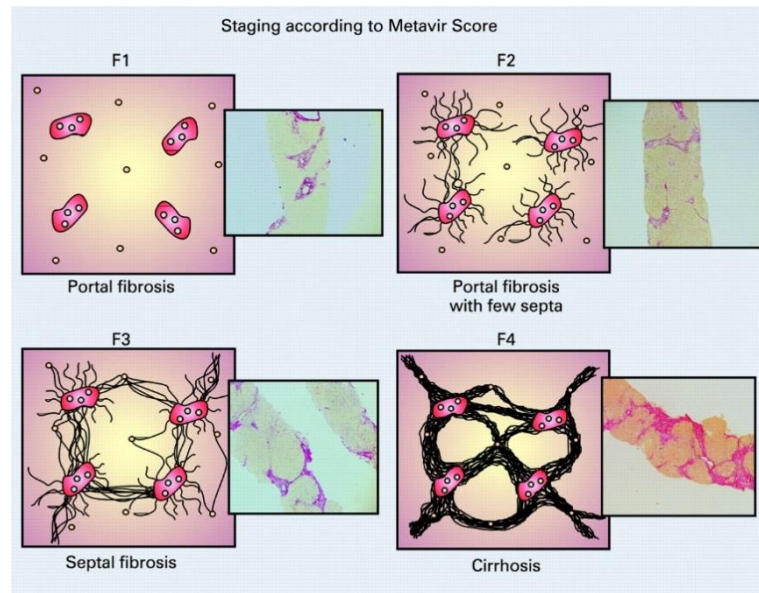
Las puntuaciones obtenidas de estos dos parámetros determina la *daño total o actividad necroinflamatoria*, se define como: 0, sin daño; A1, daño leve; A2, daño moderado, A3; daño grave.



PMN: necrosis fragmentada y LN: necrosis lobular focal.

Para determinar la *fibrosis* por el score de METAVIR se tiñeron las laminillas con Tricrómica de Masson y se observaron a 10X, la clasificación está dada por un puntaje que va de F0-F4, en donde, F0, ausencia de fibrosis; F1, fibrosis portal sin

septos; F2, fibrosis portal con algunos septos; F3, fibrosis en puente (varios septos); F4, cirrosis.



Faria SC et al. RadioGraphics 2009 ; 29 : 1615 – 1635.

Anexo N°18

Técnica de hidratación para Inmunohistoquímicas

Las laminillas con los tejidos se rotularon y se desparafinaron con calor seco en una estufa de 58– 60°C. Enseguida se llevó a cabo la hidratación:

1. Sumergir las muestras en xilol, para quitar el exceso de parafina (5 min)
2. Nuevamente xilol (15 baños)
3. Alcohol 50% - xilol 50% (15 baños)
4. Alcohol absoluto (15 baños)
5. Alcohol absoluto (15 baños)
6. Alcohol al 96% (15 baños)
7. Lavar con agua destilada (3 lavados)

Y se mantuvo en hidratación en buffer de fosfatos (PBS 0.1M).

Anexo N°

Técnica de Inmunohistoquímica

Reactivos:

Tren de deshidratación (Ver anexo 13)

Solución de recuperación antigénica Diva Decloacker Biocare (1:10)

H₂O₂ 0.3%

Albúmina libre de IgG al 2% en SSI

Anticuerpos primario y secundario

Diaminobenzidina (DAB)

Hematoxilina de Harris

Carbonato de Litio 1%

Resina

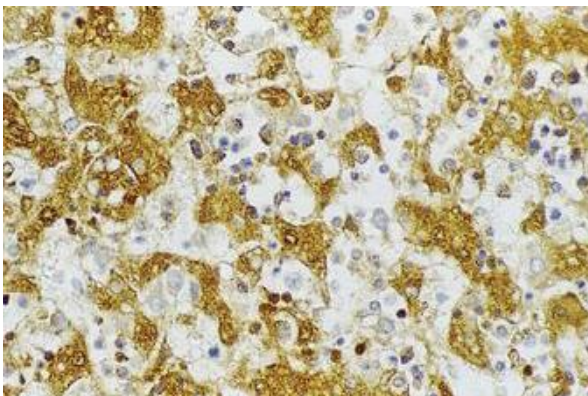
Cloro

Procedimiento:

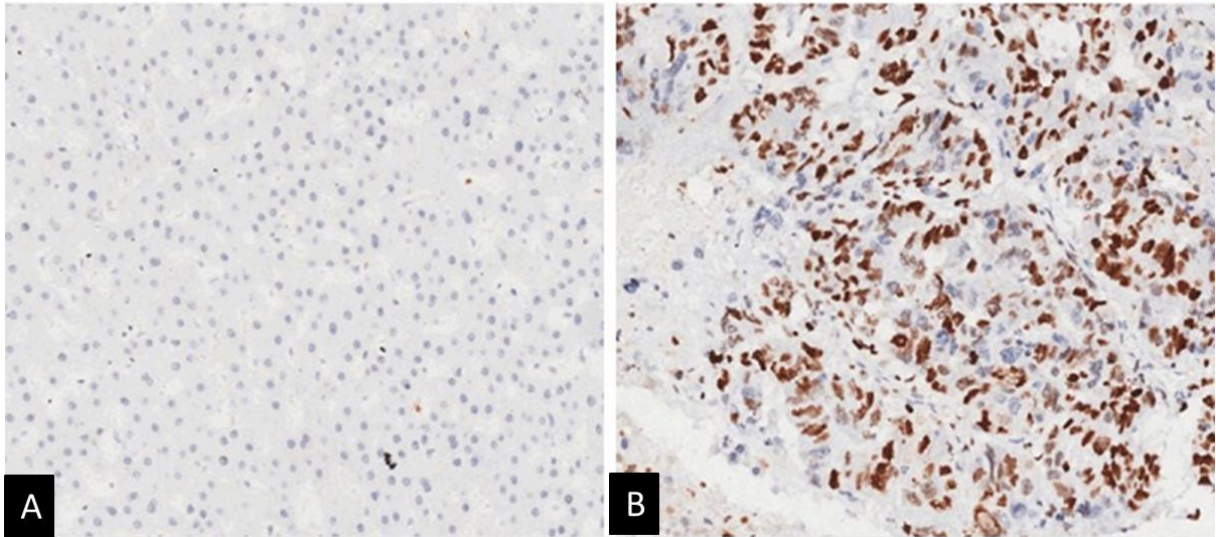
1. Colocar las laminillas por 40 minutos en la estufa a 40°C
2. Desparafinar y deshidratar los tejidos (Ver anexo 13)
3. Poner las laminillas en la solución de recuperación de antígenos durante 40 min a 60°C
4. Dejar enfriar 20 minutos
5. Lavar tres veces con PBS 1X
6. Ubicar las laminillas en la solución de H₂O₂ 0.3% durante 10 minutos para inactivar la peroxidasa endógena.
7. Lavar dos veces con PBS 1X
8. Hacer zonas hidrófobas alrededor de cada tejido en la laminilla con lápiz de parafina (no dejar que los tejidos se sequen)
9. Bloquear con albúmina 2% durante 2 horas (100 µL por laminilla)
10. Lavar 3 veces con PBS 1X

11. Colocar el anticuerpo primario en la dilución establecida por la casa comercial, o por prueba y error y dejar toda la noche. (100 µL por laminilla)
12. Lavar 3 veces con PBS el anticuerpo
13. Colocar el anticuerpo secundario en la dilución establecida durante 2 horas (100 µL por laminilla).
14. Lavar con PBS 1X, 3 veces
15. Revelar con DAB (15-30 segundos)
16. Inactivar la DAB en solución acuosa de cloro
17. Colocar las laminillas en Hematoxilina de Harris 3 minutos
18. Lavar con agua destilada
19. Virar con carbonato de Litio 1%
20. Lavar con agua destilada
21. Regresar las laminillas por el tren de deshidratación en el orden inverso con los mismos tiempos. (Anexo 13)

Montar las laminillas con resina evitando que el xilol se seque, al colocar el cubreobjetos evitar la formación de burbujas.



AFP positiva. Tejido hepático humano Alpha Fetoprotein Novocastra



Inmunohistoquímica para Ki 67. A) Expresión negativa de Ki 67 en tejido canceroso. B) Expresion negativa de Ki 67 en tejido tumoral (hepatocarcinoma). Modificada de Shi, W., Hu, J., Zhu, S., Shen, X., Zhang, X., Yang, C., Zhang, H. (2015). Expression of MTA2 and Ki-67 in hepatocellular carcinoma and their correlation with prognosis.