



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

**INSTITUTO DE CIENCIAS DE LA SALUD
ÁREA ACADÉMICA DE NUTRICIÓN**

**“Efecto hepatoprotector de la glicina y la
sacarosa durante la administración crónica de
etanol en un modelo animal”**

T E S I S

Que para obtener el título de
Licenciada en Nutrición

P R E S E N T A

Denisse Salas Guzmán

Bajo la Dirección de:
Dr. José Antonio Morales González



Pachuca, Hgo., Octubre, 2009

ÍNDICE

1. Resumen	0
Abstract	0
2. Marco teórico	1
2.1 Hígado	1
2.1.1 Células hepáticas	2
2.1.2 Hepatocitos	2
2.1.2.1 Dominios del hepatocito	3
2.1.2.2 Organización del hepatocito	3
2.1.3 Funciones del Hígado	4
2.1.3.1 Detoxificación de toxinas y fármacos	5
2.1.3.2 Metabolismo de carbohidratos	5
2.1.3.3 Metabolismo de proteínas	6
2.1.3.4 Metabolismo de lípidos	7
2.2 Intestino delgado	7
2.2.1 Histología de duodeno	8
2.3 Etanol	10
2.3.1 Aspectos farmacocinéticos	11
2.3.2 Oxidación hepática del etanol	11
2.4 Estrés oxidativo y radicales libres	12
2.5 Daño hepático	15
2.6 Antioxidantes	16
2.6.1 Glicina	17
2.7 Sacarosa	20
3. Problema de investigación	22
4. Justificación	23
5. Hipótesis	23
6. Objetivos	24
6.1 Objetivo general	24

6.2 Objetivos específicos	24
7. Metodología	25
7.1 Animales de experimentación	25
7.1.1 Grupos experimentales	25
7.2 Obtención de muestras	26
7.3 Análisis estadístico	28
7.3 Aspectos éticos	28
7.5 Esquema metodológico	29
8. Resultados	30
8.1 Cuantificación del peso	30
8.2 Cuantificación de la ingesta de etanol	31
8.3 Determinación de glucosa sérica	31
8.4 Determinación de albúmina sérica	32
8.5 Determinación de triacilglicéridos séricos	33
8.6 Determinación de colesterol sérico	34
8.7 Determinación de bilirrubina directa	35
8.8 Determinación de la actividad de la aspartato aminotransferasa	36
8.9 Determinación de la actividad de la alanino aminotransferasa	36
8.10 Evaluación histológica de hígado y duodeno	37
9. Discusión	47
10. Conclusiones	52
11. Referencias	53
12. Anexos	59

Índice de tablas

Tabla 1 Clasificación de los Antioxidantes	16
Tabla 2. Evaluación histológica de hígado y duodeno	46

Índice de anexos

Anexo 1. Determinación cuantitativa de glucosa. SPINREACT	59
Anexo 2. Determinación cuantitativa de albúmina. SPINREACT	60
Anexo 3. Determinación cuantitativa de triacilglicéridos. SPINREACT	61
Anexo 4. Determinación cuantitativa de colesterol. SPINREACT	62
Anexo 5. Determinación cuantitativa de bilirrubina directa. SPINREACT	63
Anexo 6. Determinación cuantitativa de GOT (AST). SPINREACT	64
Anexo 7. Determinación cuantitativa de GPT (ALT). SPINREACT	65

Índice de figuras

Figura 1. Hígado en el ser humano	1
Figura 2: Acino hepático	4
Figura 3. Cuantificación del peso	30
Figura 4. Cuantificación del consumo de etanol	31
Figura 5. Determinación de glucosa sérica	32
Figura 6. Determinación de albúmina sérica	33
Figura 7. Determinación de triacilglicéridos séricos	34
Figura 8. Determinación de colesterol sérico	35
Figura 9. Determinación de bilirrubina directa	35
Figura 10. Determinación de la actividad de la aspartato aminotransferasa	36
Figura 11. Determinación de la actividad de la alanino aminotransferasa	37
Figura 12. Filtrado inflamatorio en tejido hepático	38
Figura 13. Apoptosis en tejido hepático	39

Figura 14. Índice mitótico en tejido hepático	40
Figura 15. Esteatosis en tejido hepático	41
Figura 16. Necrosis en tejido hepático	42
Figura 17. Filtrado inflamatorio en tejido duodenal	43
Figura 18. Índice mitótico en tejido duodenal	44
Figura 19. Apoptosis en tejido duodenal	45

AGRADECIMIENTOS

A Dios por permitirme convertir día a día mis sueños en una maravillosa realidad llena de bendiciones, guiada por su amor y voluntad.

A mi director Dr. José A. Morales González y codirector Dr. Eduardo O. Madrigal Santillán por el apoyo y enseñanzas que hicieron posible este trabajo.

Al cuerpo sinodal Dra. Araceli Ortiz Polo, LN. Martha Patricia Reyes Ramírez, Dra. Mirandeli Bautista Ávila, Dr. Eduardo O. Madrigal Santillán, Dr. José Antonio Morales González, Dra. Alejandra Hernández Ceruelos, M en C. José Ramón Montejano Rodríguez, por sus sugerencias para mejorar el trabajo escrito.

A la Dra. Erika Díaz y al M en C. Mario Nava por la ayuda en técnicas histopatológicas.

A mi familia por el amor y apoyo en todas las etapas de mi vida, y aun más por creer en mí.

A mis amigos por acompañarme cada día de mi vida, duplicando mis alegrías y aminorando las preocupaciones.

Siempre sueña y apunta más alto de lo que sabes que puedes lograr.

William Faulkner

1. RESUMEN

El daño hepático es un proceso patológico por agresión persistente al parénquima hepático, que produce un daño morfológico y/o funcional, describiéndose como inflamación y necrosis que persiste en el tiempo como la causa de fibrosis y regeneración nodular (cirrosis). Este proceso se incrementa con la administración crónica de etanol (EtOH), que ocasiona la formación de radicales libres (RL) como producto secundario del metabolismo. El objetivo de la investigación fue estudiar el efecto hepatoprotector de la glicina (Gly) y de la sacarosa sobre el daño ocasionado por el etanol, se utilizaron ratas Wistar de 330 ± 20 g., agrupadas como sigue (n=3 ratas/grupo): a) control, b) EtOH (1.5 – 2 g/kg peso en solución acuosa 5% v/v), c) EtOH (1.5 – 2 g/kg peso en solución acuosa 5% v/v) + Gly (0.6g/kg), d) EtOH (1.5 – 2 g/kg peso en solución acuosa 5% v/v) + sacarosa (2g. 1:1m/v), e) EtOH (1.5 – 2 g/kg peso en solución acuosa 5% v/v) + Gly + sacarosa (0.6 g/kg + 2g. 1:1 m/v); el EtOH aumenta el peso (403 vs 477 g; $p < 0.05$), así como los niveles séricos de glucosa (104 vs 108 mg/dL; $p < 0.05$), albúmina (4.3 vs 4.7 g/dL; $p < 0.05$), triacilglicéridos (114 vs 180 mg/dL; $p < 0.05$), bilirrubina (1.2 vs 3.9 mg/dL; $p < 0.05$) y alanino aminotransferasa (12 vs 14 UI/ALT; $p < 0.05$) en comparación con el grupo control, estos valores disminuyen en mayor cantidad con la administración de Gly, aunque la administración de sacarosa también disminuye niveles séricos de aspartato aminotrasferasa y colesterol; la histología comprueba el efecto protector al disminuir la inflamación, apoptosis y necrosis en ambos tejidos (hígado e intestino). El tratamiento realizado uniendo glicina y sacarosa no es benéfico para reducir el daño producido por la administración crónica de etanol en una concentración de 5%.

Palabras clave: daño hepático, etanol, glicina, sacarosa

SUMMARY

The liver injury is a pathological process by continuing to attack the liver parenchyma, which produces morphological damage and / or functional, described as inflammation and necrosis that persist over time as the cause of fibrosis and nodular regeneration (cirrhosis). This process increases with chronic administration of ethanol (EtOH), which causes formation of free radicals (RL) as a byproduct of metabolism. The objective of this research was to study the hepatoprotective effect of glycine (Gly) and sucrose on the damage caused by ethanol, we used Wistar rats of 330 ± 20 g, were grouped as follows (n = 3 rats / group) : a) control, b) EtOH (1.5 - 2 g / kg in aqueous solution 5% v / v), c) EtOH (1.5 - 2 g / kg in aqueous solution 5% v / v) + Gly (0.6 g / kg), d) EtOH (1.5 - 2 g / kg in aqueous solution 5% v / v) + sucrose (2g. 1:1 m / v), e) EtOH (1.5 - 2 g / kg solution aqueous 5% v / v) + sucrose + Gly (0.6 g / kg + 2g. 1:1 m / v) EtOH increases the weight (403 vs 477 g, P <0.05) and serum glucose (104 vs 108 mg / dL, p <0.05), albumin (4.3 vs 4.7 g / dL, p <0.05), Triacilglycerides (114 vs 180 mg / dL, p <0.05), bilirubin (1.2 vs 3.9 mg / dL; p 0.05) and alanine aminotransferase (12 vs 14 IU / ALT, P <0.05) compared with the control group, these values decreased to a greater amount to the administration of Gly, although the administration of sucrose also reduced serum levels of aspartate and aminotrasferasa cholesterol; histology tests the protective effect by reducing inflammation, apoptosis and necrosis in both tissues (liver and intestine). The treatment combining glycine and sucrose is beneficial to reduce the damage produced by chronic administration of ethanol at a concentration of 5%.

Keywords: liver damage, ethanol, glycine, sucrose

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Hígado

El hígado es el órgano más grande del cuerpo, localizado en el cuadrante superior derecho, bajo el diafragma y las costillas, se extiende a través del lado izquierdo de la cavidad abdominal encima del borde superior del estómago, acompañado de la vesícula biliar y sus vías ubicadas exactamente debajo del lado derecho del hígado (Figura 1).

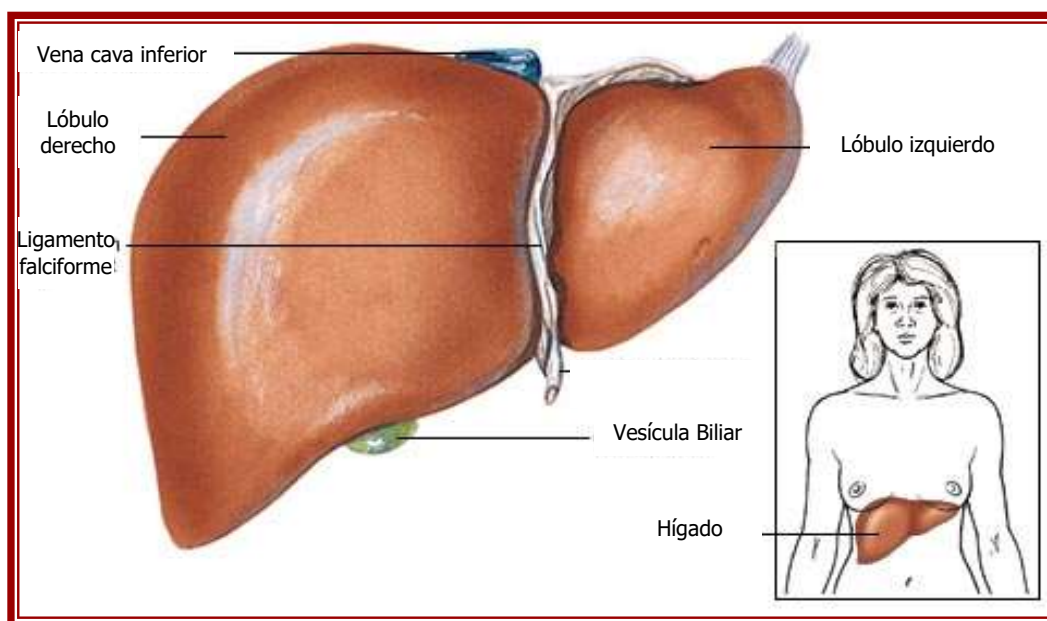


Figura 1. Hígado en el ser humano (Modificada de National Library of Medicine, 2007)

En un cadáver el órgano pesa 1500 g y en el individuo vivo 1900 g aproximadamente, debido a la sangre contenida. Consta de dos lóbulos principales, el derecho y el izquierdo, los que están divididos por un ligamento, llamado falciforme y el ligamento redondo; el lóbulo izquierdo además tiene otros dos pequeños lóbulos: el cuadrado y el caudado (Cortes *et al.*, 2002).

El suministro de sangre del hígado, proviene tanto del corazón como del tracto digestivo en forma directa a través de la vena porta, y presenta irrigación sanguínea doble, pues recibe sangre oxigenada de las arterias hepáticas derecha e izquierda (15%) y sangre rica en nutrientes, nutrientes que a través de la vena porta en ambos vasos entran por el hilio, la sangre sale del hígado por las venas hepáticas, las que drenan en la cava inferior (Fausto, 2000; Morsiani *et al.*, 1998).

2.1.1 Células hepáticas

Los tipos celulares residentes en el hígado (hepatocitos, células de Küpffer, células estrelladas y células endoteliales) interactúan entre sí y con la matriz extracelular; lo que permite mantener la estructura hepática normal y el funcionamiento armónico de las células.

Las células de Küpffer son los macrófagos residentes y se cree que son migratorias ya que no establecen uniones intercelulares con las células vecinas, se relacionan con las células de revestimiento sinusoidal; las células estrelladas (células de Ito) están alrededor del sinusoides y constituyen un tercio de las células no parenquimatosas del hígado, almacenan Vitamina A, en el hígado normal no son proliferativas a diferencia de las células endoteliales que poseen receptores que permiten la endocitosis de sustancias como lipoproteínas de baja densidad (LDL) y ácido hialurónico, además, producen mediadores vasoactivos (endotelina-1) y citocinas (Morland, 1983; Cohen *et al.*, 2005).

2.1.2 Hepatocitos

Los hepatocitos son células poligonales de 20-30 μm de diámetro, se disponen laminarmente, de una o dos células de espesor, según su localización dentro del lobulillo, manifiestan diferentes propiedades estructurales, histoquímicas y bioquímicas; además, no solo hacen contacto entre ellas, sino que bordean un

espacio (Espacio de Disse) y por esto se dice que el mismo hepatocito tiene distintos dominios dentro de su citoplasma, viven alrededor de 150 días (Higgins y Anderson, 1931). Cohen *et al* en el año 2005 demuestra que en roedores la capacidad regenerativa del hígado postdañado (ya sea por fármacos hepatotóxicos o resección hepática) es alrededor de 75%, esta capacidad en humanos es mucho menor.

2.1.2.1 Dominios del hepatocito

a) Dominios laterales: Estos forman los canalículos biliares, que son espacios intercelulares laberínticos (1-2 μ m de diámetro); en esta zona se secreta la bilis, cuya producción se ve aumentada por la presencia de microvellosidades laterales. La bilis ahí producida es conducida hacia la periferia de los lobulillos, esta zona de la membrana plasmática tiene altas concentraciones de Na-K ATPasa y adenilciclasa.

b) Dominios sinusoidales: Es la cara que da hacia el espacio de Disse, también tiene microvellosidades y es rica en receptores manosa 6-P, Na-K ATPasa y adenilciclasa, ya que es aquí en donde el hepatocito hace su descarga endocrina (Moseley, 1996).

2.1.2.2 Organización del hepatocito

Lobulillo hepático clásico: Organizado en torno a una vena central, desde las ramas de la vena porta y arteria hepática ubicadas en la periferia la sangre va a los sinusoides o los diferentes conductos para así poder llegar a la circulación central; el acino hepático es la unidad estructural y funcional del hígado (Figura 2). El hepatocito es un conjunto de células que rodean un dúctulo y pequeñas ramas terminales de la vena porta y de la arteria hepática, es la base para diferenciar las distintas zonas dentro del hígado (zonas de Rappaport):

- La zona uno, representa el área de tejido hepático que rodea en forma inmediata al dúctulo biliar y a las ramas terminales de la vena porta y la arteria hepática, es la que cuenta con más abundancia de oxígeno.
- La zona dos, está formada por el tejido hepático.
- La zona tres, es la capa más externa y es la región que rodea a la vena central, esta es la más deficiente en oxígeno.

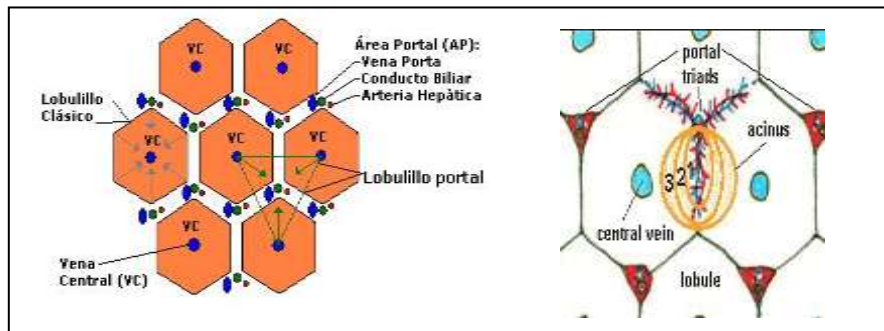


Figura 2: Acino hepático (Modificada de National Library of Medicine, 2007)

2.1.3 Funciones del Hígado

El hígado es un órgano muy versátil que elabora bilis, almacena glucógeno, hierro, cobre, vitamina A y D, así como las vitaminas del complejo B, produce albúmina y otras proteínas, muchas de éstas son esenciales para la coagulación normal de la sangre (protrombina y fibrinógeno) y una sustancia anticoagulante que es la heparina. Debido a la multiplicidad y variabilidad de funciones hepáticas, la medición de estas actividades es complicada, las pruebas de función hepática más usadas son la determinación de la bilirrubina, albúmina y el tiempo de protrombina. El nivel sérico de bilirrubina mide la conjugación y excreción hepática, en cambio el nivel de albúmina y el tiempo de protrombina se relacionan con la síntesis de proteínas (Cohen *et al.*, 2005).

2.1.3.1 Detoxificación de toxinas y fármacos

El hígado depura muchos fármacos, segrega bilirrubina (producto de la degradación de la hemoglobina), y muchas otras sustancias, incluyendo enzimas. El endotelio que tapiza los sinusoides está provisto de poros o fenestraciones que permiten el paso de la mayor parte de las proteínas del plasma hacia el espacio de Disse, de esta forma las moléculas se ponen en contacto directo con la membrana hepatocitaria y pueden difundirse o ser transportadas activamente al interior del hepatocito (Higgins y Anderson, 1931).

En el retículo endoplasmático liso de los hepatocitos existe una enzima llamada oxidasa de acción mixta, esta metila, conjuga u oxida distintos fármacos y toxinas, y de esta forma los inactiva. Cuando se administran por tiempo prolongado distintos fármacos, el retículo endoplásmico liso (REL) se hipertrofia, aumentando sus enzimas oxidantes, muchas veces también son los peroxisomas los que detoxifican (Czachowski *et al.*, 1999).

2.1.3.2 Metabolismo de carbohidratos

Los hepatocitos (a diferencia de las células musculares y adipocitos) son permeables a la glucosa, lo cual facilita sus tareas y por tanto la insulina no tiene efecto en la incorporación de glucosa en este órgano, estos pueden transportar glucosa desde la sangre a su interior y allí almacenarlo como glucógeno, este proceso permite al organismo mantener niveles normales de glucosa en la sangre (euglucemia). Por otra parte, el glucógeno es hidrolizado (glucogenólisis) por los hepatocitos en el caso que los niveles de glucosa disminuyan por debajo de lo normal (hipoglucemia), transportando la glucosa al espacio de Disse (Higgins y Anderson, 1931).

Otro proceso que pueden realizar los hepatocitos es la gluconeogénesis, la cual consiste en sintetizar glucosa a partir de otras fuentes (como aminoácidos) u otros azúcares. Este fenómeno es mediado por la propia concentración de glucosa y por hormonas (glucagon, epinefrina e insulina), consiste en almacenar la glucosa excedente o bien liberarla (Czachowski *et al.*, 1999). Todos los procesos se llevan a cabo mediante la interconversión al metabolito de encrucijada de los carbohidratos, que es la glucosa-6-fosfato (G6P), cuando los niveles de glucosa en sangre son elevados (> 6 mg/dL) el hígado la incorpora y transforma el G6P para almacenarla posteriormente en forma de glucógeno (una de las reservas energéticas de los animales), la cantidad de glucógeno almacenada, solo puede mantener las necesidades de glucosa por alrededor de 6 horas (Cortes *et al.*, 2002).

2.1.3.3 Metabolismo de proteínas

El hígado también degrada aminoácidos (aa), a distintos intermediarios metabólicos. Los intermediarios glucogénicos son transformados a piruvato y otros intermediarios del ciclo de los ácidos tricarboxílicos, por ejemplo; oxaloacetato y por tanto son precursores glucogénicos, por el contrario, los aa cetogénicos, muchos de los cuales también son glucogénicos, son transformados a cuerpos cetónicos (Del Monte *et al.*, 1986).

En el hígado se lleva a cabo el ciclo de la urea, en el cual el cuerpo desecha el excedente de nitrógeno que viene de los aminoácidos y el lactato, producto del metabolismo anaerobio de la glucosa en músculo, que es utilizado en el hígado para la gluconeogénesis, lipogénesis y fosforilación oxidativa. El amoníaco es tóxico para el organismo, este es producto de la acción bacteriana en el tubo digestivo y de la desaminación de aminoácidos realizada por los hepatocitos, también se sabe que el hepatocito es capaz de convertir este amoniaco en urea (Morland *et al.*, 1983).

2.1.3.4 Metabolismo de lípidos

En condiciones de requerimientos energéticos elevados, los triacilglicéridos (TCG) son degradados a Acetil coenzima A (Ac-CoA) que posteriormente es transformado en cuerpos cetónicos; o bien, en la situación contraria, los ácidos grasos se utilizan para sintetizar TG, que son finalmente almacenados en el tejido adiposo como reserva energética (Mudrakova y Kovar, 2007).

Fosfolípidos, colesterol y cuerpos cetónicos son almacenados en los hepatocitos hasta que estos los descargan, este proceso se inicia cuando llegan al hígado los quilomicrones. Los hepatocitos se encargan de degradarlos en ácidos grasos y glicerol, posteriormente los ácidos grasos se usan para sintetizar fosfolípidos y colesterol. El hígado también produce lipoproteínas de muy baja densidad, que se descargan en el espacio de Disse (Mendenhall *et al.*, 1993).

2.2 Intestino delgado

El intestino delgado se extiende desde el orificio pilórico, donde se continúa con el estómago, a la unión ileocecal, donde prosigue con intestino grueso. Mide unos 720 cm de longitud, presenta muchas flexuosidades dentro de la cavidad abdominal y se divide en tres porciones: el *duodeno* de sólo 20 cm de longitud, está relativamente fijo a la pared abdominal posterior, ya que no posee mesenterio en la mayor parte de su longitud y por tanto es retroperitoneal. El resto del intestino delgado se divide en *yeyuno*, que comprende dos quintos de longitud, e *íleon*, que abarca las tres quintas restantes.

Las funciones del intestino delgado son transportar el material alimenticio (quimo) del estómago al intestino grueso, completar la digestión por las glándulas accesorias, absorber los productos finales de la digestión hacia los vasos sanguíneos y linfáticos de su pared, y secretar algunas hormonas. Para desempeñar estas funciones, en particular la absorción y secreción digestiva, el intestino delgado

presentar ciertas especializaciones que aumentan la superficie de submucosa (James, 1964).

Al material alimenticio en la luz del intestino delgado se agregan las secreciones de muchas glándulas. Estas son de tres tipos principales:

1. Glándulas intestinales. Ubicadas en intestino delgado y grueso.
2. Glándulas submucosas. Se localizan en el duodeno, son del tipo tubular compuesto y se denominan glándulas duodenales (de Brunner), suelen ser más extensas en la primera porción del duodeno, cerca del píloro.
3. Glándulas situadas fuera del tubo digestivo, pero que envían sus secreciones hacia la luz de éste por un sistema de conductos. Estas glándulas son el hígado y el páncreas, y ambas liberan sus secreciones exocrinas hacia el duodeno (Lesson *et al.*, 1990).

2.2 Histología de duodeno

Las especializaciones aumentan la superficie e incluyen pliegues circulares, vellosidades que cubren la superficie de éstas, criptas o glándulas intestinales que se originan por un proceso de invaginación de epitelio superficial, y microvellosidades, que son prolongaciones digitiformes de la superficie apical de las células intestinales (Patrick *et al.*, 1974)

Las vellosidades son pequeñas prolongaciones digitiformes o en forma de hoja de la membrana de la mucosa, de 0.5 a 1.5 mm de longitud, que sólo se encuentran en el intestino delgado. Cada una está cubierta de epitelio y tiene un núcleo de lámina propia celular, muchas de cuyas células pertenecen al sistema inmunitario. En el núcleo hay una arteriola y una vénula con una red capilar, y un vaso linfático o quilífero central. Las vellosidades varían en forma y altura, en las diferentes regiones, las del duodeno son estructuras anchas en forma de espátula, se acortan con la distensión y el estado de contracción de las fibras musculares lisas del intestino,

estas prolongaciones por evaginación aumentan la superficie de la mucosa de 5 a 10 veces y representan una población total de unos 4 millones, en proporción de unos 40 por mm² (Wright *et al.*, 1990). Entre las vellosidades, están las pequeñas aberturas de las glándulas tubulares simples llamadas criptas.

Las criptas o glándulas intestinales (de Lieberkühn) son estructuras tubulares que se abren entre las bases de las vellosidades, tienen de 0.3 a 0.5 mm de profundidad y se extienden profundamente hasta la muscular de la mucosa, el epitelio que reviste las criptas se continúa con el que cubre las vellosidades. Las funciones generadora y secretora de la cripta se ven reflejadas por la naturaleza de sus tipos celulares, que incluyen algunas células con función de absorción, células indiferenciadas, células de Paneth, células mucosas y células enteroendócrinas (Patrick *et al.*, 1974).

Las glándulas submucosas (Brunner) del duodeno están formadas por células cúbicas altas con núcleos oscuros, aplanados y basales, y citoplasma claro vacuolado. Las porciones glandulares se continúan con conductos revestidos por células cúbicas bajas, que penetran la muscular de la mucosa para desembocar en las células intestinales (Ahnen *et al.*, 1994). Estas glándulas secretan un moco alcalino (pH 8.2 a 9.3). La secreción ácida gástrica pueden producir erosión de la mucosa duodenal, y la secreción de las glándulas submucosas la protege contra esto por la alcalinidad de su moco y, posiblemente, por la capacidad amortiguadora del bicarbonato que contiene, que reacciona con el ácido clorhídrico para formar cloruro de sodio y ácido carbónico. Las células de las glándulas de Brunner contienen urogastrona, péptido que inhibe la secreción de ácido clorhídrico en el estómago y también estimula la proliferación del epitelio. Esto último sirve para estimular la renovación rápida de las células epiteliales dentro de las criptas intestinales (Jeffery *et al.*, 1997).

Las glándulas de Brunner producen activamente un factor de crecimiento llamado factor de crecimiento epidermoide (EGF), factor con posibilidad de acelerar la reparación tisular, en particular la cutánea, revisando la fisiología del EGF en el tubo gastrointestinal, Playford en 1995 lo ha clasificado como un «factor de vigilancia luminal», argumentando que su función es la de asistir de forma inmediata ante la pérdida de la integridad epitelial, y la de contribuir a la preservación de la homeostasia metabólica y poblacional de estructuras lumbinales y posiblemente extralumbinales. De este modo, la continua presencia del EGF en el tubo gastrointestinal parece conferir un estado constitutivo de citoprotección o defensa “antiestrés” (*Berlanga et al., 1999*).

2.3 Etanol

El etanol o etil alcohol, es una droga que actúa a nivel de sistema nervioso central y afecta a las principales funciones psicomotoras a través de una serie de complejos procesos fisicoquímicos y metabólicos (Gessner, 1993). El metabolismo del etanol genera una curva metabólica compuesta por varios pasos, así, en su oxidación el primer metabolito que encontramos es el acetaldehído, la obtención de este compuesto está catalizada por diferentes enzimas, de forma que en la oxidación del etanol intervienen, en mayor o menor grado, la alcohol deshidrogenasa (ADH), el sistema microsomal de oxidación del etanol (MEOS) y el enzima catalasa. En cuanto al metabolismo del acetaldehído, la enzima implicada es la alcohol deshidrogenasa y mediante su acción se obtiene acetato, los últimos productos de este metabolismo son el dióxido de carbono (CO₂) y el agua (H₂O) (*Lamboeuf et al., 1981; Gessner, 1993*).

El consumo de etanol produce un estado hipermetabólico en el hígado que es caracterizado por el aumento de la respiración mitocondrial, la cual es impulsada por la gran demanda para la reoxidación del NADH, que se produce durante el metabolismo de este agente por la ADH citosólica (*Adachi e Ishii, 2002*); también el MEOS comprende reacciones químicas de óxido reducción, las cuales producen

moléculas altamente inestables llamadas radicales libres de oxígeno, como son el anión superóxido (O_2^-), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo (OH^\cdot) (Nanji y French, 2003).

2.3.1 Aspectos farmacocinéticos

Los procesos que se dan en el organismo tras la ingesta de etanol pueden ser divididos en tres fases: la fase de absorción, la de difusión o distribución y la de eliminación (Kalant, 1971; Gessner, 1993). Durante la primera fase, el etanol es absorbido en las partes altas del tracto gastrointestinal por difusión necesaria en la digestión precedente realizada por enzimas hidrolíticas, sin embargo, no se puede excluir una oxidación parcial por parte de la alcohol deshidrogenasa en la mucosa gastrointestinal (Lamboeuf *et al.*, 1981).

Los factores que pueden mediar el rango de absorción son: a) La cantidad y composición en cuanto a aditivos del alcohol, b) la concentración de la bebida alcohólica y c) la ingesta de alimentos. Durante la fase de difusión el alcohol es distribuido en los tejidos en proporción sobre todo a su contenido en agua, agua intersticial e intracelular, más sangre. En la última fase, la fase de eliminación, el aspecto más importante que se puede observar es un decremento en las concentraciones del etanol en sangre, aproximadamente un 90% de la eliminación es realizada por la oxidación del etanol a dióxido de carbono y agua que representa el paso principal (Kalant, 1971).

2.3.2 Oxidación hepática del etanol

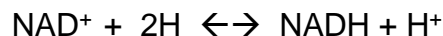
El etanol es eliminado del organismo casi exclusivamente por oxidación, este procesos se da principalmente en el hígado, mediado por la alcohol deshidrogenasa (ADH) citosólica, así, el alcohol es metabolizado enzimáticamente por la ADH primero a acetaldehído y después por la alcohol deshidrogenasa a acetato, por otra

parte, una pequeña porción de ese etanol, un 10% o menos, puede ser metabolizado por rutas alternativas, como la vía de oxidación microsomal o la vía de la catalasa (CAT) (Lamboeuf y De Saint, 1980). La ADH cataliza la conversión reversible del etanol a sus correspondientes aldehídos y cetonas con el nicotinamida adenín dinucleótido (NAD⁺) como cofactor.



Ecuación 1. Primer paso de la oxidación del etanol

De este modo, oxida el etanol a acetaldehído por medio de la transferencia de hidrógenos desde el sustrato al cofactor (NAD⁺) dando lugar en la conversión a su forma reducida, el nicotinamida adenín dinucleótido reducido (NADH). La conversión quedaría expresada en la siguiente igualdad (Mudrakova y Kovar, 2007).



Ecuación 2. Segundo paso de la oxidación del etanol

2.4 Estrés oxidativo y radicales libres

Cuando los sistemas de defensa naturales del cuerpo conocidos como antioxidantes se utilizan como protección de los radicales libres (RL) y son superados por la excesiva formación de especies de oxígeno reactivo como el superóxido, el peróxido de hidrógeno y el radical hidroxilo, se incrementa el estrés oxidativo. Las especies de oxígeno reactivo son generados continuamente como subproductos del metabolismo del etanol, el metabolismo aeróbico, exposición a luz ultravioleta, hipoxia, contaminación y mecanismos de estrés. El estrés oxidativo daña a las membranas celulares, causa inflamación celular, disminuye la fluidez de la membrana, impide el cuidado del gradiente iónico y favorece a la inflamación de los tejidos y produce cambios en las proteínas y mutaciones en el ADN (Kelly *et al.*, 1996).

El sistema antioxidante de defensa en el cuerpo podría ser mejorado con la suplementación con vitaminas, minerales o aminoácidos antioxidantes, disminuyendo el estrés oxidativo y resultando en la disminución del daño a los tejidos y daños a la salud asociados con el estrés oxidativo. En personas con alcoholismo éste estrés oxidativo altera la función hepática por la inflamación producida, llevando consigo el desarrollo de fibrosis en etapas crónicas (Rodríguez-Perón *et al.*, 2001).

La medición del estrés oxidativo se realiza por medio de:

- La determinación de productos terminales de la acción oxidante sobre macromoléculas; un método para medir peróxidos lipídicos es el malondialdehído (MDA).
- La medición del estado oxidativo que refleja el balance entre el sistema oxidante y pro- oxidante en las diversas patologías (Rodríguez-Perón *et al.*, 2001).

Un radical libre (RL) es cualquier molécula que contiene uno o más electrones no apareados, lo que los hace sumamente reactivos y capaces de dañar otras moléculas, produciendo una reacción en cadena que causa daño oxidativo. (Clarkson y Thompson, 2000). Los RL se producen continuamente por medio de reacciones bioquímicas de oxido-reducción que se dan por el metabolismo normal de las células (Rodríguez-Perón *et al.*, 2001). El mecanismo oxidante de los RL está íntimamente ligado a su origen, por lo cual sigue una secuencia de reacciones en cadena. En estas reacciones, una molécula muy reactiva es capaz de reaccionar con otra molécula no reactiva, induciendo en esta última la formación de un RL listo para iniciar un nuevo ataque nucleofílico, y así de manera sucesiva (Wu y Cederbaum, 2003).

Cuando en la célula existe un aumento importante en la generación de especies reactivas del oxígeno, ya sea por la disminución de los mecanismos de

defensa o como consecuencia de una sobreproducción de los mismos, las especies reactivas del oxígeno atacan a las macromoléculas (proteínas, ácidos nucleicos y lípidos), que componen a la célula, estas alteraciones comprometen el funcionamiento celular que puede derivar en un daño irreparable (Gutiérrez y Morales, 2006).

La completa degradación de los lípidos (lipoperoxidación) es un indicador de daño oxidativo, los fosfolípidos presentes en las membranas de los ácidos grasos polinsaturados son particularmente sensibles al ataque por el radical OH y otros oxidantes (Devlin, 2002). Un solo radical OH puede resultar en la peroxidación de varias moléculas de ácidos grasos polinsaturados, además del daño celular por la destrucción de las membranas, la lipoperoxidación puede resultar en la formación de productos reactivos, asimismo pueden reaccionar provocando un daño a las proteínas y al ADN, ocasionando la ruptura de la cadena del mismo, el traslado de nucleótidos y una variedad de modificaciones en las bases orgánicas de los nucleótidos (Wu y Cederbaum, 2003).

La peroxidación lipídica se estimula por el etanol, así los RL para completar su par electrónico pueden reaccionar con otro radical, o bien sustraer un electrón de otra molécula (por ejemplo, un ácido graso poliinsaturado), la cual se convierte entonces en un radical. Así cuando se origina el radical lipídico la molécula sufre inmediatamente un reajuste molecular produciéndose un dieno conjugado que puede reaccionar con el oxígeno y formar un radical péroxilo (ROO[•]). Este radical puede formar de nuevo un radical libre lipídico y un hidroperóxido, por tanto, una vez iniciada la peroxidación lipídica, tiene lugar una reacción en cadena de producción de radicales libres que lleva a la formación de peróxidos orgánicos a partir de los ácidos grasos polinsaturados, propagándose el daño oxidativo, lo cual daña la cadena respiratoria mitocondrial y también la síntesis de la energía en los hepatocitos (Gutiérrez y Morales, 2004)

2.5 Daño hepático

Se define como cualquier daño persistente al parénquima hepático capaz de producir un daño morfológico y/o funcional, clásicamente describe la inflamación y necrosis que persiste en el tiempo como la causa de fibrosis y regeneración nodular (cirrosis), la distorsión vascular y la fibrosis que afecta los vasos sanguíneos conduce a la hipertensión portal (Cortes *et al*, 2002).

La integridad del hepatocito se evalúa a través de la medición de la Aspartato Aminotransferasa (AST) y Alanino Aminotransferasa (ALT), y es por esto que se elevan en la necrosis de las células hepáticas. La disfunción hepática es la alteración de cualquiera de estos patrones, estas aminotransferasas, también llamadas transaminasas, se evalúan en exámenes de sangre, estas se alteran en caso de daño a las células hepáticas; la elevación de estas enzimas indica muerte (necrosis o apoptosis) de los hepatocitos por inflamación hepática, sin embargo hay otros mecanismos que pueden producir el mismo efecto, como la isquemia hepática (Moseley, 1996).

Existen trabajos experimentales que apuntan a que la fisiopatología del daño hepático por alcohol es multifactorial, ya que el acetaldehído es generado tanto en la metabolización del alcohol por la alcohol deshidrogenasa, como en el sistema MEOS (sistema enzimático oxidante microsomal), por lo que su nivel plasmático se eleva después de la ingesta, hasta ser extremadamente tóxico y reactivo:

1. Se une a fosfolípidos, residuos de aminoácidos y grupos sulfidrilos.
2. Depolimeriza proteínas de la membrana plasmática.
3. Favorece la lipoperoxidación.
4. Se une a tubulina, dañando los microtúbulos del citoesqueleto.
5. Estimula la síntesis de procolágeno tipo I y fibronectina en células de Ito.

La ingestión crónica aumenta el consumo de oxígeno, por reoxidación del NADH, el aumento de requerimiento de oxígeno, produce una gradiente de oxígeno

más pronunciada a lo largo del acino, por lo que las células de la zona 3 se ven más expuestas a la necrosis, en esa zona es también donde hay mayor concentración de alcohol deshidrogenasa y donde los cambios en el potencial redox son mayores (Mendenhall *et al.*, 1993). La presencia de grasa en el hígado alcohólico crónico, se produce mediante diversos mecanismos según el tipo de ingesta: en la ingesta aguda masiva, la grasa proviene de movilización desde la periferia. En la ingesta crónica y prolongada, la acumulación proviene de un aumento en la síntesis y una menor degradación de ácidos grasos en el hígado (Czachowski *et al.*, 1999).

2.6 Antioxidantes

Un antioxidante es una sustancia que hallándose en bajas concentraciones con respecto a las de un sustrato oxidable, retarda o previene la oxidación de dicho sustrato (Halvorsen *et al.*, 2002). El cuerpo cuenta con sistemas antioxidantes que dependen de la ingesta de vitaminas antioxidantes y minerales, así como de la producción endógena de numerosas enzimas involucradas en eliminar los radicales libres, a los cuales se les cede un electrón, neutralizando así su acción oxidante (Rodríguez *et al.*, 2001). Los antioxidantes se clasifican en exógenos y endógenos (Tabla 1).

Antioxidantes Endógenos	Glutation, coenzima Q10, enzimas como la superóxido dismutasa (SOD), catalasa, glutacion peroxidasa.	Son enzimas de degradación que eliminan los compuestos dañados por los radicales libres (RL) y catalizan desactivaciones de los RL generados. Proviene del organismo.
Antioxidantes Exógenos	Vitamina E, C, A, Flavonoides.	Son compuestos no enzimáticos que los obtenemos de la dieta.

Tabla 1. Clasificación de los Antioxidantes (Rodríguez-Perón *et al.*, 2001).

La SOD proviene de una familia de metaloproteínas presente en todas las células, representa la primera línea de defensa acelerando la reacción del anión O_2^- a H_2O_2 (Devlin, 2002). La catalasa se encuentra principalmente en los peroxisomas, los cuales sirven para eliminar el H_2O_2 catalizando una reacción entre dos moléculas de este radical, resultando en la formación de agua y oxígeno (Nanji y French, 2003).

2.6.1 Glicina

La glicina o ácido aminoacético es el aminoácido más simple del cuerpo, consiste en una sola molécula de carbono unida a un grupo amino y a un carboxilo, se encuentra en todas las formas de vida, aunque la mayor parte se localiza en la proteínas, también se encuentra libre en fluidos del organismo humano (Serrano *et al.*, 1992). La glicina de la dieta protege al organismo frente a shock tanto por pérdida sanguínea como por endotoxinas, reduce la concentración de alcohol en el estómago y aumenta la recuperación de la hepatitis producida por alcohol, disminuye el daño hepático inducido por fármacos hepatotóxicos y bloquea la apoptosis y en el riñón disminuye la nefrotoxicidad originada por fármacos inmunosupresores y previene la hipoxia y la formación y acción de radicales libres. Es útil en el tratamiento de enfermedades con procesos inflamatorios ya que disminuye la formación de citocinas como el factor de necrosis tumoral tipo alfa generado por la activación crónica de la cadena respiratoria.

El efecto de la glicina sobre las actividades antioxidantes, se deriva del bloqueo ejercido por este aminoácido sobre la activación de las células de Küpffer productoras de RL tanto de oxígeno como de nitrógeno y de citocinas, cuyas concentraciones se incrementan en condiciones de daño por isquemia (Matilla *et al.*, 2002). Estudios anteriores a este han demostrado que la administración de glicina previene varias formas de lesión hepática, como es el caso de la necrosis y la inflamación desarrollada en la fase temprana durante la administración crónica de etanol, el mecanismo de protección de este aminoácido contra la lesión involucra a las células de Küpffer (Yin *et al.*, 1998; Ishizaki *et al.*, 2004).

Existen dos mecanismos propuestos por los cuales la glicina protege al hígado del daño producido durante el consumo de etanol, el primero se debe a la capacidad de este aminoácido de reducir el estrés oxidativo aumentando los niveles de SOD y catalasa en el hígado y los niveles séricos de vitamina C y E cerca de las concentraciones normales (Senthilkumar *et al*, 2004). El segundo mecanismo de hepatoprotección de este aminoácido es que activa los canales de cloro ocasionando una disminución de la concentración intracelular de Ca^{+2} en las células de Küpffer, las cuales hiperpolarizan la membrana celular, haciendo más difícil la apertura de los canales de Ca^{+2} dependientes de voltaje, además de inhibir la activación de macrófagos y la inhibición del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α).

Las funciones de la glicina se deben a su pequeño tamaño y a la falta de una cadena lateral significativa, que podría afectar a las características físicas de este aminoácido por impartir carga, hidrofobicidad y otras limitaciones estructurales, estas propiedades permiten a la glicina desempeñar un papel importante en la estructura de ciertas proteínas y actuar en varias funciones celulares como un modificador biológico. La glicina es un osmoprotector contra estrés originado por altas temperaturas, desecación y ambientes con diferentes tóxicos concentrados (Matilla *et al.*, 2002).

Los canales iónicos son poros proteicos dentro de la membrana celular que transfieren iones a lo largo de un gradiente electroquímico. Están ampliamente distribuidos y tienen un papel clave en el mantenimiento de la integridad celular (Laniado *et al.*, 1997). Sus funciones fisiológicas incluyen: regulación del volumen celular, estabilización del potencial de membrana, transducción de señales, transporte transepitelial y acidificación de orgánulos intracelulares (Jentsch *et al.*, 1997). Los canales iónicos están regulados por estímulos tales como el ión calcio, AMPc, pH, ligandos extracelulares y voltaje transmembrana.

El receptor de glicina es un complejo pentamérico que forma un canal transmembrana selectivo de cloro que se expresa predominantemente en la médula espinal y cerebro (Rajendra *et al.*, 1997). En dichas regiones la glicina actúa como un neurotransmisor inhibitorio.

La glicina ejerce su acción inhibitoria por unión a su receptor que está ampliamente localizado en las membranas neuronales postsinápticas (Araki *et al.*, 1961). La señal inhibitoria postsináptica bloquea la acción despolarizadora de la neurotransmisión por incremento de la permeabilidad al Cl⁻ a través de la membrana neuronal postsináptica. Igualmente se ha demostrado que una amplia variedad de células involucradas en la inflamación (células de Kupffer, macrófagos alveolares y neutrófilos) también contienen canales de cloro sensibles a glicina (Ikejima *et al.*, 1997). La glicina provoca por hiperpolarización de la membrana plasmática de leucocitos una menor sensibilidad a los estímulos inflamatorios tales como endotoxinas y posiblemente a una amplia variedad de factores de crecimiento.

La glicina al activar los canales de cloro sensibles a este aminoácido de la membrana plasmática de las células de Kupffer y otras células de la serie blanca origina un influjo de iones cloro conduciendo a la hiperpolarización de la membrana. Con la producción de estímulos externos tales como endotoxinas, se produce un influjo dependiente de voltaje de calcio libre extracelular a través de canales dependientes de voltaje. Este incremento en el calcio intracelular es impedido debido al estado de hiperpolarización de la membrana plasmática creado por la interacción de la glicina con su receptor. De esta manera se bloquea la producción de señales intracelulares y la producción de citoquinas que son dependientes del incremento del calcio intracelular, lo que previene la cascada de producción de citoquinas inflamatorias que sigue a la activación de las células de Kupffer y otros tipos de células sanguíneas que contengan este tipo de receptor (Wheeler *et al.*, 1999).

El efecto de la glicina sobre las actividades de las enzimas antioxidantes, podría derivar del bloqueo ejercido por este aminoácido sobre la activación de las células de Kupffer1 (Ikejima *et al.*, 1996), productoras de radicales libres tanto de oxígeno como de nitrógeno y de citocinas, cuyas concentraciones se incrementarían en condiciones de daño por isquemia/reperfusión provocado por shock hemorrágico agudo. Dicho bloqueo impediría la actuación de estos factores sobre las enzimas antioxidantes, con la restauración de valores próximos a controles, tanto de la actividad como de los ARNm, de dichas enzimas.

Las células de Kupffer del hígado constituyen el 80% de los macrófagos residentes en el organismo. La glicina bloquea el proceso inflamatorio sistémico que se origina en una amplia variedad de estados patológicos tales como trauma, shock hemorrágico, sepsis, quemados y procesos de isquemia/reperfusión, debido a la activación de macrófagos que liberan potentes mediadores inflamatorios tales como citoquinas tóxicas y eicosanoides, los cuales desempeñan un importante papel en la respuesta inflamatoria progresiva (Goris *et al.*, 1985).

Se ha demostrado que los macrófagos son activados por endotoxinas, por la hipotensión sistémica y por los sucesivos procesos de isquemia/reperfusión(Bouwens, 1988). Además, la lesión de la mucosa intestinal causada por hipoperfusión/reperfusión conduce a la traslocación bacteriana y aumento de endotoxinas que son potentes activadores de macrófagos (Jaeschke *et al.*, 1991).

2.7 Sacarosa

La sacarosa o azúcar común es un disacárido formado por alfa-glucosa y beta-fructosa, su nombre químico es: alfa-D-glucopiranosil(1->2)-beta-D-fructofuranósido con fórmula química (C₁₂H₂₂O₁₁), en la naturaleza se encuentra en un 20% del peso en la caña de azúcar y en un 15% del peso de la remolacha

azucarera, de la que se obtiene el azúcar de mesa. La miel también es un fluido que contiene gran cantidad de sacarosa parcialmente hidrolizada.

Investigaciones realizadas anteriormente muestran que los efectos de la administración aguda de etanol alteran la función y la morfología del parénquima hepático (Cortes *et al*, 2002), estas alteraciones se ven modificadas por la acción de hidratos de carbono.

Específicamente con la administración de sacarosa se observa la reversión parcial de los daños causados el tejido hepático por la administración de etanol, evidenciando que otros hidratos de carbono son ineficaces en la evolución de los efectos de la administración de etanol sobre el daño hepático (Gutiérrez-Salinas *et al.*, 1996).

3. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

El consumo de etanol de forma aguda o crónica lleva consigo el aumento en la tasa de producción de radicales libres en el organismo (Stolz *et al.*, 1999), lo que conlleva el desarrollo de distintas patologías entre las más importantes, la cirrosis que es considerada una enfermedad relacionada con pérdida de tejido hepático provocada por alteración difusa de la estructura hepática normal, este proceso como resultado final del consumo de etanol en forma crónica, mostrando un daño irreversible (Rivera *et al.*, 2006), la ingestión de etanol ha aumentado tanto a nivel nacional como mundial teniendo como consecuencia el aumento de enfermedades hepáticas (cirrosis). Este problema ha sido evidenciado en diferentes estudios experimentales en modelos animales, en los cuales se ha demostrado que el daño al tejido hepático conlleva el desarrollo de múltiples factores que desencadenan patologías (Kelly *et al.*, 1996), ya que el hígado realiza actividades de suma importancia en el organismo. Datos previamente obtenidos por nuestro grupo de investigación demuestran que la ingesta habitual de etanol en solución acuosa al 5% por vía intragástrica provoca un daño aun mayor al tejido hepático y a nivel sistémico que la administración de etanol al 40% también en ingesta habitual (López, 2007).

4. JUSTIFICACIÓN

El consumo de etanol es un problema de salud pública en nuestro país y particularmente en el estado de Hidalgo, debido a que coexisten estas adversidades junto con la ausencia en la información acerca del consumo crónico de etanol y la respuesta de los sistemas hepatoprotectores que se conocen actualmente, por lo que se realiza este proyecto de investigación; ya que recientemente se ha manifestado que las alteraciones hepáticas y de otra índole se asocian a un proceso oxidativo celular, es necesario adquirir mayor conocimiento acerca de sustancias que tienen efectos hepatoprotectores; por lo que la finalidad de esta investigación es aportar conocimientos sobre este efecto tanto con la glicina como con la sacarosa siendo estos compuestos de fácil adquisición y bajo costo, contribuyendo así a disminuir el inicio del daño hepático o mejorar el tratamiento de padecimientos hepáticos ya existentes.

5. HIPÓTESIS

Si el etanol ocasiona daño al hígado por la producción de RL, y la glicina es un importante antioxidante, entonces, la glicina protegerá al hígado del daño ocasionado por RL durante el consumo crónico de etanol. Por otra parte, se ha demostrado el efecto hepatoprotector de la sacarosa, probablemente el mecanismo se deba a que protege a las glándulas de Brunner que se localizan en el duodeno, y en consecuencia ejerza un efecto protector al hígado durante el consumo crónico de etanol.

6. OBJETIVOS

Objetivo general

Estudiar el efecto hepatoprotector de la glicina y la sacarosa en la administración crónica de etanol en un modelo animal.

Objetivos específicos

1. Determinar los niveles séricos de glucosa, albúmina, triacilglicéridos, colesterol y bilirrubina en ratas con consumo crónico de etanol y la administración de glicina y/o sacarosa.
2. Determinar la actividad sérica de las enzimas AST y ALT de ratas con consumo crónico de etanol y la administración de glicina y/o sacarosa.
3. Determinar la ganancia de peso en ratas con consumo crónico de etanol y la administración de glicina y/o sacarosa.
4. Identificar las alteraciones histológicas del duodeno en ratas con consumo crónico de etanol y la administración de glicina y/o sacarosa, esto como indicador del efecto protector de la sacarosa a las glándulas de Brunner.
5. Realizar un estudio histológico de hígado en ratas con consumo crónico de etanol y la administración de glicina y/o sacarosa, para identificar el efecto protector de la sacarosa y de la glicina.

7. METODOLOGÍA

7.1 Animales de experimentación

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar con un peso promedio de 330 ± 20 g., se mantuvieron bajo condiciones ambientales constantes con ciclos de luz/oscuridad de 12 horas con libre acceso a agua y alimento en el Bioterio del Instituto de Ciencias de la Salud de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.



7.1.1 Grupos experimentales

Los animales se agruparon de la siguiente manera:

- a) Grupo control: ratas sin ningún tipo de tratamiento con dieta y agua *ad libitum*.
- b) Grupo etanol (EtOH): ratas con ingestión de etanol a dosis de 1.5-2 g./kg peso en solución acuosa 5% v/v vía oral y dieta *ad libitum*.
- c) Grupo EtOH + glicina (Gly): ratas con administración de solución de Gly (0.6 g/kg. peso, solución fisiológica 1:1 m/v) vía intragástrica + ingestión de EtOH (1.5-2 g./kg peso en solución acuosa 5% v/v) vía oral media hora después de la administración de Gly.
- d) Grupo EtOH + sacarosa: ratas con administración de solución de sacarosa (2 g, solución fisiológica 1:1 m/v) vía intragástrica + ingestión de EtOH (1.5-2 g./kg peso en solución acuosa 5% v/v) vía oral media hora después de la administración de sacarosa.

- e) Grupo EtOH + Gly + sacarosa: ratas con administración de solución de Gly + sacarosa (0.6 g/kg. peso + 2g sacarosa, solución fisiológica 1:1 m/v) vía intragástrica + ingestión de EtOH (1.5-2 g./kg peso en solución acuosa 5% v/v) vía oral media hora después de la administración de Gly + sacarosa.



Tanto las dosis de etanol como la de Gly y sacarosa fueron únicas, todas las ratas bajo anestesia inhalatoria (se colocó a la rata en la cámara de anestesia, impregnada con éter etílico) se sacrificaron por decapitación al cabo de los 3 meses de tratamiento, posteriormente se les extirpó el hígado y la primera porción del intestino delgado (duodeno) para realizar análisis de microscopía de luz.

7.2 Obtención de muestras

Al transcurrir las 12 semanas del tratamiento, los animales fueron sacrificados por decapitación, obteniéndose inmediatamente muestras de sangre y diversos tejidos (hígado e intestino delgado) para realizar los siguientes procedimientos analíticos como se muestra a continuación:

- a) Obtención de peso: Cada día (5 días de 7 a la semana) las ratas fueron pesadas para valorar ganancia o pérdida de peso durante el desarrollo de la investigación.
- b) Obtención de suero: Después de decapitar a las ratas, se recolectó la sangre en un tubo vancutainer con gel separador de plasma, el cual se centrifugó a

3500 rpm durante 10 minutos en una centrifuga clínica, obteniéndose el suero, almacenado a -70°C hasta su posterior análisis.

- c) Obtención de tejidos: Posterior a la decapitación, se les realizó una cirugía abdominal a las ratas, obteniendo los siguientes tejidos: hígado, e intestino delgado (predominando duodeno) los cuales fueron utilizados para estudio histológico por microscopía de luz.
- d) Determinación de metabolitos en suero: La concentración sérica de la glucosa, albúmina, triacilglicéridos, colesterol y bilirrubina directa se llevó a cabo utilizando el suero obtenido, las determinaciones se realizaron empleando Kits específicos para cada determinación cuantitativa marca Spinreact, siguiendo las instrucciones del fabricante (Anexo 1, 2, 3, 4 y 5 respectivamente).
- e) Ensayos de actividad enzimática en suero: Se determinó la concentración sérica de las enzimas marcadoras de daño hepático AST y ALT utilizando estuches de reactividad específicos para cada determinación cuantitativa marca SpinReact, siguiendo las instrucciones del fabricante (Anexo 6 y 7 respectivamente), la actividad enzimática se reportarán como unidades internacionales por litro (U/L).
- f) Microscopía de luz: Se utilizaron las muestras de los tejidos (hígado e intestino delgado) de cada grupo experimental para ser analizadas por microscopía de luz.

Cada muestra fue fijada en formaldehído (10% en solución isotónica), fueron embebidas en parafina y teñidas con hematoxilina-eosina y colorante tricrómico de acuerdo a Mascorro *et al.*, (1976).

Los criterios a evaluar en la microscopia electrónica para hígado y duodeno son desorganización hepatocelular, inflamación, apoptosis, índice mitótico, esteatosis y necrosis.

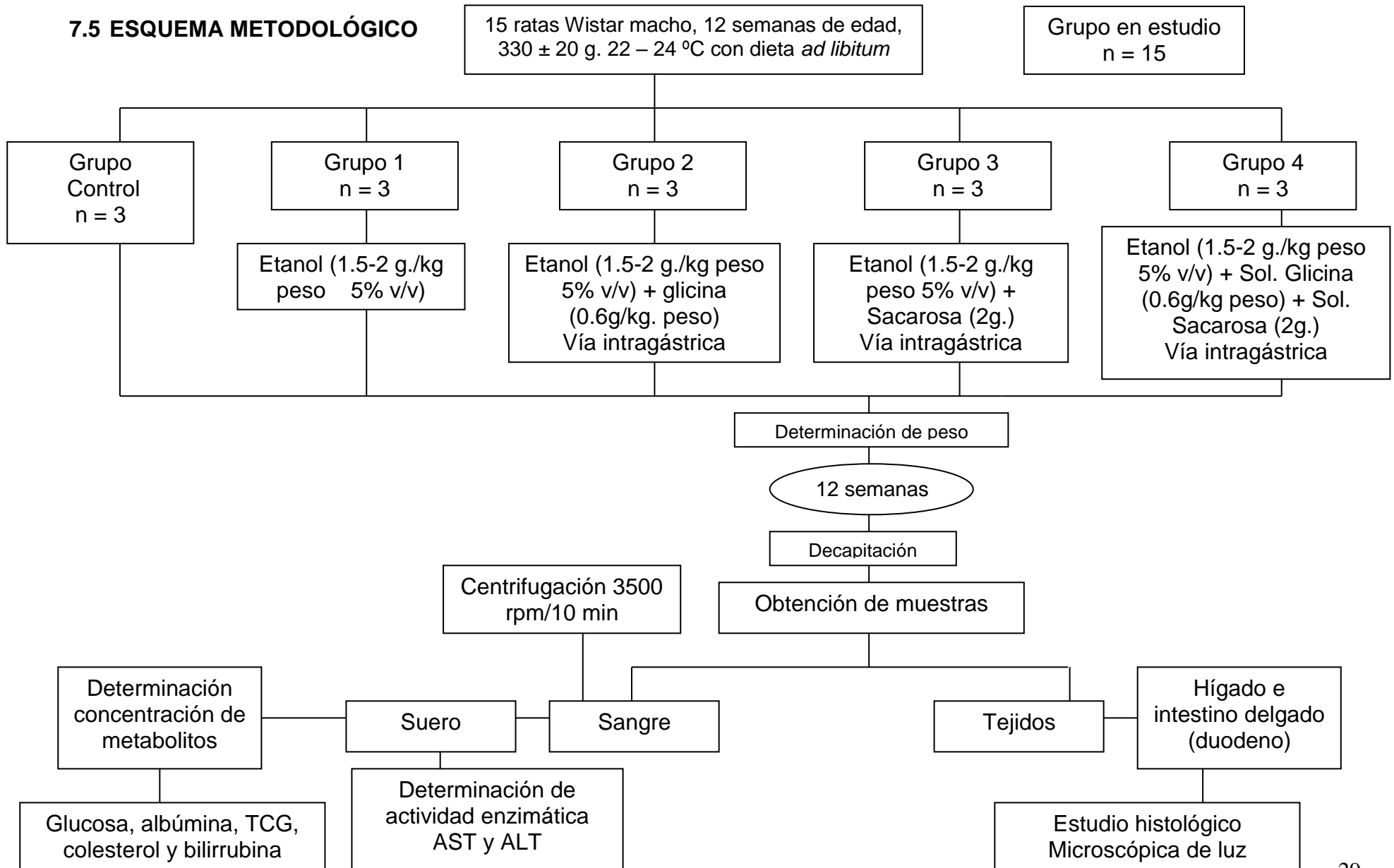
7.3 Análisis estadístico

Los datos fueron analizados por el programa informático Sigma Plot (versión 10), calculando mediante este programa la media y el error estándar en cada grupo experimental, a través de la prueba *t* de “*student*” se evaluó la diferencia entre cada uno de los grupos experimentales. Todos los valores fueron expresados como promedio \pm el error estándar, tomando en cuenta un valor de $p < 0.05$ para interpretarlo como estadísticamente significativo.

7.4 Aspectos éticos

La realización de la presente investigación dispuso de las obligaciones éticas señaladas en la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, donde señala las especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio para tenerlos en óptimas condiciones y evitar daños físicos dado que estos animales de laboratorio proporcionan información que servirá de ayuda para mejorar la salud y la calidad de vida de los pacientes con daño hepático.

7.5 ESQUEMA METODOLÓGICO



8. RESULTADOS

8.1 Cuantificación del peso

Al cuantificar el peso de las ratas se encontró un incremento estadísticamente significativo ($p < 0.05$) para el tercer mes con respecto al peso inicial o cuantificado tanto en el primer mes como en el segundo.

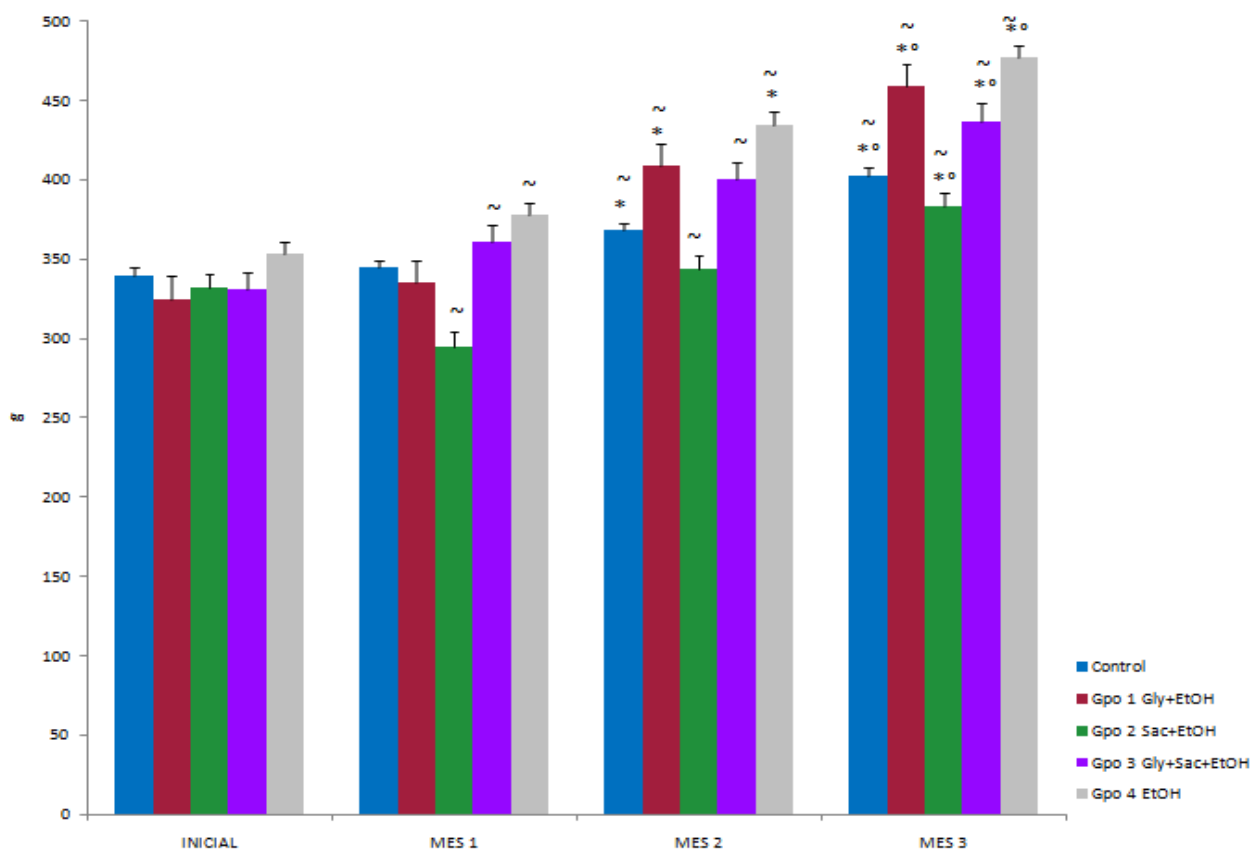


Figura 3. Cuantificación de peso. Los resultados se expresan como el promedio \pm error estándar. * $p < 0.05$ comparado contra el mes 1, ° $p < 0.05$ comparado contra el mes 2 y ~ $p < 0.05$ comparado contra el peso inicial; $n=3$.

8.2 Cuantificación del consumo de etanol

La ingesta de etanol en el proceso experimental se encontró con un aumento gradual estadísticamente significativo ($p < 0.05$) para todos los grupos de estudio (1, 2, 3 y 4) en relación con el consumo promedio del primer mes (30, 27, 41 y 90% respectivamente), sin embargo para los grupos 2 y 4 también se encuentra este incremento estadísticamente significativo ($p < 0.05$) en comparación con el consumo de etanol en g/kg del segundo mes de experimentación.

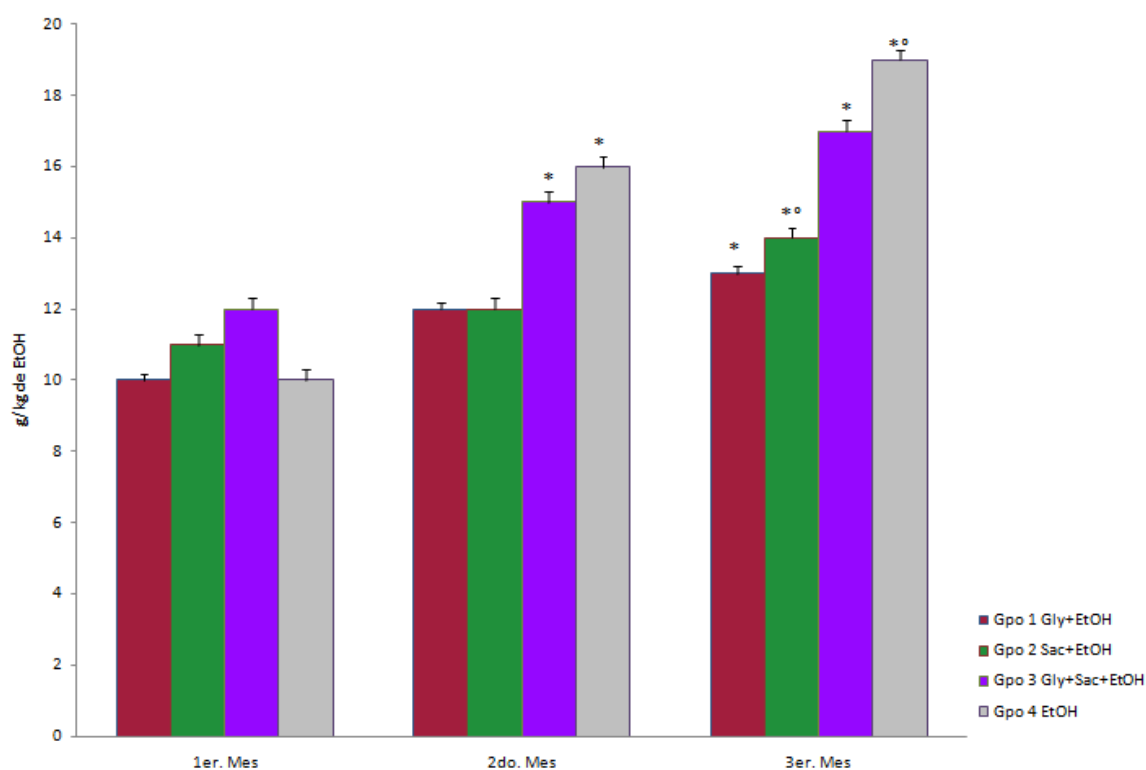


Figura 4. Cuantificación del consumo de etanol. Los resultados se expresan como el promedio \pm error estándar. * $p < 0.05$ comparado contra el mes 1 y ° $p < 0.05$ comparado contra el mes 2; $n=3$.

8.3 Determinación de glucosa sérica

La glucosa sérica aumentó significativamente ($p < 0.05$) en los grupos 2, 3 y 4 con respecto al grupo control, aunque también se encontró esta diferencias estadísticamente significativa ($p < 0.05$) en el grupo 3 con respecto al grupo 4, la

combinación de glicina y sacarosa mantiene los valores de glucosa por encima de los valores normales.

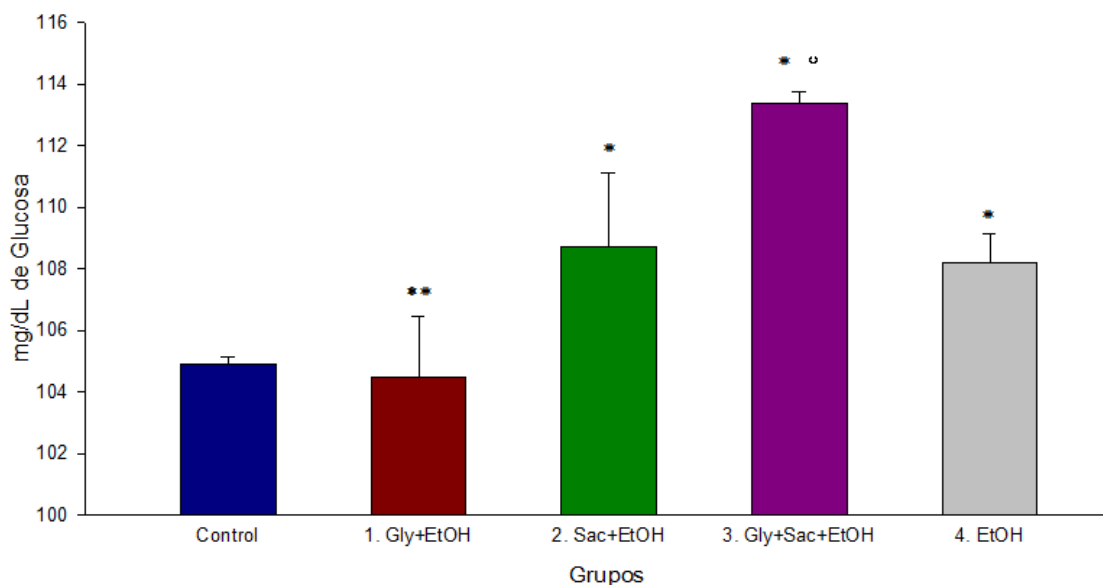


Figura 5. Determinación de glucosa sérica. Los resultados se expresan como el promedio \pm error estándar. * $p < 0.05$ comparado con el grupo control, ** $p < 0.05$ comparado con el grupo 3 y ° $p < 0.05$ comparado con el grupo 4; $n = 3$.

8.4 Determinación de albúmina sérica

La albúmina sérica aumentó significativamente ($p < 0.05$) en todos los grupos de estudio con respecto al grupo control, no encontrándose una diferencia entre el aumento de los valores séricos entre grupos.

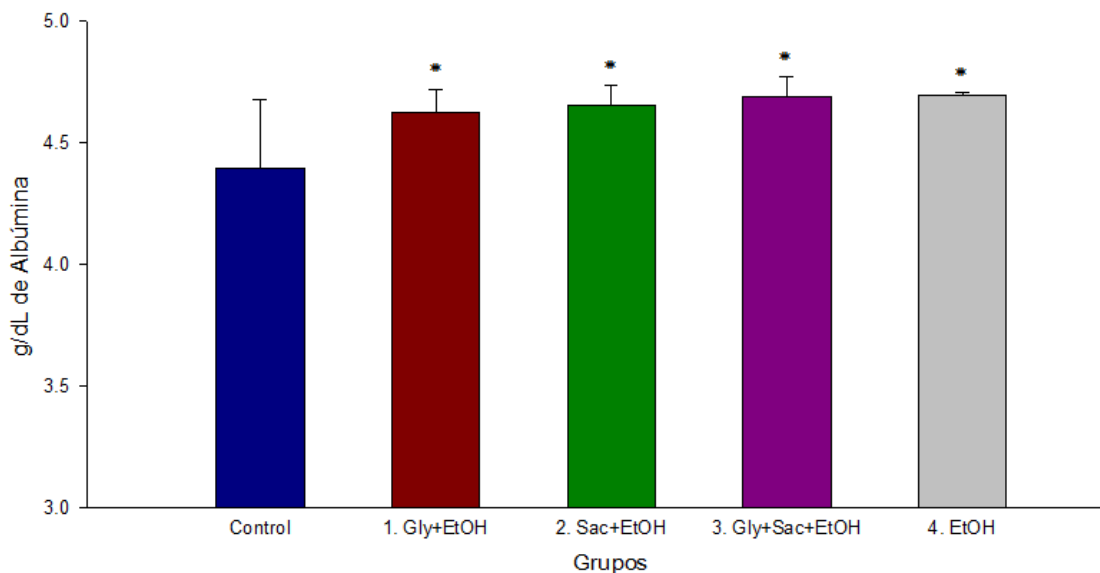


Figura 6. Determinación de albúmina sérica. Los resultados se expresan como el promedio \pm error estándar. * $p < 0.05$ comparado con el grupo control; $n=3$.

8.5 Determinación de triacilglicéridos séricos

Los triacilglicéridos séricos mostraron un incremento estadísticamente significativo ($p < 0.05$) en los grupos 3 y 4 en comparación con el grupo control, mientras que para el grupo 1 se encontró esta diferencia pero en disminución de los valores séricos, entre grupos tratados se encontró que hay diferencia significativa de disminución de valores séricos con respecto al grupo 4 y por último, en el incremento de los valores en los grupos 3 y 4 con respecto a los animales tratados con el antioxidante glicina (grupo 1).

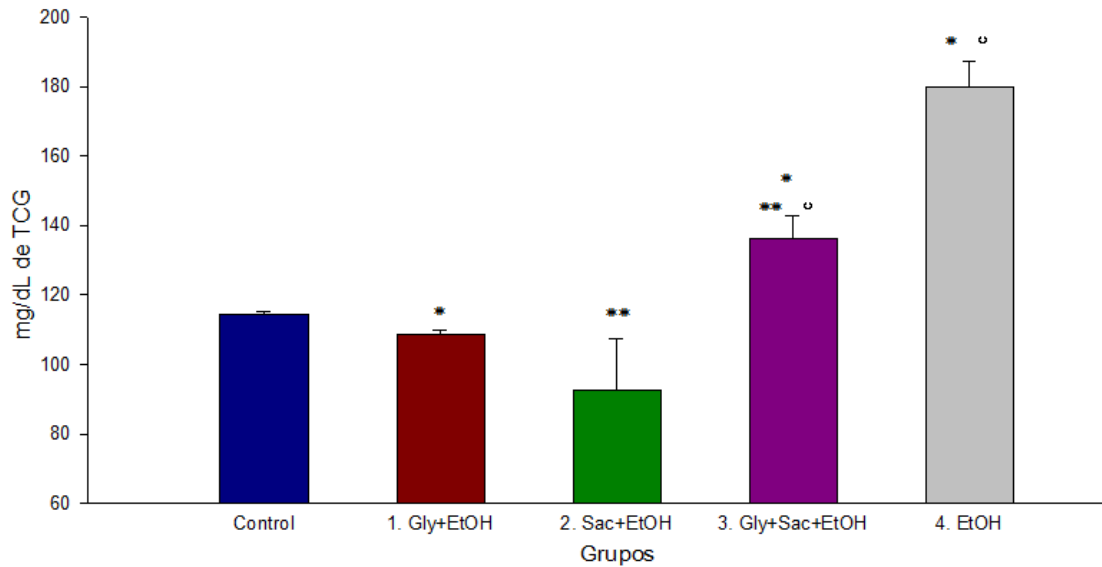


Figura 7. Determinación de triacilglicéridos séricos. Los resultados se expresan como el promedio \pm error estándar. * $p < 0.05$ comparado con el grupo control, ** $p < 0.05$ comparado con el grupo 4 y $^{\circ}p < 0.05$ comparado con el grupo 1; $n = 3$.

8.6 Determinación de colesterol sérico

En la determinación de colesterol sérico se encontró una disminución estadísticamente significativa ($p < 0.05$) únicamente en los grupos 2 y 3 que recibieron tratamiento con sacarosa y la combinación de sacarosa + glicina respectivamente, así mismo, se encontró una disminución significativa en la cantidad de colesterol del grupo 2 con respecto al grupo 1 siendo este un grupo con tratamiento.

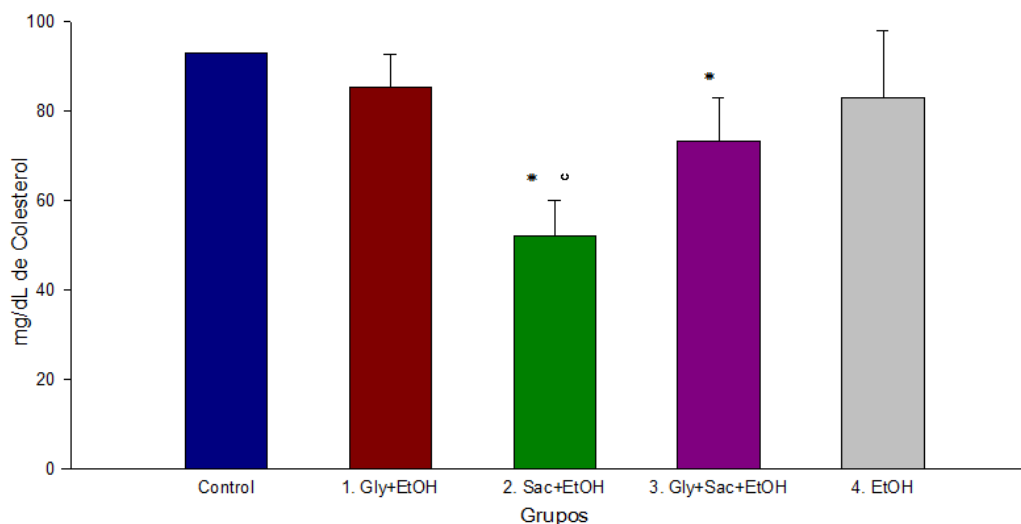


Figura 8. Determinación de colesterol sérico. Los resultados se expresan como el promedio \pm error estándar. * $p < 0.05$ comparado con el grupo control, y $^{\circ}p < 0.05$ comparado con el grupo 1; $n=3$.

8.7 Determinación de bilirrubina directa

La bilirrubina directa mostró un aumento estadísticamente significativo ($p < 0.05$) expresado en los grupos 1, 3 y 4 comparándose así con el grupo control, mientras que los grupos 1 y 4 en comparación con el grupo 3 mostró también un aumento significativo hasta de un 50%.

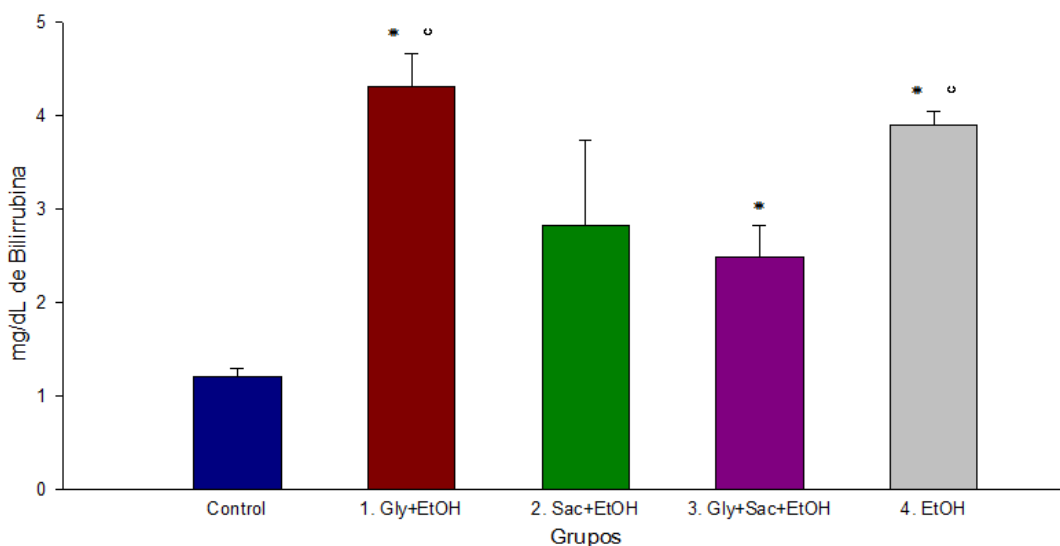


Figura 9. Determinación de bilirrubina directa. Los resultados se expresan como el promedio \pm error estándar. * $p < 0.05$ comparado con el grupo control, y $^{\circ}p < 0.05$ comparado con el grupo 3; $n=3$.

8.8 Determinación de la actividad de la aspartato aminotransferasa

En la figura 10 podemos observar los resultados de la evaluación de la enzima aspartato aminotransferasa, donde se observa que los grupos 1 y 3 aumentaron esta actividad con respecto al grupo control, así mismo se encontró esta diferencia estadísticamente significativa con disminución en los valores de los grupos 2 y 4 con respecto al grupo 3 y de igual forma contra el grupo 1 con el mayor valor obtenido.

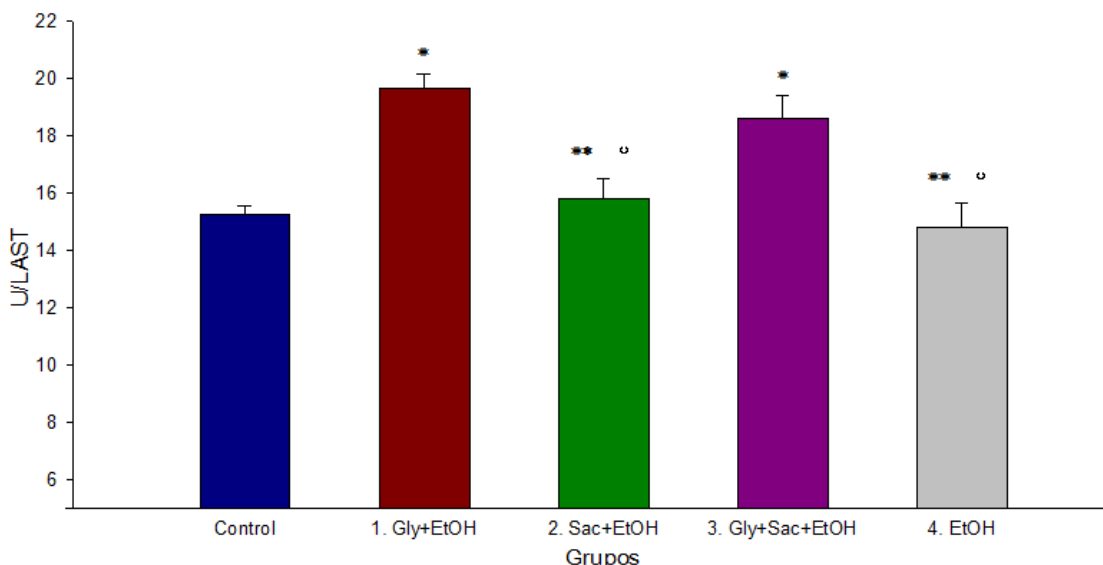


Figura 10. Determinación de la actividad de la aspartato aminotransferasa. Los resultados se expresan como el promedio \pm error estándar. * $p < 0.05$ comparado con el grupo control, ** $p < 0.05$ comparado con el grupo 3 y ° $p < 0.05$ comparado con el grupo 1; $n=3$.

8.9 Determinación de la actividad de la alanino aminotransferasa

En la figura 10 podemos observar los resultados de la evaluación de la enzima aspartato aminotransferasa, donde se observa que los grupos 1 y 3 aumentaron esta actividad con respecto al grupo control, así mismo se encontró esta diferencia estadísticamente significativa con disminución en los valores de los grupos 2 y 4 con respecto al grupo 3 y de igual forma contra el grupo 1 con el mayor valor obtenido.

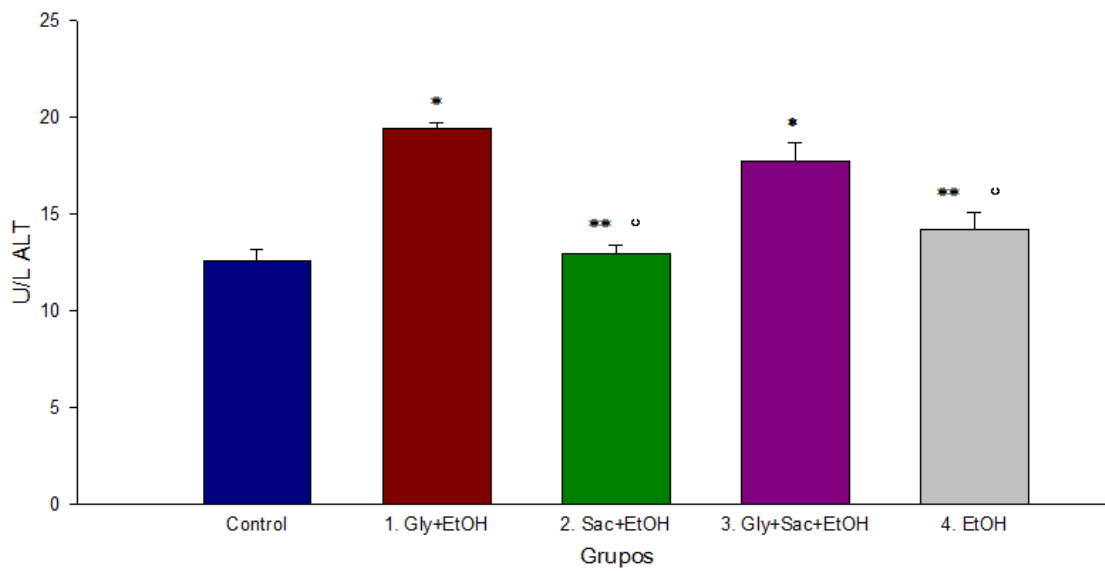


Figura 11. Determinación de la actividad de la alanino aminotransferasa. Los resultados se expresan como el promedio \pm error estándar. * $p<0.05$ comparado con el grupo control, ** $p<0.05$ comparado con el grupo 3 y ° $p<0.05$ comparado con el grupo 1; $n=3$.

8.10 Evaluación histológica de hígado y duodeno

Al hacer el análisis histológico de los cortes de hígado e intestino delgado de los animales tratados, para las que se observaron diferentes características en el parénquima hepático. En la tabla 2 se observan las características generales de histología estudiadas.

La figura 12 muestra un corte histológico del hígado de una rata control y de las ratas que recibieron tratamiento, en la imagen del grupo control se puede apreciar la presencia de cordones de hepatocitos (40x), una correcta organización de estructura porta con su conducto biliar. En los grupos de experimentación se observa una estructura hepática muy parecida a la del grupo control, sin embargo, se encuentran el filtrado inflamatorio agrupado principalmente en la zona 1.

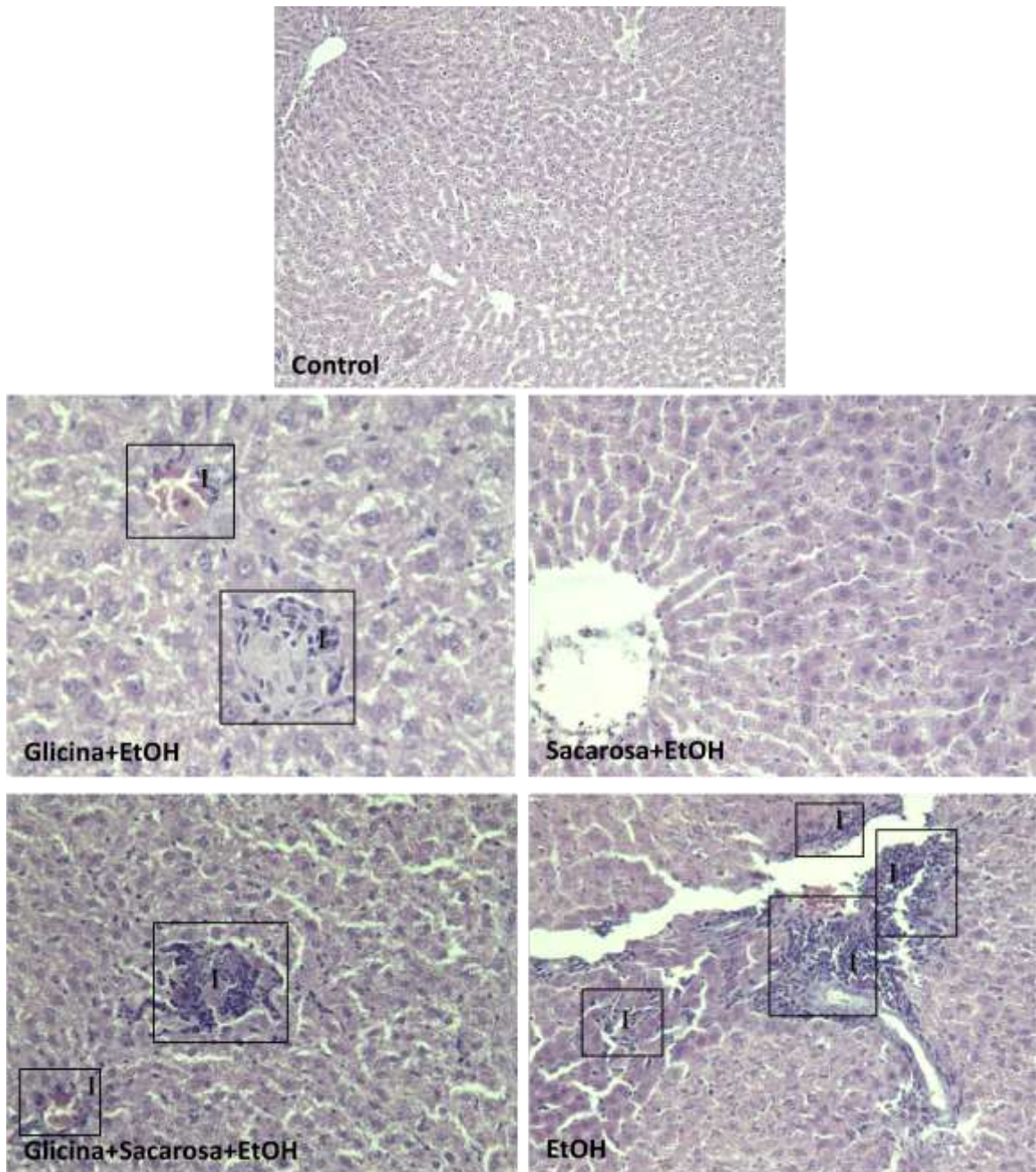


Figura 12. Filtrado inflamatorio. Las letras **I** indican la presencia de filtrado inflamatorio en cada grupo experimental. El tejido hepático fue teñido con H&E (40x).

La figura 13 muestra un corte histológico del hígado de una rata control y de las ratas que recibieron tratamiento, en la imagen del grupo control se puede apreciar la forma normal de las células hepáticas (40x). En los grupos de

experimentación se observan células en un proceso de apoptosis, aumentando en cantidad para los grupos 3 (Sac+Gly+EtOH) y 4 (EtOH).

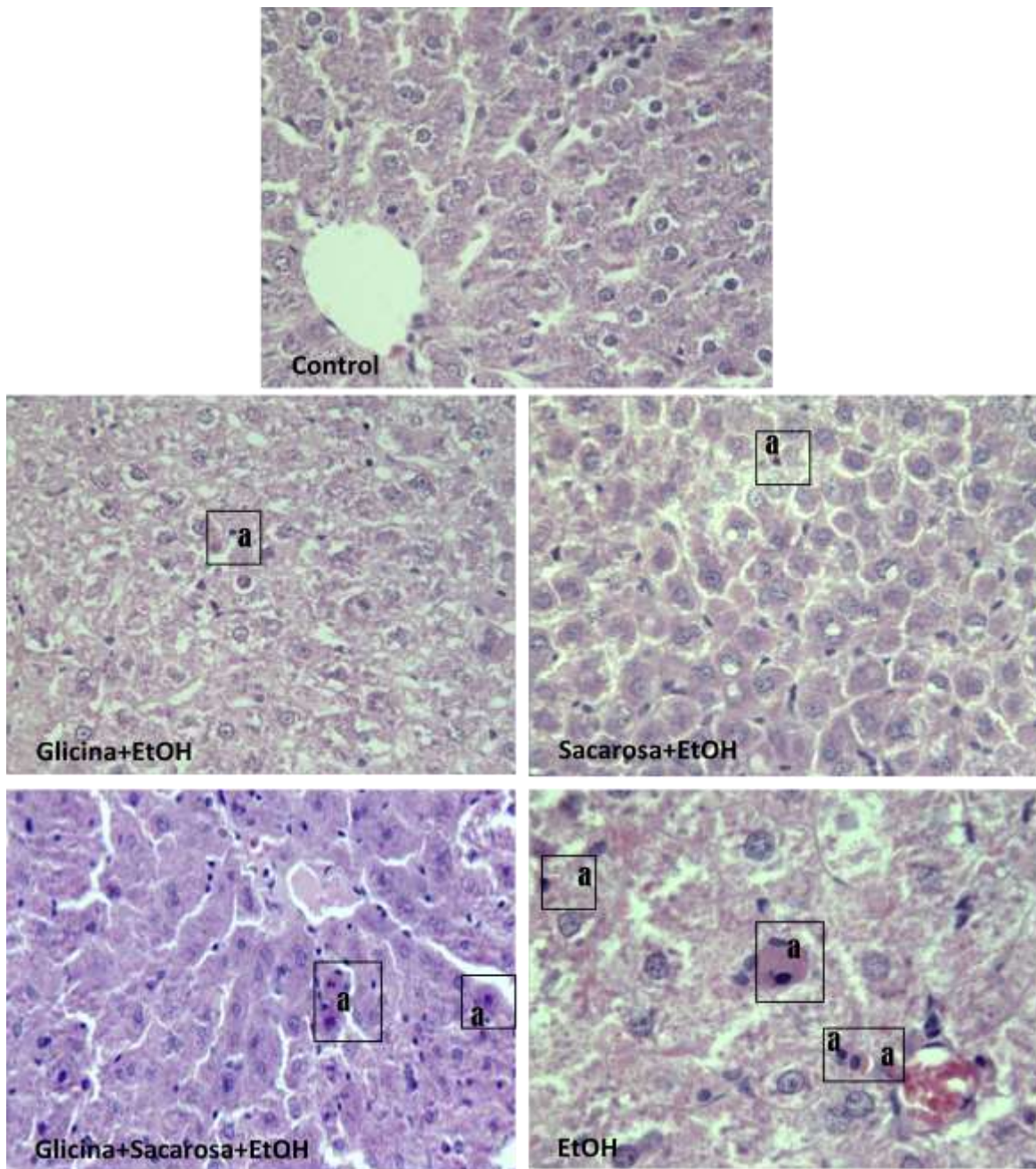


Figura 13. Apoptosis. Las letras **a** indican una célula en proceso apoptótico. El tejido hepático fue teñido con H&E (40x).

En la figura 14 se observa un corte histológico del hígado de una rata control y de las ratas que recibieron tratamiento, en la imagen del grupo control se puede apreciar la forma normal de las células hepáticas (100x), así como en los grupos de experimentación pero resaltando el proceso de mitosis en las células hepáticas.

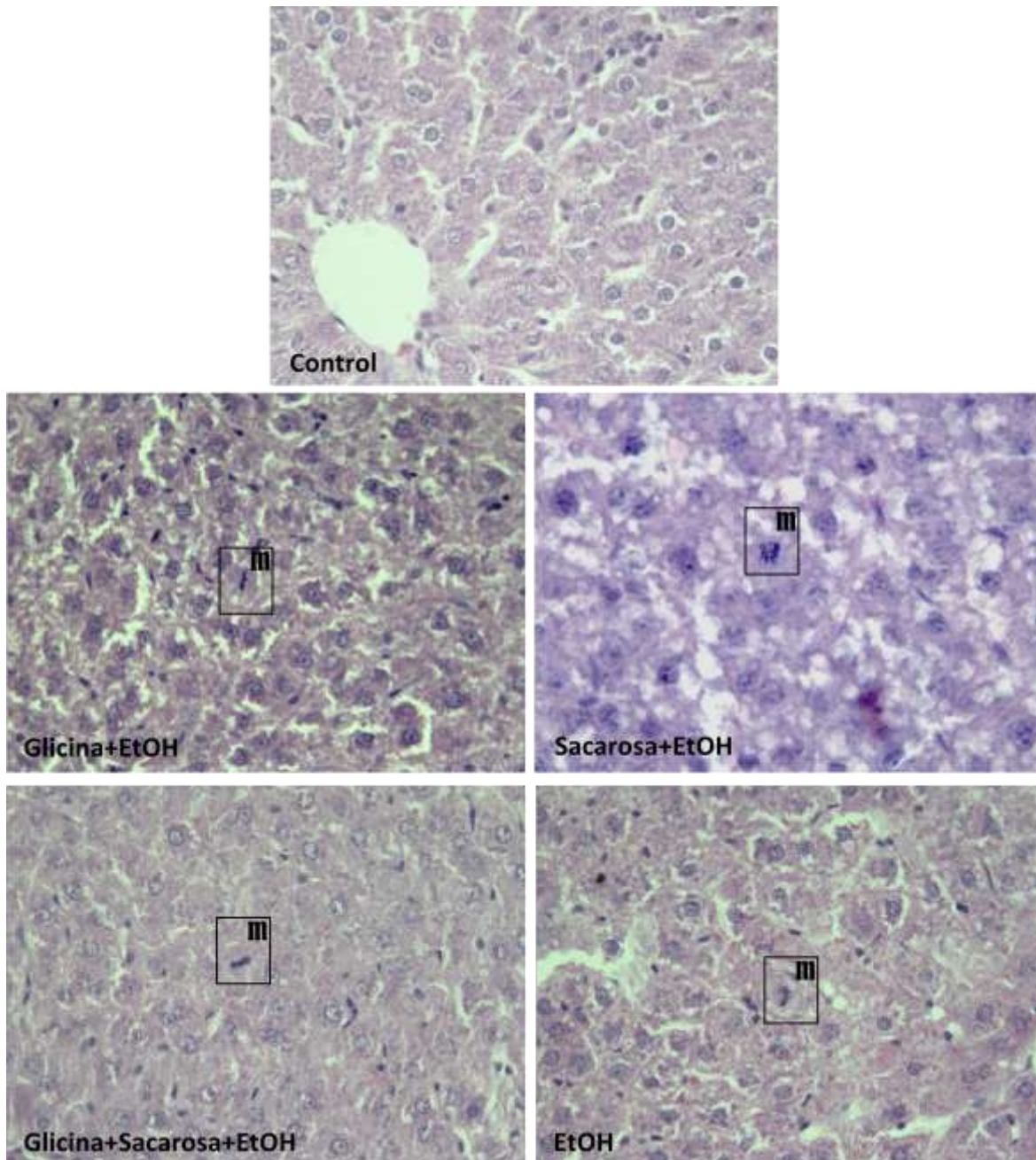


Figura 14. Índice mitótico. Las letras **M** indican una célula en proceso mitótico. El tejido hepático fue teñido con H&E (100x).

La figura 15 muestra un corte histológico del hígado de una rata control y de las ratas que recibieron tratamiento, en la imagen del grupo control se puede apreciar la forma normal de las células hepáticas (40x). En los grupos de experimentación 2 (Sac+Gly+EtOH) y 4 (EtOH) donde los animales consumieron por 12 semanas etanol se observa la inclusión de gotas de grasa en el tejido hepático.

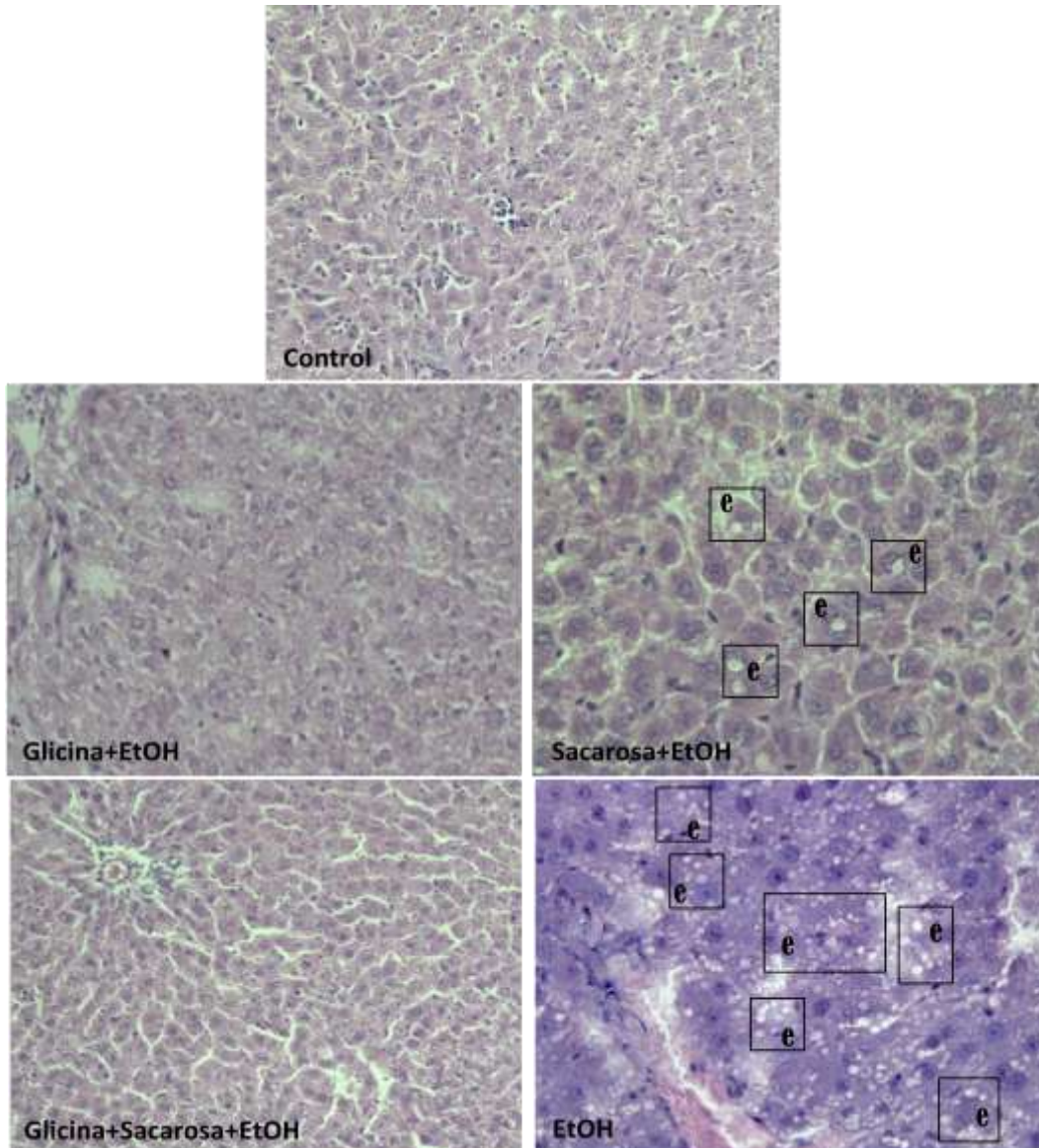


Figura 15. Esteatosis. Las letras **e** indican la presencia de gotas de grasa en el tejido hepático. El tejido hepático fue teñido con H&E (40x).

La figura 16 muestra un corte histológico del hígado de una rata control y de las ratas que recibieron tratamiento, en la imagen del grupo control así como en los grupos 1 (Gly+EtOH), 2 (Sac+EtOH) y 3 (Sac+Gly+EtOH) se puede la arquitectura normal del tejido hepático (40x). En el grupo 4 (EtOH) se observa la presencia de una zona de tejido hepático con necrosis.

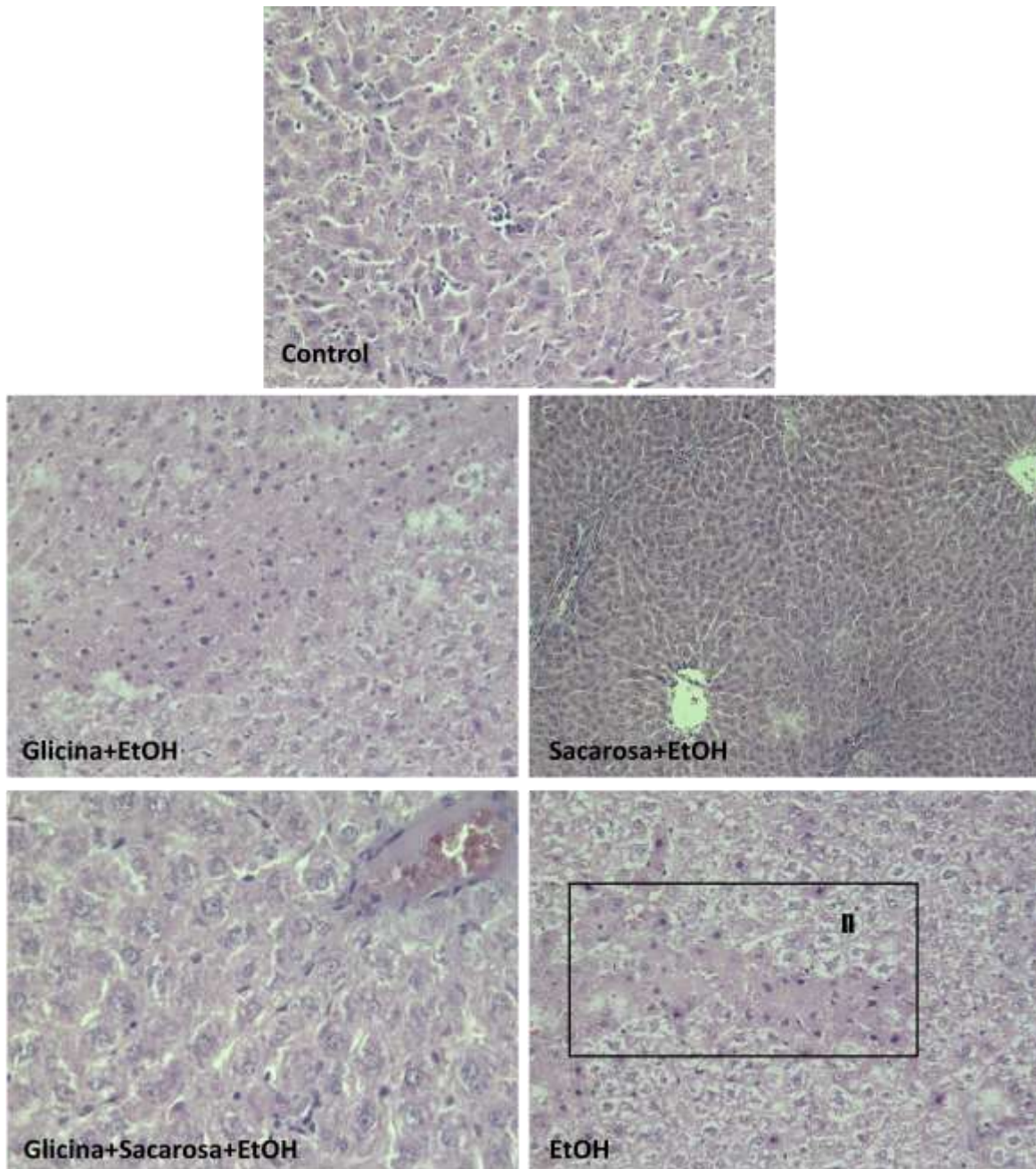


Figura 16. Necrosis. La letra ■ indica la presencia de zona necrótica en el tejido hepático. El tejido hepático fue teñido con H&E (40x).

A la evaluación histológica de duodeno se encuentra para el grupo control una buena organización de tejido duodenal y correcta disposición células epiteliales y glandulares, en todos los grupos de experimentación se encuentran cúmulos de polimorfonucleares que indican aumento en la inflamación.

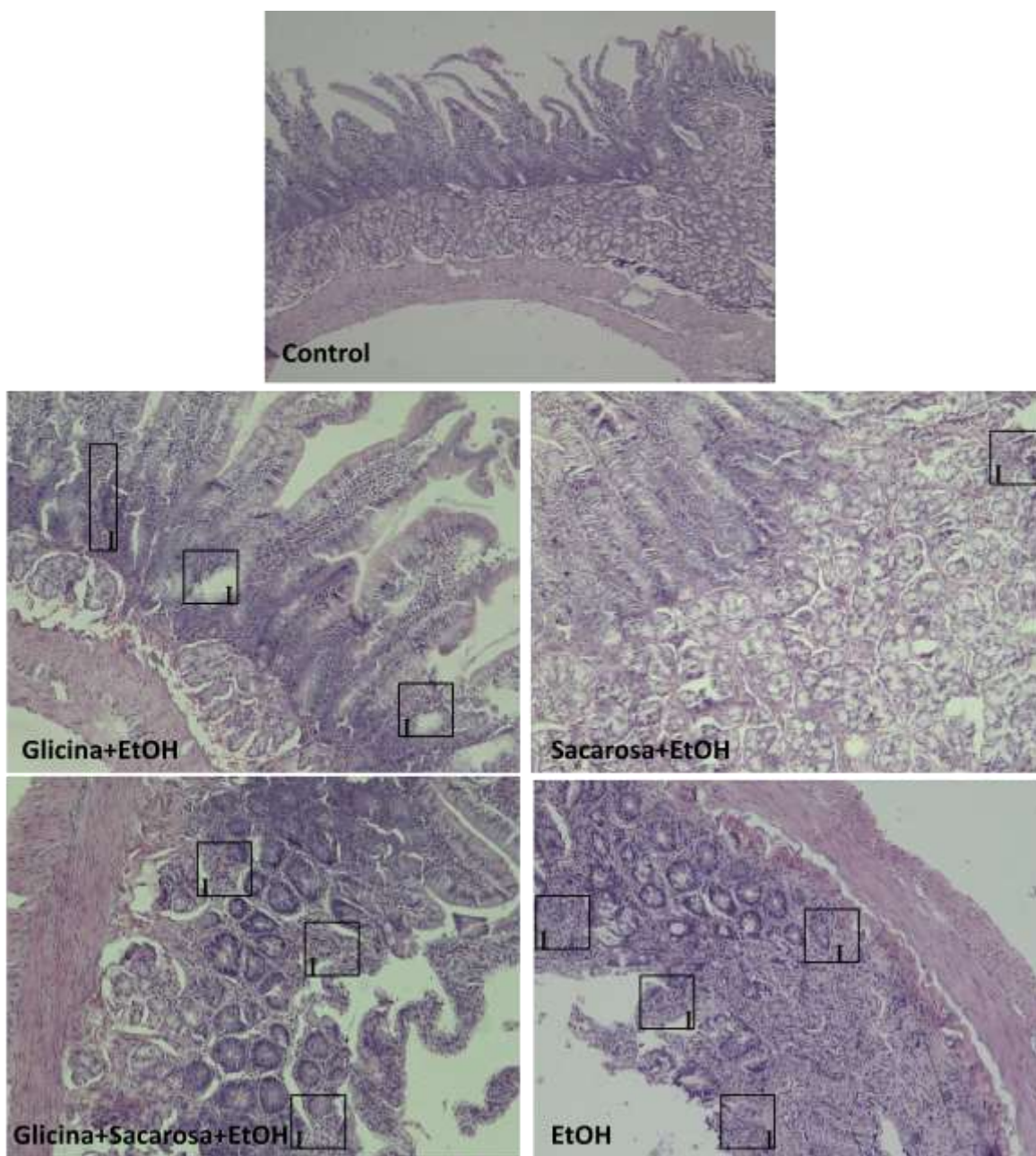


Figura 17. Filtrado inflamatorio. La letra **I** indica la filtración de células inflamatorias al tejido duodenal. El tejido duodenal fue teñido con H&E (40x).

A la evaluación histológica de duodeno se encuentra para el grupo control una buena organización de tejido duodenal y correcta disposición células epiteliales y glandulares, en todos los grupos de experimentación se observan procesos mitóticos.

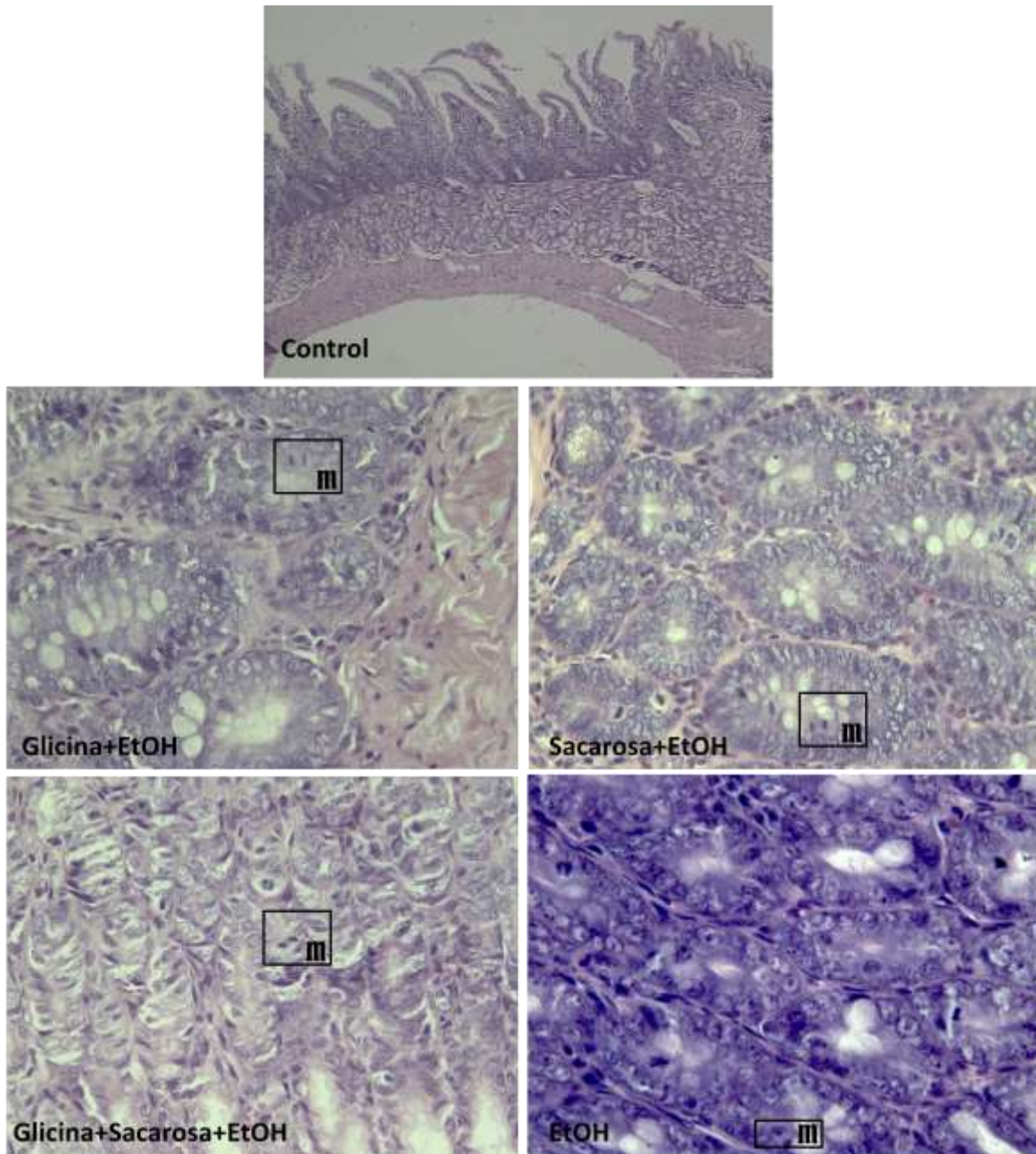


Figura 18. Índice mitótico. La letra **m** indica las células que se encuentran en fases del proceso mitótico en tejido duodenal. El tejido duodenal fue teñido con H&E (100x).

La figura 19 muestra la organización del tejido duodenal tanto en el grupo control como en los grupos experimentales, sin embargo los grupos experimentales 3 (Sac+Gly+EtOH) y 4 (EtOH) presentan células en procesos apoptóticos.

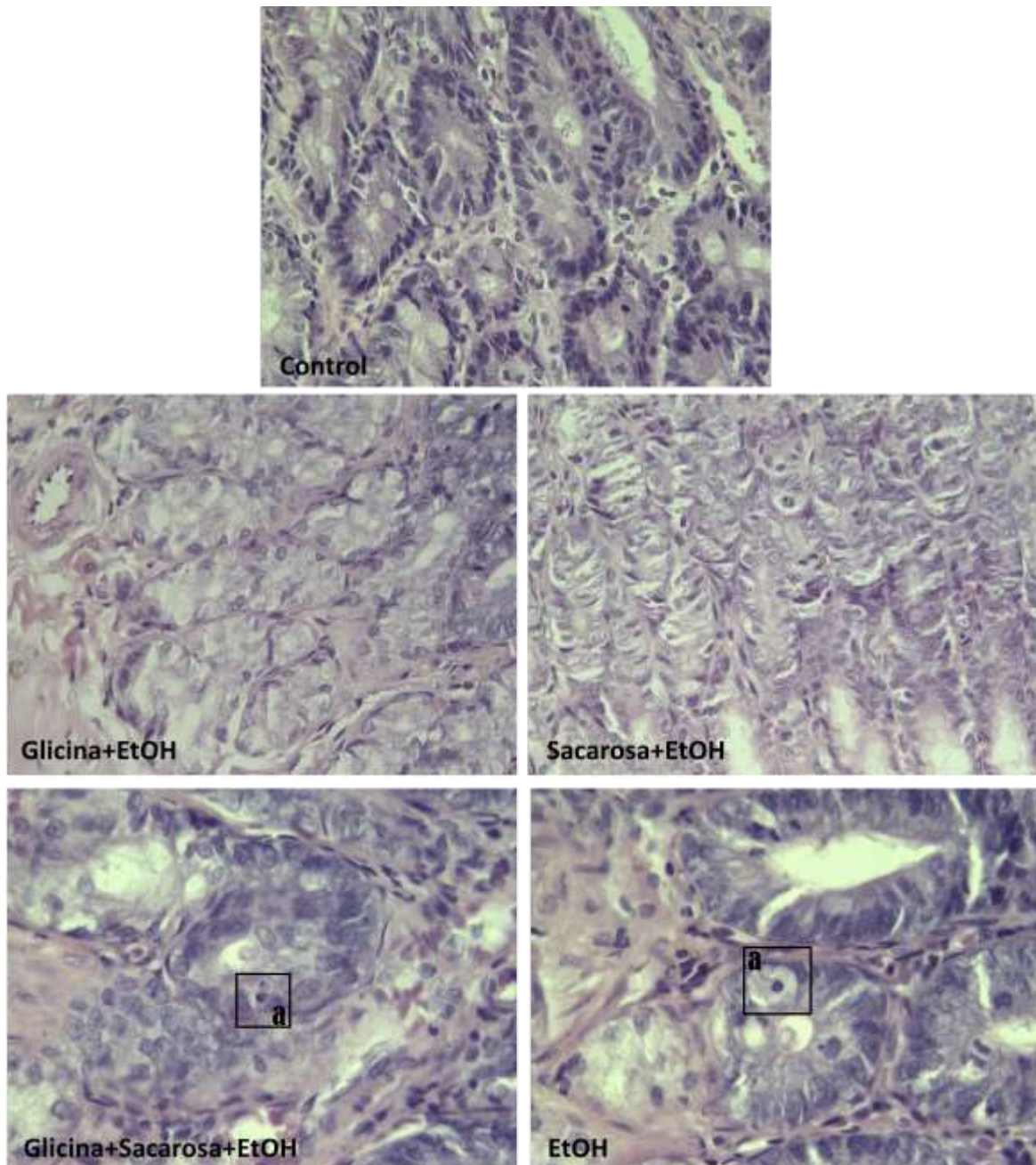


Figura 19. Apoptosis. La letra **a** indica las células que se encuentran en proceso de apoptosis en tejido duodenal. El tejido duodenal fue teñido con H&E (100x).

Grupo	Desorganización hepatocelular	Esteatosis	Inflamación	Índice mitótico	Apoptosis	Necrosis
HÍGADO						
Control	-	-	-	-	-	-
Gpo 1 Gly+EtOH	-	-	*	*	*	-
Gpo 2 Sac+EtOH	-	*	-	*	*	-
Gpo 3 Gly+Sac+EtOH	-	-	*	*	*	-
Gpo 4 EtOH	*	***	**	*	**	*
DUODENO						
Control	-	-	-	**	-	-
Gpo 1 Gly+EtOH	-	-	*	**	-	-
Gpo 2 Sac+EtOH	-	-	*	*	-	-
Gpo 3 Gly+Sac+EtOH	-	-	***	**	*	-
Gpo 4 EtOH	-	-	***	*	*	-

Tabla 2. Evaluación histológica de hígado y duodeno

- No aparece ninguna característica

* leve

** moderado

*** severo

9. DISCUSIÓN

El etanol al ser consumido desencadena una serie de reacciones bioquímicas que produce la afectación de diversos órganos, teniendo como resultado el desarrollo de enfermedades hepáticas como la hepatitis alcohólica y la cirrosis, aunque es bien sabido la mayor parte de los mecanismos fisiopatológicos que desencadena el etanol en el cuerpo humano, no se puede generalizar un proceso para el daño en el organismo; en la administración crónica de etanol el factor que desencadena este daño es la generación excesiva de especies reactivas del oxígeno, las que desencadenan la formación del estrés oxidativo, produciendo este las alteraciones en la mayor parte de los mecanismos fisiopatológicos ya que al oxidar moléculas biológicas las alteran y desencadenan trastornos en el metabolismo celular, que culmina en la activación del mecanismo de muerte celular programada (apoptosis), desorganización hepatocelular, demostrado con el estudio histológico de esta y otras investigaciones (Morales-González *et al.*, 1999).

Respecto a la concentración sérica de glucosa, se observa un leve incremento en los grupos donde se les administró etanol, pero estos parámetros se modificaron favorablemente con la administración del antioxidante glicina disminuyéndolos aun más del valor del grupo control, mostrando una respuesta contraria al utilizar la combinación de la glicina y la sacarosa como tratamiento compuesto. Estos datos sugieren que la utilización de glicina resulta benéfica en la protección del daño al hígado al mismo tiempo que se produce un daño hepático como se observa en una investigación realizada por Czachowski en 1999.

En la albúmina se presentó un comportamiento de aumento en las concentraciones séricas viéndose que la cantidad más elevada de esta proteína está en el grupo donde se administró el efecto tóxico por la administración única de etanol (grupo 4), observando un comportamiento inverso con la administración aguda que tiene como resultado la disminución en los niveles en la investigación

reportada por Morales-González en 1999. Aunque no se encuentra una diferencia significativa en la disminución de las cifras para los grupos con tratamiento de glicina, sacarosa o la combinación.

Los triacilglicéridos forman parte esencial del metabolismo lipídico en el organismo, el aumento en la concentración sérica en el grupo con consumo de etanol es del 56% en comparación con el grupo control, así mismo este dato disminuye con el tratamiento único de sacarosa en un 51% llevando las cifras por debajo de las del grupo control, este patrón de disminución se continúa con el tratamiento en la combinación de glicina y sacarosa como tratamiento compuesto, sin embargo, para este caso las cifras siguen estando aumentadas con respecto al grupo control, en un 18%, conducta similar a la presentada en investigaciones realizadas por Morales-González en 1999. El aumento en las cifras deja ver que esta sobreproducción hepática y/o disminución en la absorción intestinal de los triacilglicéridos puede ser un evento fundamental para disparar el mecanismo de formación de ateromas en arterias y aumento en el almacenamiento de estas grasas en el tejido adiposo condicionando así el aumento de peso presente en los grupos donde se es evidente el aumento en la concentración de lípidos como sugieren resultados obtenidos por Mudrakova en el año 2007. Aunado a este resultado de hipertrigliceridemia producida por consumo de etanol, los resultados evidencian una disminución de colesterol sérico en un 44% en el grupo tratado con sacarosa (Figura 8), lo que puede conducir que al estar disminuida la concentración de colesterol en suero estas moléculas se han quedado almacenadas en otros órganos, promoviendo un factor de riesgo cardiovascular.

El incremento que se observó en las concentraciones de bilirrubina directa en los animales que consumieron etanol por 12 semanas demuestra que en todos los casos se presenta un daño hepático aunque este se ve disminuido al administrar sacarosa o la combinación de esta con el antioxidante glicina, aunque los valores no alcanzan cifras normales, comparando el mismo proceso en la administración aguda del etanol realizado por Ramírez-Farías en el 2008. Este

comportamiento se da como respuesta a una inflamación aguda del hígado que produce elevaciones importantes de la bilirrubina por falla de la excreción a nivel de la célula hepática. En estos casos la elevación de bilirrubina es de predominio directo y se acompaña de elevaciones importantes de aminotransferasas. La actividad de las enzimas alanino aminotrasferasa y aspartato aminotransferasa mostró una disminución en el grupo que recibió sacarosa junto con el etanol, sin embargo en los animales que recibieron glicina con etanol el aumento fue significativo respecto a los animales control. Los mecanismos de interacción producidos en la administración crónica (12 semanas) de etanol son múltiples dañando una gran variedad de organelos blanco de hepatocito lo que conduce a la pérdida de la homeostasis celular y por lo tanto, a una vía final común irreversible de muerte celular y necrosis (ver figuras 13 y 16) (Ramírez-Farías *et al.*, 2008).

Una característica del estrés oxidativo en el hepatocito es que existe un aumento importante en la peroxidación lipídica. La peroxidación exagerada de los lípidos tiende a presentarse frecuentemente como resultado de la intoxicación con etanol (xenobiótico de importancia médica) donde su administración crónica aumenta la generación microsomal de las especies reactivas del oxígeno que producen alteraciones a diversos niveles dentro del hepatocito, siendo la generación de la peroxidación lipídica de las membranas y las alteraciones a otros sistemas intracelulares, los resultados “metabólicos” de estos daños causados al hepatocito y por tanto al hígado en general. Los mecanismos que contribuyen en la lesión a los tejidos tanto hepático como duodenal incluyen la generación de especies reactivas del oxígeno por las mismas células del estroma hepático y duodenal, que se relaciona de manera inmediata con la producción excesiva de citocinas teniendo como resultado final el filtrado inflamatorio en el tejido, presente en todos los grupos con administración de etanol en forma crónica como se muestra en las figuras 12 y 17.

El daño causado en la cadena respiratoria mitocondrial es un blanco importante de las especies reactivas del oxígeno generadas en los hepatocitos

expuestos al etanol, provocando alteraciones morfológicas y estructurales tanto en cada organelo como en toda la célula, al hablar de necrosis como daño celular masivo caracterizado por la liberación de enzimas lisosomales generado por agentes químicos como el etanol que es la sustancia tóxica (ver figura 16). Describiendo específicamente a las mitocondrias como la unidad productora de energía y que ésta se ve afectada por la administración aguda y crónica de etanol trayendo consigo el aumento en la producción de especies reactivas del oxígeno que alteran la estructura de la membrana celular del hepatocito por efecto directo del etanol como solvente, llevando consigo la pérdida de la estructura celular y la homeostasis celular hasta concluir en el estado de una célula que representa una amenaza para la integridad del organismo, desencadenando un proceso apoptótico, el cual, se propone como un evento crítico para proteger la homeostasis tisular que asegura el estado de salud de los organismos, de manera que la supresión o sobreexposición de la apoptosis está asociada con el incremento excesivo de especies reactivas del oxígeno. Los cambios morfológicos que se presentan en el proceso de apoptosis son la condensación del citoplasma y reducción del volumen celular acompañado de cambios en la estructura del núcleo como la hiperpigmentación ocasionada por la condensación de la cromatina en forma de estructuras membranosas como se observa en las figuras 13 y 19. Los cambios histopatológicos encontrados en la investigación se ven disminuidos con el uso constante del antioxidante exógeno glicina evitando la formación de especies reactivas del oxígeno y/o capturando aquellas especies que se forman por la administración de etanol, estos resultados se ven de igual forma en investigaciones realizadas con anterioridad (Morales-González *et al.*, 1999 y Jeffery *et al.*, 1997).

Así, una variedad de datos experimentales, como los anteriormente descritos, sugiere que el etanol o sus metabolitos, alteran el equilibrio oxidativo en el hígado llevándolo hacia la autooxidación, al actuar como pro-oxidantes, reduciendo el nivel de antioxidantes, o por ambos mecanismos. Las especies reactivas del oxígeno producidas alteran químicamente a los ácidos grasos

poliinsaturados de la célula al igual que a las proteínas, los carbohidratos e incluso a los ácidos nucleicos.

El posible mecanismo de acción protector para el hígado se refiere al efecto del factor de crecimiento epidermoide sobre la mucosa gastrointestinal y de otros tejidos de tipo epitelial como es el hígado en modelos animales de lesión multiorgánica, inducida por agresión grave de grosor total o por un agente químico que lesiona las mitocondrias (Fausto, 2001), por lo tanto los resultados advierten que el hígado recibe un influjo constante de factor de crecimiento epidermoide derivado de las glándulas de Brunner duodenales por la administración de sacarosa, este influjo del factor de crecimiento epidermoide se lleva a cabo a través de la circulación portal creando el efecto protector directamente en el hígado.

10. CONCLUSIONES

1. Al estudiar los metabolitos séricos de las ratas sujetas a experimentación se denota que el consumo de etanol crónico es capaz de alterar significativamente las funciones metabólicas del organismo, producido por el daño hepático.
2. Al evaluar las enzimas séricas indicadoras de daño hepático se encontró que la sacarosa es capaz de evitar el desarrollo de este daño modulando la producción del factor de crecimiento epidermoide en duodeno por las glándulas de Brunner y así producir el efecto protector que ejerce este factor sobre el hígado.
3. Al identificar los cambios histológicos presentes en el tejido hepático de ratas con consumo crónico de etanol se demuestra que el alcohol modificó la histología normal del tejido produciendo apoptosis, necrosis, esteatosis e inflamación, lo que conduce a las células a la destrucción.
4. Observando la histología del tejido hepático se demuestra que tanto la glicina como la sacarosa administradas de forma individual producen un efecto protector para este tejido.
5. Al analizar los cambios histológicos presentes en duodeno de ratas con consumo crónico de etanol se demuestra que el alcohol modificó la histología normal produciendo inflamación y apoptosis.
6. Al analizar la histología del tejido duodenal se demuestra que la sacarosa presenta un efecto protector contra el daño que el etanol produce a este tejido.
7. La utilización de un antioxidante exógeno como la glicina se observa un efecto hepatoprotector al evitar la excesiva formación de especies reactivas del oxígeno y capturar aquellos que se han formado.
8. El tratamiento realizado con la unión de glicina y sacarosa no es benéfico para reducir el daño producido por la administración crónica de etanol en una concentración de 5%.

11. REFERENCIAS

1. Adachi, M., e Ishii, H. 2002. Role of mitochondria in alcoholic liver injury. *Free radical biology & Medicine. Hepatic.* 32:487-491.
2. Ahnen, D.J., Poulson, R., Stamp, G.W.H. 1994. The ulceration associated cell lineage (UACL) reiterates the Brunner's gland differentiation programme but acquires the proliferative organization of the gastric gland. *J. Pathol.* 173:317-326.
3. Araki, T., Ito, M., Oscarsson, O. 1961. Anion permeability of the synaptic and non-synaptic motoneurone membrane. *J Physiol.* 159:410-435.
4. Bouwens, L. 1988. Structural and functional aspects of Kupffer cells. *Revis. Biol. Celular.* 16:69-94.
5. Clarkson, M.P., y Thompson, H.S. 2000. Antioxidants:What role do they in physical and health?. *Am. J. Clin. Nut.* 72:637-646.
6. Cohen, S. M., Sotil, E. U., Woon, S. E., Savo, A. M., Reau, N., Jensen, D. M., Wiley-Lucas, T. y Dodson, F. 2005. Liver. *Hepatic.* 23:244-246.
7. Cortes, P. Riquelme, A. y Arrese, M. 2002. Valoración del pronóstico vital en la cirrosis hepática. *Gastr Latinoam.* 13:107-15.
8. Czachowski, C. L., Samson, H. H. y Denning, C. E. 1999. Ethanol concentrations in rats drinking sucrose/ethanol solutions. *Alcohol. Clin.* 23:1331-1335.
9. Del Monte, U., Capaccioli, S., Cini, N. G., Perego, R., Caldini, R. y Chevanne, M. 1986. Effects of liver regeneration on tRNA contents and aminoacyl-tRNA synthetase activities and sedimentation patterns. *Biochem. J.* 236:163-169.
10. Devlin, T. 2002. Biochemistry with clinical correlations. *Biochem. J.* 286:590-592.
11. Fausto, N. 2000. Liver regeneration. *Journal of hepatology.* 32:S19-S31.
12. Fausto, N. 2001. Growth factors in liver development, regeneration and carcinogenesis. *Progress in Growth Factors Research.* 3:219-234.

13. Gallucci, R. M., Simeonova, P. P., Toriumi, W. y Luster, M.I. 2000. TNF- α regulates transforming growth factor- α expression in regenerating murine liver and isolated hepatocytes. *J. Immunology*. 164:872-878.
14. Gessner, P. K. 1993. Alcoholes. En: Farmacología. Smith, C. M. y Reynard, A. M. (eds). Panamericana. Madrid, España. Pp: 254-272.
15. Goris, R.J., Te Boekhorst, T.P., Nuytinck, J.K., Gimbrere, J.S. 1985. Multiple-organ failure. Generalized autodestructive inflammation? *Arch. Surg.* 120:1109-1115.
16. Gutiérrez-Salinas, J., Aranda-Fraustro, A., Paredes-Díaz, R. y Hernández-Muñoz, R. 1996. Sucrose administration to partially hepatectomized rats: a possible model to study ethanol-induced inhibition of liver regeneration. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 28:1007-1016.
17. Gutiérrez, J. y Morales, J. 2004. Producción de radicales libres derivados del oxígeno y el daño al hepatocito. *Med. Int. Mex.* 20:287-295.
18. Gutiérrez, J. y Morales, J. 2006. La ingesta de fluoruro de sodio produce estrés oxidativo en la mucosa bucal de la rata. *Revista Mexicana de Ciencias.* 37:11-22.
19. Halvorsen, L.B., Holte, K., Myhrstad, W. C., Barikmo, I. Hvattum, E., Remberg, F.S., Wold, A., Haffner, K., Baugerod, H., Andersen, F.L., Moskaug, O.j., Jacobs, R.D., y Blom Hof, R. 2002. A systemic Screening of total antioxidants in dietary plants. *J. Nutr.* 132:461-471.
20. Higgins, G. M. y Anderson, R. M. 1931. Experimental pathology of the liver. *Arch. Path.* 7:186-201.
21. Ikejima, K., Iimuro, Y., Forman, D.T., Thurman, R.G. 1996. A diet containing glycine improves survival in endotoxin shock in the rat. *Am. J. Physiol.* 271:97-103.
22. Ikejima, K., Qu, W., Stachlewitz, R.F., Thurman, R.G. 1997. Kupffer cells contain a glycine-gated chloride channel. *Am. J. Physiol.* 272:G1581-G1586.
23. Ishizaki, S., Sonakaa, Y., Takeib, Y., Ikejimab, K. y Satob, N. 2004. The glycine analogue, aminomethanesulfonic acid, inhibits LPS-induced production of TNF- α in isolated rat Kupffer cells and exerts hepatoprotective

- effects in mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 322:514-519.
24. Jaeschke, H., Farhood, A. 1991. Neutrophil and Kupffer cell-induced oxidant stress and ischemia-reperfusion injury in rat liver. *Am. J. Physiol.* 260:355-362.
25. James, A.H. 1964. Gastric epithelium in the duodenum. *Gut*. 5:285-294.
26. Jeffery, P.K., Li, D. 1997. Airway mucosa: secretory cells, mucus and mucin genes. *Eur. Respir. J.* 10:1655-1662.
27. Jentsch, T.J., Gunther, W. 1997. Chloride channels: An emerging molecular picture. *Bioessays*. 19:117-126.
28. Kalant, H. 1971. Absorption, diffusion, distribution and elimination of ethanol: effects on biological membranes. En: *The biology of alcoholism*. Kissin, B. y Begleiter, H. (eds). Plenum press. Biochemistry. New York, EU. vol. 1, pp:1-62.
29. Kelly, E. J., Newell, S. J., Brownlee, K. G., Farmery, S. M., Cullinane, C., Reid, W. A., Jackson, P., Gray, S. F., Primrose, J. N. y Lagopoulos, M. 1996. Role of epidermal growth factor and transforming growth factor α in the developing stomach. *Child. Fet. Neon.* 76:158-162.
30. Lamboeuf, Y. y De Saint Blanquat, G. 1980. Effects of cyanamide and clofibrate on the enzymes of ethanol oxidation and on ethanol consumption in the rat. *Archives Internarional of Pharmacodynamie at the therapie. J. Biochem.* 243: 17-26.
31. Lamboeuf, Y., De Saint Blanquat, G. y Derache, R. 1981. Mucosal alcohol dehydrogenase and aldehyde dehydrogenase mediated ethanol oxidation in the digestive tract of the rat. *Archives Biochemical pharmacology. J. Biochem.* 30: 542-545.
32. Laniado, M.E., Abel, P.D., Lelani, E.N. 1997. Ion channels: New explanations for old diseases. *Br. Med. J.* 315:1171-1172.
33. Lesson, T.S., Lesson, C.R., Paparo, A.A. 2003. *Histología. Interamericana* Mc Graw-Hill, 1a. ed. 11a. reimpresión. Mexico, DF. 435-454.

34. López, C.K.G. Efecto del consumo de etanol en fin de semana a dos diferentes concentraciones. XL Congreso Nacional de Ciencias Farmacéuticas. Mérida, Yucatán., México. 2007.
35. Mascorro, J. A., Ladd, M. W. y Yates, R. D. 1976. Rapid infiltration of biological tissues utilizing *n*-hexenylsuccinic anhydride (HXSA)/vinyl cyclohexene dioxide (VCD) and ultra-low viscosity embedding medium. *Proc. Ann. Meeting Electron Microsc. Soc. Am.* 34:346-347.
36. Matilla, B., Mauriz, J. L., Culebras, J. M., Gonzalez-Gallego, J. y Gonzalez, P. 2002. La glicina: un nutriente antioxidante protector celular. *Nutr. Hosp.* 17:2-9.
37. Mendenhall, C. L., Rouster, S. D., Roselle, G. A., Grossman, C. J., Ghosn, S. y Gartside, P. 1993. Impact of chronic alcoholism on the aging rat: change in nutrition, liver composition, and mortality. *Alcohol. Clin. J.* 17:848-853.
38. Michalopoulos, G. K. 1990. Liver regeneration: molecular mechanisms of growth control. *J. FASEB.* 4:176-187.
39. Morales-González, J.A., Bueno-Cardoso, A., Marichi-Rodríguez, F., Gutiérrez-Salinas, J. 2004. Programmed cell death (apoptosis): the regulating mechanisms of cellular proliferation. *Arch. Neurocién.* 9:85-93.
40. Morales-González, J.A., Gutiérrez-Salinas, J., Yañez, L., Villagómez-Rico, C., Badillo-Romero, J., Hernández-Muñoz, R. 1999. Morphological and biochemical effects of a low ethanol dose on rat liver regeneration. Role of route and timing of administration. *Diges. Dis. Sci.* 44:1963-1974.
41. Morland, J., Bessesen, A., Smith-Kielland, A. y Wallin, B. 1983. Ethanol and protein metabolism in the liver. *Pharmacology Biochemistry.* 18: S251-S256.
42. Morsiani, E., Aleotti, A. y Ricci, D. 1998. Haemodynamic and ultrastructural observations on the rat liver after two-thirds partial hepatectomy. *J. Anat.* 192:507-515.
43. Moseley, R. 1996. Evaluation of anormal liver functions test. *Med Clin North Am.* 80:887-906.

44. Mudrakova, E. y Kovar, J. 2007. Ethanol consumption affects lipoprotein lipase gene expression in C57BL/6 mice. *Physiol. Res.* 56:497-501.
45. Nanji, A. y French, S. 2003. Animal models of alcoholic liver disease-focus on the intragastric feeding model. *Hepatic.* 27:325-330.
46. National Library of Medicine.
Dirección: <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/liver.html>. Actualización: 20-marzo-2008., Acceso: 18-agosto-2007.
47. Patrick, W.J.A., Denham, D., Forrest, A.P.M. 1974. Mucous change in the human duodenum: a light and electron microscopic study and correlation with disease and gastric secretion. *Gut.* 15:767-776.
48. Playford, R.J. 1995. Peptides and gastrointestinal mucosal integrity. *Gut.* 37:595-597.
49. Rajendra, S., Lynch, J.W., Schofield, P.R. 1997. The glycine receptor. *Pharmacol. Ther.* 73:121-146.
50. Ramírez-Farías, C., Madrigal-Santillán, E., Gutiérrez-Salinas, J., Rodríguez-Sánchez, N., Martínez-Cruz, M., Valle-Jones, I., Hernández-Ceruelos, A., Morales-González, J.A. 2008. Protective effect of some vitamins against the toxic action of ethanol on liver regeneration induced by partial hepatectomy in rats. *W. J. Gastroent.* 14:899-907.
51. Rivera, D. J., Cuevas, N. L., Shamah, L. T., Villalpando, H. S., Avila, A. M. A. y Jiménez, A. A. 2006. Estado Nutricio. En: Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2006. Olaiz, G., Rivera, J., Shamah, T., Rojas, R., Villalpando, S., Hernández, M. y Sepúlveda, J. (Eds). Panamericana. México, D.F. Pp: 83-121.
52. Rodríguez-Perón, J. M., Mendez J. y Trujillo, L. 2001. Radicales libres en la biomedicina y estrés oxidativo. *Rev Cubana Med Milit.* 30:36-448.
53. Senthilkumar, R. y Nalini, N. 2004. Effect of glycine on tissue fatty acid composition in an experimental model of alcohol-induced hepatotoxicity. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 31:456-461.
54. Serrano, L., Neira, J. L., Sancho, J. 1992. Effect of alanine versus glycine in α -helices on protein stability. *Nature.* 356:453-455.

55. Stolz, D. B., Mars, W. M., Petersen, B. E., Kim, T. H. y Michalopoulos, G. K. 1999. Growth factor signal transduction immediately after two-thirds partial hepatectomy in the rat. *Cancer research*. 59:3954-3960.
56. Wheeler, M.D., Ikejima, K., Enomoto, N. 1999. Glycine: a new anti-inflammatory immunonutrient. *Cell. Mol. Life. Sci.* 56:843-856.
57. Wright, N.A., Pike, C., Elia, G. 1990. Induction of a novel epidermal growth factor-secreting cell lineage by mucosal ulceration in human gastrointestinal stem cells. *Nature*. 343:82-85.
58. Wu, D., y Cederbaum, A. 2003. Alcohol, oxidative stress, and free radical damage, mechanism of injury. *Alcohol Res. Health*. 27:277-284.
59. Yin, M., Ikejima, K., Arteel, G., Seabra, V., Bradford, B., Kono, H., Rusyn, I. y Thurman, R. 1998. Glycine accelerates recovery from alcohol-induced liver injury. *Am. J. Physiol Gastrointestin Liver Physiol*. 286:1014-1019.
60. Zhang, B., Gong, D. y Mei, M. 1999. Protection of regenerating liver after partial hepatectomy from carbon tetrachloride hepatotoxicity in rats: role of hepatic simulator substance. *Gastroenterology and Hepatology*. 14:1010-1017.

12. ANEXOS ANEXO 1



GLUCOSE-TR

Glucosa

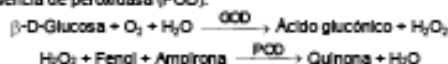
Trinder. GOD-POD

Determinación cuantitativa de glucosa IVD

Conservar a 2-8°C

PRINCIPIO DEL MÉTODO

La glucosa oxidasa (GOD) cataliza la oxidación de glucosa a ácido gluconico. El peróxido de hidrógeno (H₂O₂), producido se detecta mediante un aceptor cromogénico de oxígeno, fenil-ampirona en presencia de peroxidasa (POD):



La intensidad del color formado es proporcional a la concentración de glucosa presente en la muestra ensayada^{1,2}.

SIGNIFICADO CLÍNICO

La glucosa es la mayor fuente de energía para las células del organismo; la insulina facilita la entrada de glucosa en las células.

La diabetes mellitus es una enfermedad que cursa con una hiperglucemia, causada por un déficit de insulina^{1,3,4}.

El diagnóstico clínico debe realizarse teniendo en cuenta todos los datos clínicos y de laboratorio.

REACTIVOS

R 1 Tampón	TRIS pH 7,4 Fenol	92 mmol/L 0,3 mmol/L
R 2 Enzimas	Glucosa oxidasa (GOD) Peroxidasa (POD) 4 - Aminofenazona (4-AF)	15000 U/L 1000 U/L 2,6 mmol/L
GLUCOSE CAL	Patrón primario acuoso de Glucosa 100 mg/dL	

PREPARACIÓN

Reactivo de trabajo (RT): Disolver (->) el contenido de un vial de R 2 Enzimas en un frasco de R 1 Tampón.

Tapar y mezclar suavemente hasta disolver su contenido.

Estabilidad: 1 mes en nevera (2-8°C) o 7 días a Temperatura ambiente (15-25°C).

CONSERVACIÓN Y ESTABILIDAD

Todos los componentes del kit son estables, hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta, cuando se mantienen los frascos bien cerrados a 2-8°C, protegidos de la luz y se evita la contaminación durante su uso.

No usar reactivos fuera de la fecha indicada.

Indicadores de deterioro de los reactivos:

- Presencia de partículas y turbidez.
- Absorbancia (A) del Blanco a 505 nm \geq 0,10.

MATERIAL ADICIONAL

- Espectrofotómetro o analizador para lecturas a 505 nm.
- Cubetas de 1,0 cm de paso de luz.
- Equipamiento habitual de laboratorio.

MUESTRAS

Suero o plasma, libre de hemólisis¹ y LCR.

El suero debe separarse lo antes posible del coágulo.

Estabilidad: La glucosa en suero o plasma es estable 3 días a 2-8°C.

PROCEDIMIENTO

- Condiciones del ensayo:
Longitud de onda: 505 nm (490-550)
Cubeta: 1 cm paso de luz
Temperatura: 37°C / 15-25°C
- Ajustar el espectrofotómetro a cero frente a agua destilada.
- Pipetear en una cubeta:

	Blanco	Patrón	Muestra
RT (mL)	1,0	1,0	1,0
Patrón ^{GLUCOSE CAL} (µL)	-	10	-
Muestra (µL)	-	-	10

- Mezclar e Incubar 10 minutos a 37°C ó 15-20 minutos a temperatura ambiente (15-25°C).

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

CÁLCULOS

$$\frac{(A)\text{Muestra}}{(A)\text{Patrón}} \times 100 (\text{Conc. Patrón}) = \text{mg/dL de glucosa en la muestra}$$

Factor de conversión: mg/dL x 0,0555 = mmol/L.

CONTROL DE CALIDAD

Es conveniente analizar junto con las muestras sueros control valorados: SPINROL H Normal y Patológico (Ref. 1002120 y 1002210).

Si los valores hallados se encuentran fuera del rango de tolerancia, revisar el instrumento, los reactivos y el calibrador.

Cada laboratorio debe disponer su propio Control de Calidad y establecer correcciones en el caso de que los controles.

VALORES DE REFERENCIA¹

Suero o plasma:

$$60 - 110 \text{ mg/dL} \quad \approx \quad 3,33 - 6,10 \text{ mmol/L}$$

LCR:

$$60 - 80 \% \text{ del valor en sangre}$$

Estos valores son orientativos. Es recomendable que cada laboratorio establezca sus propios valores de referencia.

CARACTERÍSTICAS DEL METODO

Rango de medida: Desde el límite de detección de 0,04 mg/dL hasta el límite de linealidad de 500 mg/dL.

Si la concentración es superior al límite de linealidad, diluir la muestra 1/2 con ClNa 9 g/L y multiplicar el resultado final por 2.

Preleición:

	Intra serie (n=20)		Inter serie (n=20)	
Media (mg/dL)	95,8	241	98,4	248
SD	0,81	1,43	1,55	3,73
CV (%)	0,83	0,59	1,58	1,50

Sensibilidad analítica: 1 mg/dL = 0,0036 A.

Exactitud: Los reactivos de SPINREACT (y) no muestran diferencias sistemáticas significativas cuando se comparan con otros reactivos comerciales (x).

Los resultados obtenidos con 50 muestras fueron los siguientes:

Coefficiente de correlación (r): 0,99.

Ecuación de la recta de regresión: y = 1,0x + 0,12.

Las características del método pueden variar según el analizador utilizado.

INTERFERENCIAS

No se han observado interferencias con: hemoglobina hasta 4 g/L, bilirrubina hasta 20 mg/L, creatinina hasta 100 mg/L, galactosa hasta 1 g/L.

Se han descrito varias drogas y otras sustancias que interfieren en la determinación de la glucosa^{5,6}.

NOTAS

- GLUCOSE CAL: Debido a la naturaleza del producto, es aconsejable tratarlo con sumo cuidado ya que se puede contaminar con facilidad.
- La calibración con el Patrón acuoso puede dar lugar a errores sistemáticos en métodos automáticos. En este caso, se recomienda utilizar calibradores séricos.
- Usar puntas de pipeta desechables limpias para su dispensación.
- SPINREACT dispone de instrucciones detalladas para la aplicación de este reactivo en distintos analizadores.

BIBLIOGRAFÍA

- Kaplan A. Glucose. Kaplan A et al. Clin Chem The C.V. Mosby Co. St Louis, Toronto, Princeton 1984; 1033-1038.
- Trinder P. Ann Clin Biochem 1969; 6: 24-33.
- Young DS. Effects of drugs on Clinical Lab. Tests, 4th ed AACCC Press, 1995.
- Young DS. Effects of disease on Clinical Lab. Tests, 4th ed AACCC 2001.
- Burtis A et al. Tietz Textbook of Clinical Chemistry, 3rd ed AACCC 1999.
- Tietz N W et al. Clinical Guide to Laboratory Tests, 3rd ed AACCC 1995.

PRESENTACIÓN

Ref:1001150	4 x 125 mL
Ref:1001151	4 x 250 mL
Ref:1001152	10 x 50 mL



ANEXO 2



ALBUMIN

Albumina

Verde bromocresol. Colorimétrico

Determinación cuantitativa de albúmina

IVD

Conservar a 2-8°C

PRINCIPIO DEL METODO

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 ensayada^{1,2,3,4}.

SIGNIFICADO CLINICO

La albúmina es una de las más importantes proteínas plasmáticas producidas en el hígado.

Entre sus múltiples funciones se incluye nutrición, mantenimiento de la presión oncótica y transporte de sustancias como Ca⁺⁺, bilirrubina, ácidos grasos, drogas y esteroides.

Alteraciones en los valores de albúmina indican enfermedades del hígado, desnutrición, lesiones de la piel como dermatitis, quemaduras severas o deshidratación^{1,7,8}.

El diagnóstico clínico debe realizarse teniendo en cuenta todos los datos clínicos y de laboratorio.

REACTIVOS

R	Verde bromocresol pH 4,2	0.12mmol/L
ALBUMIN CAL	Patrón primario acuoso de Albúmina 5 g/dL	

PREPARACION

El reactivo y calibrador están listos para su uso.

CONSERVACION Y ESTABILIDAD

Todos los componentes del kit son estables hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta, cuando se mantienen los frascos bien cerrados a 2-8°C, protegidos de la luz y se evita la contaminación durante su uso.

No usar reactivos fuera de la fecha indicada.

Indicadores de deterioro de los reactivos:

- Presencia de partículas y turbidez.
- Absorbancia (A) del Blanco a 630 nm \geq 0,40.

MATERIAL ADICIONAL

- Espectrofotómetro o analizador para lecturas a 630 nm.
- Cubetas de 1,0 cm de paso de luz.
- Equipamiento habitual de laboratorio.

MUESTRAS

Suero o plasma libre de hemólisis¹: Estabilidad 1 mes a 2-8°C o 1 semana a 15-25°C.

PROCEDIMIENTO

- Condiciones del ensayo:
Longitud de onda: 630 nm (600-650)
Cubeta: 1 cm paso de luz
Temperatura 15-25°C
- Ajustar el espectrofotómetro a cero frente a agua destilada.
- Pipetear en una cubeta:

	Blanco	Patrón	Muestra
R (mL)	1,0	1,0	1,0
Patrón (Patón) (µL)	--	5	--
Muestra (µL)	--	--	5

- Mezclar e incubar 10 min a temperatura ambiente (15-25°C).
- Leer la absorbancia (A) del Patrón y la muestra, frente al Blanco de reactivo. El color es estable 1 hora a temperatura ambiente.

CALCULOS

$$\frac{(A)_{Muestra}}{(A)_{Patrón}} \times 5 \text{ (Conc Patrón)} = \text{g/dL de albúmina en la muestra}$$

Factor de conversión: g/dL x 144,9 = µmol/L

CONTROL DE CALIDAD

Es conveniente analizar junto con las muestras sueros control valorados:

SPINTROL H Normal y Patológico (Ref. 1002120 y 1002210).

Si los valores hallados se encuentran fuera del rango de tolerancia, revisar el instrumento, los reactivos y el calibrador.

Cada laboratorio debe disponer su propio Control de Calidad y establecer correcciones en el caso de que los controles no cumplan con las tolerancias.

VALORES DE REFERENCIA

3,5 a 5,0 g/dL¹.

Estos valores son orientativos. Es recomendable que cada laboratorio establezca sus propios valores de referencia.

CARACTERÍSTICAS DEL METODO

Rango de medida: Desde el límite de detección de 0,04 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 CINA 9 g/L y multiplicar el resultado final por 2.

Precisión:

	Intraserie (n= 20)		Interserie (n= 20)	
Media (g/dL)	3,38	5,80	3,30	5,67
SD	0,02	0,03	0,26	0,04
CV (%)	0,52	0,49	0,78	0,69

Sensibilidad analítica: 1 g/dL = 0,126 A.

Exactitud: Los reactivos SPINREACT (y) no muestran diferencias sistemáticas significativas cuando se comparan con otros reactivos comerciales (x).

Los resultados obtenidos con 50 muestras fueron los siguientes:

Coefficiente de correlación (r): 0,99.

Ecuación de la recta de regresión: y= 0,98x + 0,09.

Las características del método pueden variar según el analizador utilizado.

INTERFERENCIAS

Bilirrubina hasta 110 mg/L, hemoglobina hasta 1 g/L y Ipermia hasta 10 g/L, interfieren^{1,4}.

Se han descrito varias drogas y otras sustancias que interfieren en la determinación de la albúmina^{8,9}.

NOTAS

- ALBUMIN CAL: Debido a la naturaleza del producto, es aconsejable tratarlo con sumo cuidado ya que se puede contaminar con facilidad.
- La calibración con el Patrón acuoso puede dar lugar a errores sistemáticos en métodos automáticos. En este caso, se recomienda utilizar calibradores séricos.
- Usar puntas de pipeta desechables limpias para su dispensación.
- SPINREACT dispone de instrucciones detalladas para la aplicación de este reactivo en distintos analizadores.

BIBLIOGRAFIA

- Gendler S. Uric acid. Kaplan A et al. Clin Chem The C.V. Mosby Co. St Louis, Toronto, Princeton 1984; 1265-1273 and 425.
- Rodney F L. Clin Chem 1965; 11: 478-487.
- Webster D. Clin Chem. 1974; Acta 53: 109-115.
- Douras BT Clin Chem. 1971; Acta 31: 87-96.
- Young DS. Effects of drugs on Clinical Lab. Tests, 4th ed AACCC Press, 1995.
- Young DS. Effects of disease on Clinical Lab. Tests, 4th ed AACCC 2001.
- Burke A et al. Tietz Textbook of Clinical Chemistry, 3rd ed AACCC 1999.
- Tietz N W et al. Clinical Guide to Laboratory Tests, 3rd ed AACCC 1995.

PRESENTACIÓN

Ref: 1001020 Cont 2 x 250 mL



ANEXO 3



CE TRIGLYCERIDES

Triglicéridos

GPO-POD. Enzimático colorimétrico

Determinación cuantitativa de triglicéridos

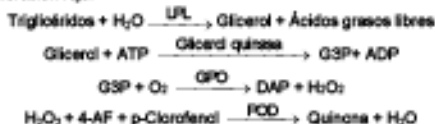
IVD

Conservar a 2-8°C

PRINCIPIO DEL METODO

Los triglicéridos incubados con lipoproteinlipasa (LPL) liberan glicerol y ácidos grasos libres. El glicerol es fosforilado por glicerolfosfato dehidrogenasa (GPO) y ATP en presencia de glicerol quinasa (GK) para producir glicerol-3-fosfato (G3P) y adenosina-5-difosfato (ADP). El G3P es entonces convertido a dihidroacetona fosfato (DAP) y peróxido de hidrogeno (H₂O₂) por GPO.

Al final, el peróxido de hidrogeno (H₂O₂) reacciona con 4-aminofenazona (4-AF) y p-clorofenol, reacción catalizada por la peroxidasa (POD) dando una coloración roja:



La intensidad del color formado es proporcional a la concentración de triglicéridos presentes en la muestra ensayada^{1,2,3}.

SIGNIFICADO CLINICO

Los triglicéridos son grasas que suministran energía a la célula. Al igual que el colesterol, son transportados a las células del organismo por las lipoproteínas en la sangre.

Una dieta alta en grasas saturadas o carbohidratos puede elevar los niveles de triglicéridos.

Su aumento es relativamente inespecífico. Diversas dolencias, como ciertas disfunciones hepáticas (cirrosis, hepatitis, obstrucción biliar) o diabetes mellitus, pueden estar asociadas con su elevación^{3,4,5}.

El diagnóstico clínico debe realizarse teniendo en cuenta todos los datos clínicos y de laboratorio.

REACTIVOS

R 1 Tampón	GOOD pH 7.5 p-Clorofenol	50 mmol/L 2 mmol/L
R 2 Enzimas	Lipoprotein lipase (LPL) Glicerol quinasa (GK) Glicerol-3-oxidasa (GPO) Peroxidasa (POD) 4 - Aminofenazona (4-AF) ATP	150000 U/L 500 U/L 2500 U/L 440 U/L 0,1 mmol/L 0,1 mmol/L
TRIGLYCERIDES CAL	Patrón primario acuoso de Triglicéridos	200 mg/dL

PREPARACION

Reactivo de trabajo (RT): Disolver (→) el contenido de un vial de R 2 Enzimas en un frasco de R 1 Tampón.

Ref: 1001310 Reactivo de trabajo (RT): Reconstruir (→) el contenido de un vial de R 2 Enzimas en 10 mL de R 1 Tampón.

Tapar y mezclar suavemente hasta disolver su contenido.
RT Estabilidad: 6 semanas en nevera (2-8°C) o una semana a 15-25°C.

CONSERVACION Y ESTABILIDAD

Todos los componentes del kit son estables, hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta, cuando se mantienen los frascos bien cerrados a 2-8°C, protegidos de la luz y se evita su contaminación.

No usar reactivos fuera de la fecha indicada.

Indicadores de deterioro de los reactivos:

- Presencia de partículas y turbidez.
- Absorbancia (A) del Blanco a 505 nm ≥ 0,14.

MATERIAL ADICIONAL

- Espectrofotómetro o analizador para lecturas a 505 nm.
- Cubetas de 1,0 cm de paso de luz.
- Equipamiento habitual de laboratorio.

MUESTRAS

Suero y plasma heparinizado o EDTA¹. Estabilidad de la muestra: 5 días a 2-8°C.

PROCEDIMIENTO

- Condiciones del ensayo:
 - Longitud de onda: 505 (400-550) nm
 - Cubeta: 1 cm paso de luz
 - Temperatura: 37°C / 15-25°C
- Ajustar el espectrofotómetro a cero frente a agua destilada.
- Pipetear en una cubeta:

	Blanco	Patrón	Muestra
RT (mL)	1,0	1,0	1,0
Patrón ¹ (μL)	--	10	--
Muestra (μL)	--	--	10

Mazclar e incubar 5 minutos a 37°C o 10 min. a temperatura ambiente.

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

CALCULOS

$$\frac{(A)_{\text{Muestra}}}{(A)_{\text{Patrón}}} \times 200 (\text{Conc. Patrón}) = \text{mg/dL de triglicéridos en la muestra}$$

Factor de conversión: mg/dL x 0,0113 = mmol/L.

CONTROL DE CALIDAD

Es conveniente analizar junto con las muestras sueros control valorados: SPINROL H Normal y Patológico (Ref. 1002120 y 1002210).

Si los valores hallados se encuentran fuera del rango de tolerancia, revisar el instrumento, los reactivos y el calibrador.

Cada laboratorio debe disponer su propio Control de Calidad y establecer conexiones en el caso de que los controles no cumplan con las tolerancias.

VALORES DE REFERENCIA

Hombres: 40 – 160 mg/dL

Mujeres: 35 – 135 mg/dL

Estos valores son orientativos. Es recomendable que cada laboratorio establezca sus propios valores de referencia.

CARACTERISTICAS DEL METODO

Rango de medida: Desde el límite de detección de 0,7 mg/dL hasta el límite de linealidad de 1000 mg/dL.

Si la concentración es superior al límite de linealidad, diluir la muestra 1/2 con ClNa 9 g/L y multiplicar el resultado final por 2.

PRECISION:

Media (mg/dL)	Intraensayo (n=20)		Interensayo (n=20)	
	118	218	119	215
SD	0,67	0,94	2,17	2,91
CV (%)	0,60	0,43	1,83	1,36

Sensibilidad analítica: 1 mg/dL = 0,0012 A.

Exactitud: Los reactivos SPINREACT (y) no muestran diferencias sistemáticas significativas cuando se comparan con otros reactivos comerciales (x).

Los resultados obtenidos con 50 muestras fueron los siguientes:

Coefficiente de correlación (r): 0,996.

Ecuación de la recta de regresión: y = 1,00x + 0,0743.

Las características del método pueden variar según el analizador utilizado.

INTERFERENCIAS

No se han observado interferencias con bilirubina hasta 170 μmol/L y hemoglobina hasta 10 g/L⁶.

Se han descrito varias drogas y otras sustancias que interfieren en la determinación de los triglicéridos^{4,5}.

NOTAS

- TRIGLYCERIDES CAL: Debido a la naturaleza del producto, es aconsejable tratarlo con sumo cuidado ya que se puede contaminar con facilidad.
- LCF (Lipid Clearing Factor) está integrado en el reactivo.
- La calibración con el Patrón acuoso puede dar lugar a errores sistemáticos en métodos automáticos. En este caso, se recomienda utilizar calibradores séricos.
- Usar puntas de pipeta desechables limpias para su dispensación.
- SPINREACT dispone de instrucciones detalladas para la aplicación de este reactivo en distintos analizadores.

BIBLIOGRAFIA

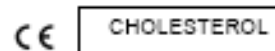
- Buccolo G et al. Quantitative determination of serum triglycerides by use of enzymes. Clin Chem 1973; 19 (5): 478-482.
- Fossati P et al. Clin. Chem 1982; 28(10): 2077-2080.
- Kaplan A et al. Triglycerides. Clin Chem The C.V. Mosby Co. St. Louis, Toronto, Princeton 1984; 437 and Lipids 1194-1208.
- Young DS. Effects of drugs on Clinical Lab. Tests, 4th ed AACCC Press, 1995.
- Young DS. Effects of disease on Clinical Lab. Tests, 4th ed AACCC 2001.
- Burke A et al. Tietz Textbook of Clinical Chemistry, 3rd ed AACCC 1999.
- Tietz N W et al. Clinical Guide to Laboratory Tests, 3rd ed AACCC 1995.

PRESENTACION

Ref: 1001310	Cont.	5 x 10 mL
Ref: 1001311		10 x 20 mL
Ref: 1001312		10 x 50 mL
Ref: 1001313		4 x 125 mL
Ref: 1001314		4 x 250 mL



ANEXO 4



Colesterol

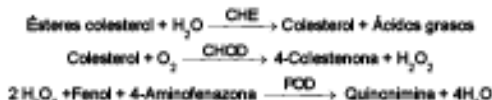
CHOD-POD. Enzimático colorimétrico

Determinación cuantitativa de colesterol IVD

Conservar a 2-8°C

PRINCIPIO DEL METODO

El colesterol presente en la muestra origina un compuesto coloreado según la reacción siguiente:



La intensidad del color formado es proporcional a la concentración de colesterol presente en la muestra ensayada^{1,2}.

SIGNIFICADO CLINICO

El colesterol es una sustancia grasa presente en todas las células del organismo. El hígado produce naturalmente todo el colesterol que necesita para formar las membranas celulares y producir ciertas hormonas. La determinación del colesterol es uno de las herramientas más importantes para el diagnóstico y clasificación de las lipemias. El aumento del nivel de colesterol es uno de los principales factores de riesgo cardiovascular^{3,4}.

El diagnóstico clínico debe realizarse teniendo en cuenta todos los datos clínicos y de laboratorio.

REACTIVOS

R 1	PIPES pH 6,9	90 mmol/L
Tampón	Fenol	25 mmol/L
R 2	Colesterol esterasa (CHE)	300 U/L
	Colesterol oxidasa (CHOD)	300 U/L
	Peroxidasa (POD)	1250 U/L
	4 - Aminofenazona (4-AF)	0,4 mmol/L
CHOLESTEROL CAL	Patrón primario acuoso de Colesterol 200 mg/dL	

PREPARACION

Reactivo de trabajo (RT): Disolver (→) el contenido de un vial de R 2 Enzimas en 1 frasco de R 1 Tampón.
 Tapar y mezclar suavemente hasta disolver su contenido.
 Estabilidad (RT): 4 meses en nevera (2-8°C) o 40 días 15-25°C.
 Mantener protegido de la luz.

CONSERVACION Y ESTABILIDAD

Todos los componentes del kit son estables hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta, cuando se mantienen los frascos bien cerrados a 2-8°C, protegidos de la luz y se evita su contaminación. No usar reactivos fuera de la fecha indicada.

Indicadores de defetoro de los reactivos:

- Presencia de partículas y turbidez.
- Absorbancia (A) del Blanco a 505 nm $\geq 0,1$.

MATERIAL ADICIONAL

- Espectrofotómetro o analizador para lecturas a 505 nm (500-550).
- Cubetas de 1,0 cm de paso de luz.
- Equipamiento habitual de laboratorio.

MUESTRAS

Suero o plasma^{1,2}: Estabilidad de la muestra 7 días a 2-8°C y varios meses si se mantiene la muestra congelada (-20°C).

PROCEDIMIENTO

- Condiciones del ensayo:
 Longitud de onda: 505 nm (500-550)
 Cubeta: 1 cm paso de luz
 Temperatura: 37°C (15-25°C)
- Ajustar el espectrofotómetro a cero frente a agua destilada.
- Pipetear en una cubeta:

	Blanco	Patrón	Muestra
RT (mL)	1,0	1,0	1,0
Patrón ^(200µL) (µL)	-	10	-
Muestra (µL)	-	-	10

- Mezclar e incubar 5 minutos a 37°C ó 10 min. a temperatura ambiente.

- Leer la absorbancia (A) del Patrón y la muestra, frente al Blanco de reactivo. El color es estable como mínimo 60 minutos.

CALCULOS

$$\frac{(A)_{\text{Muestra}}}{(A)_{\text{Patrón}}} \times 200 (\text{Conc. Patrón}) = \text{mg/dL de colesterol en la muestra}$$

Factor de conversión: mg/dL x 0,0258 = mmol/L.

CONTROL DE CALIDAD

Es conveniente analizar junto con las muestras sueros control valorados: SPINROL H Normal y Patológico (Ref. 1002120 y 1002210). Si los valores hallados se encuentran fuera del rango de tolerancia, revisar el instrumento, los reactivos y el calibrador. Cada laboratorio debe disponer su propio Control de Calidad y establecer correcciones en el caso de que los controles no cumplan con las tolerancias.

VALORES DE REFERENCIA

Evaluación del riesgo^{3,4}:

Menos de 200 mg/dL	Normal
200-239 mg/dL	Moderado
240 o más	Alto

Estos valores son orientativos. Es recomendable que cada laboratorio establezca sus propios valores de referencia.

CARACTERÍSTICAS DEL METODO

Rango de medida: Desde el límite de detección de 0,6 mg/dL hasta el límite de linealidad de 600 mg/dL.

Si la concentración es superior al límite de linealidad, diluir la muestra 1/2 con ClNa 9 g/L y multiplicar el resultado final por 2.

Precisión:

	Intra serie (n=20)		Inter serie (n=20)	
Media (mg/dL)	90,1	305	90,4	301
SD	0,64	3,30	1,12	2,30
CV (%)	0,71	1,08	1,24	0,76

Sensibilidad analítica: 1 mg/dL = 0,002 A.

Exactitud: Los reactivos SPINREACT (y) no muestran diferencias sistemáticas significativas cuando se comparan con otros reactivos comerciales (x).

Los resultados obtenidos con 50 muestras fueron los siguientes:

Coefficiente de correlación (r): 0,995.

Ecuación de la recta de regresión: y = 1,004x - 0,931.

Las características del método pueden variar según el analizador utilizado.

INTERFERENCIAS

No se han observado interferencias de hemoglobina hasta 5 g/L y bilirrubina hasta 10 mg/dL^{3,4}.

Se han descrito varias drogas y otras sustancias que interfieren en la determinación del Colesterol^{3,4}.

NOTAS

- CHOLESTEROL CAL: Debido a la naturaleza del producto, es aconsejable tratarlo con sumo cuidado ya que se puede contaminar con facilidad.
- LCF (Lipid Clearing Factor) está integrado en el reactivo.
- La calibración con el Patrón acuoso puede dar lugar a errores sistemáticos en métodos automáticos. En este caso, se recomienda utilizar calibradores séricos.
- Usar puntas de pipeta desechables limpias para su dispensación.
- SPINREACT dispone de instrucciones detalladas para la aplicación de este reactivo en distintos analizadores.

BIBLIOGRAFIA

- Niall H.K. Cholesterol. Kaplan A et al. Clin Chem The C.V. Mosby Co. St Louis, Toronto, Princeton 1984; 1194-11206 and 437.
- Melafini F. et al. The 4-hydroxybenzoate/4-aminophenazone Chromogenic System. Clin Chem 1978; 24 (12): 2161-2165.
- Young DS. Effects of drugs on Clinical Lab. Tests, 4th ed AAC Press, 1995.
- Young DS. Effects of disease on Clinical Lab. Tests, 4th ed AAC Press, 1995.
- Burtis A et al. Tietz Textbook of Clinical Chemistry, 3rd ed AAC Press, 1999.
- Tietz NW et al. Clinical Guide to Laboratory Tests, 3rd ed AAC Press, 1995.

PRESENTACION

Ref: 1001050	10 x 50 mL
Ref: 1001051	10 x 20 mL
Ref: 1001052	4 x 125 mL
Ref: 1001053	4 x 250 mL



ANEXO 5



BILIRUBIN T&D- J

Bilirrubina Total y Directa

Jendrassik – Grof. Colorimétrico

Determinación cuantitativa de bilirrubina IVD

Conservar a 2-8°C

PRINCIPIO DEL MÉTODO

La bilirrubina se convierte en azobilirrubina mediante el ácido sulfanílico diazotado midiéndose fotométricamente. De las dos fracciones presentes en suero, bilirrubin-glucuronido 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^{1,2,3}.

SIGNIFICADO CLÍNICO

La bilirrubina se origina por la degradación de la hemoglobina. Es transportada del hazo al hígado y se secreta en la bñs. La hiperbilirrubinemia es el resultado de un incremento de la bilirrubina en plasma. Causas más probables de la hiperbilirrubinemia: Bilirrubina Total: Aumento de la hemólisis, alteraciones genéticas, anemia neonatal, alteraciones eritropoyéticas, presencia de drogas. Bilirrubina Directa: Colestasis hepática, alteraciones genéticas y alteraciones hepáticas^{1,2,3}. El diagnóstico clínico debe realizarse teniendo en cuenta todos los datos clínicos y de laboratorio.

REACTIVOS

R 1	Ácido sulfanílico	30 mmol/L
	Ácido clorhídrico	400 mmol/L
R 2	Sodio nitrilo	50 mmol/L
R 3	Cafeína	100 mmol/L
Opicional	BILIRUBIN CAL	Ref:1002250

PREPARACIÓN

Todos los reactivos están listos para su uso.

CONSERVACIÓN Y ESTABILIDAD

Todos los componentes del kit son estables hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta del vial, cuando se mantienen los viales bien cerrados a 2-8°C, protegidos de la luz y se evita la contaminación durante su uso.

No usar reactivos fuera de la fecha indicada.

Indicadores de deterioro de los reactivos:

- Presencia de partículas y turbidez.
- Desarrollo de color en el R. 2.

MATERIAL ADICIONAL

- Espectrofotómetro o analizador con cubeta para lecturas a 540 nm.
- Cubetas de 1,0 cm de paso de luz.
- Equipamiento habitual de laboratorio.

MUESTRAS

Suero o plasma libre de hemólisis¹. Proteger de la luz. Estabilidad de la muestra: 4 días a 2-8°C o 2 meses a -20°C.

PROCEDIMIENTO

- Condiciones del ensayo:
Longitud de onda: 540 nm
Cubeta: 1 cm paso de luz
Temperatura: 15-25°C
- Ajustar el espectrofotómetro a cero frente a agua destilada.
- Pipetear en una cubeta:

	B. Total	B. Directa	Bianco
R 1 (µL)	200	200	200
R 2 (µg/dm ³)	1	1	--
CINA 9 µL (mL)	--	2,0	2,0
R 3 (mL)	2,0	--	--
Muestra / Calibrador (µL) ^(R&R)	200	200	200

- Mezclar e incubar exactamente 6 minutos a 15-25°C.
- Leer la absorbancia (A).

CÁLCULOS

- Con Calibrador:

$$\frac{(A)Muestra - (A)Bianco Muestra}{(A)Calibrador - (A)Bianco Calibrador} \times Conc. Calibrador = \text{mg/dL de bilirrubina}$$
 - Con Factor:

$$((A) Muestra - (A) Bianco Muestra) \times Factor^* = \text{mg/dL bilirrubina en la muestra}$$

*Factor: $\frac{\text{Concentración del Calibrador}}{(A) Calibrador - (A) Bianco Calibrador}$; Factor teórico = 17,5

Factor de conversión: mg/dL x 17,1 = µmol/L.

CONTROL DE CALIDAD

Es conveniente analizar junto con las muestras suero control valorado: SPINREACT H Normal y Patológico (Ref. 1002120 y 1002210). Si los valores hallados se encuentran fuera del rango de tolerancia, revisar el instrumento, los reactivos y el calibrador. Cada laboratorio debe disponer su propio Control de Calidad y establecer correcciones en el caso de que los controles no cumplan con las tolerancias.

VALORES DE REFERENCIA¹

Bilirrubina Total Hasta 1,1 mg/dL = 18,81 µmol/L
 Bilirrubina Directa Hasta 0,25 mg/dL = 4,275 µmol/L
 Estos valores son orientativos. Es recomendable que cada laboratorio establezca sus propios valores de referencia.

CARACTERÍSTICAS DEL MÉTODO

Rango de medida: Desde el límite de detección de 0,1 mg/dL hasta el límite de linealidad de 20 mg/dL. Si la concentración de la muestra es superior al límite de linealidad, diluir 1/2 con CINA 9 µL y multiplicar el resultado final por 2.

Precisión:

Bilirrubina D	Intraensayo (n= 20)	Interensayo (n= 20)
Media (mg/dL)	0,78 2,28	0,80 2,18
SD	0,01 0,01	0,01 0,03
CV (%)	1,28 0,65	1,83 1,53

Bilirrubina T	Intraensayo (n= 20)	Interensayo (n= 20)
Media (mg/dL)	1,18 4,21	1,15 4,27
SD	0,02 0,04	0,02 0,13
CV (%)	2,03 1,06	1,91 3,10

Sensibilidad analítica: (T) 1 mg/dL = 0,079 A. (D) 1 mg/dL = 0,087 A.]

Exactitud: Los reactivos SPINREACT (y) no muestran diferencias sistemáticas significativas cuando se comparan con otros reactivos comerciales (x). Los resultados obtenidos con 50 muestras fueron los siguientes:

BILIRUBINA DIRECTA

Coefficiente de correlación (r): 0,99.
 Ecuación de la recta de regresión: y = 0,9923x + 0,0048.

BILIRUBINA TOTAL

Coefficiente de correlación (r): 0,99.
 Ecuación de la recta de regresión: y = 0,9832x + 0,0224.
 Las características del método pueden variar según el analizador utilizado.

INTERFERENCIAS

La presencia de hemólisis disminuye el valor de bilirrubina^{1,2}. Se han descrito varias drogas y otras sustancias que interfieren con la determinación de la bilirrubina^{4,5}.

NOTAS

- Para la determinación de bilirrubina en neonatos, pipetear 50 µL de muestra. Multiplicar el resultado obtenido por 4.
- SPINREACT dispone de instrucciones detalladas para la aplicación de este reactivo en distintos analizadores.

BIBLIOGRAFÍA

- Kaplan A et al. Bilirubin. Clin Chem The C.V. Mosby Co. St Louis, Toronto, Pitocan 1984; 1238-1241, 436 and 650.
- Meloy H T et al. The determination of bilirubin with the photoblastic colorimeter. J Biol Chem 1932; 112 (2): 491-491.
- Jendrassek L et al. Biochemische Zeitschrift Band 1926; 297-60-69.
- Young DS. Effects of drugs on Clinical Lab. Tests, 4th ed. AACO Press, 1995.
- Young DS. Effects of disease on Clinical Lab. Tests, 4th ed. AACO 2001.
- Burt's A et al. Textbook of Clinical Chemistry, 3rd ed. AACO 1999.
- Text N W et al. Clinical Guide to Laboratory Tests, 3rd ed. AACO 1995.

PRESENTACIÓN

Ref: 1001041

Cont.	R. 1	1 x 60 mL
	R. 2	1 x 10 mL
	R. 3	1 x 150 mL



ANEXO 6



CE GOT (AST)

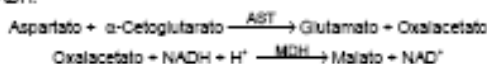
GOT (AST)
NADH. Cinético UV. IFCC rec.

Determinación cuantitativa de aspartato aminotransferasa GOT (AST) IVD

Conservar a 2-8°C

PRINCIPIO DEL METODO

La aspartato aminotransferasa (AST) inicialmente llamada transaminasa glutámico oxalacética (GOT) 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:



La velocidad de disminución de la concentración de NADH en el medio, determinada fotométricamente, es proporcional a la concentración catalítica de AST en la muestra ensayada.

SIGNIFICADO CLINICO

La AST es una enzima intracelular, se encuentra en niveles altos en el músculo del corazón, las células del hígado, las células del músculo esquelético y en menor cantidad en otros tejidos.

Aunque un nivel elevado de AST en suero no es específico de enfermedad hepática se emplea principalmente para su diagnóstico y seguimiento, junto con otras enzimas como la ALT y ALP. También se utiliza en el control post-infarto, en pacientes con desórdenes del músculo esquelético, y en otras afecciones^{1,2,3}.

El diagnóstico clínico debe realizarse teniendo en cuenta todos los datos clínicos y de laboratorio.

REACTIVOS

R 1	TRIS pH 7,8	80 mmol/L
Tampón	L-Aspartato	200 mmol/L
R 2	NADH	0,18 mmol/L
Substrato	Lactato deshidrogenasa (LDH)	800 U/L
	Malato deshidrogenasa (MDH)	600 U/L
	α -Cetoglutarato	12 mmol/L

PREPARACION

Reactivo de trabajo (RT):

Ref: 1001160 Dissolver (→) una tableta de R2 Substrato en un vial de R1.

Ref: 1001161 Dissolver (→) una tableta de R2 Substrato en 15 mL de R1.

Ref: 1001162 Dissolver (→) una tableta de R2 Substrato en 50 mL de R1.

Tapar y mezclar suavemente hasta disolver su contenido.

Estabilidad: 21 días a 2-8°C o 72 horas a temperatura ambiente.

CONSERVACION Y ESTABILIDAD

Todos los componentes del kit son estables, hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta, cuando se mantienen los frascos bien cerrados a 2-8°C, protegidos de la luz y se evita su contaminación.

No usar las tabletas si aparecen fragmentadas.

No usar reactivos fuera de la fecha indicada.

Indicadores de deterioro de los reactivos:

- Presencia de partículas y turbidez.
- Absorbancias del Blanco a 340 < 1,00.

MATERIAL ADICIONAL

- Espectrofotómetro o analizador para lecturas a 340 nm.
- Baño termostatable a 25°C, 30°C ó 37°C (\pm 0,1°C)
- Cubetas de 1,0 cm de paso de luz.
- Equipamiento habitual de laboratorio.

MUESTRAS

Suero o plasma¹. Estabilidad de la muestra: 7 días a 2-8°C.

PROCEDIMIENTO

1. Condiciones del ensayo:

Longitud de onda: 340 nm

Cubeta: 1 cm paso de luz

Temperatura constante 25°C / 30°C / 37°C

2. Ajustar el espectrofotómetro a cero frente a agua destilada o aire.

3. Pipetear en una cubeta:

RT (mL)	1,0
Muestra (μ L)	100

4. Mezclar, incubar 1 minuto.

5. Leer la absorbancia (A) inicial de la muestra, poner en marcha el cronómetro y leer la absorbancia cada minuto durante 3 minutos.

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

CALCULOS

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

Unidades: La unidad internacional (UI) es la cantidad de enzima que convierte 1 μ mol de sustrato por minuto, en condiciones estándar. La concentración se expresa en unidades por litro (U/L).

Factores de conversión de temperaturas

Los resultados pueden transformarse a otras temperaturas multiplicando por:

Temperatura de medición	Factor para convertir a		
	25°C	30°C	37°C
25°C	1,00	1,37	2,08
30°C	0,73	1,00	1,54
37°C	0,48	0,65	1,00

CONTROL DE CALIDAD

Es conveniente analizar junto con las muestras sueros control valorados:

SPINCONTROL H Normal y Patológico (Ref. 1002120 y 1002210).

Si los valores hallados se encuentran fuera del rango de tolerancia, se debe revisar el instrumento, los reactivos y la técnica.

Cada laboratorio debe disponer su propio Control de Calidad y establecer correcciones en el caso de que los controles no cumplan con las tolerancias.

VALORES DE REFERENCIA¹

	25°C	30°C	37°C
Hombres	Hasta 19 U/L	26 U/L	38 U/L
Mujeres	Hasta 16 U/L	22 U/L	31 U/L

Estos valores son orientativos. Es recomendable que cada laboratorio establezca sus propios valores de referencia.

CARACTERISTICAS DEL METODO

Rango de medida: Desde el límite de detección 5,44 U/L hasta el límite de linealidad 280 U/L.

Si la concentración de la muestra es superior al límite de linealidad, diluir 1/10 con ClNa 9 g/L y multiplicar el resultado final por 10.

Reacción:

	Intraensayo (n= 20)	Interensayo (n= 20)
Media (U/L)	17,4	128
SD	0,68	1,35
CV (%)	3,91	1,05
	4,20	0,90

Sensibilidad analítica: 1 U/L = 0,0017 $\Delta A/\text{min}$.

Exactitud: Los reactivos SPINREACT (y) no muestran diferencias sistemáticas significativas cuando se comparan con otros reactivos comerciales (x).

Los resultados obtenidos con 50 muestras fueron los siguientes:

Coefficiente de regresión (y): 0,99

Ecuación de la recta de regresión: $y = 0,99x + 1,33$.

Las características del método pueden variar según el analizador utilizado.

INTERFERENCIAS

Los anticoagulantes de uso corriente como la heparina, EDTA oxalato o fluoruro no afectan los resultados. La hemólisis interfiere con la determinación¹.

Se han descrito varias drogas y otras sustancias que interfieren en la determinación de la AST^{1,2}.

NOTAS

SPINREACT dispone de instrucciones detalladas para la aplicación de este reactivo en distintos analizadores.

BIBLIOGRAFIA

- Murray R. Aspartato aminotransferasa. Kaplan A et al. Clin Chem The C.V. Mosby Co. St Louis, Toronto, Princeton 1984; 1112-118.
- Young DS. Effects of drugs on Clinical Lab. Tests, 4th ed AACCC Press, 1995.
- Young DS. Effects of disease on Clinical Lab. Tests, 4th ed AACCC 2001.
- Burke A et al. Tietz Textbook of Clinical Chemistry, 3rd ed AACCC 1999.
- Tietz N W et al. Clinical Guide to Laboratory Tests, 3rd ed AACCC 1995.

PRESENTACION

Ref: 1001160	Cont.	20 x 2 mL
Ref: 1001161		10 x 15 mL
Ref: 1001162		10 x 50 mL



ANEXO 7



CE GPT (ALT)

GPT (ALT)

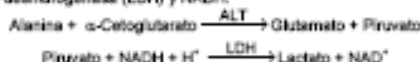
NADH. Cinético UV. IFCC rec.

Determinación cuantitativa de alanina aminotransferasa GPT (ALT) IVD

Conservar a 2-8°C

PRINCIPIO DEL METODO

La alanina aminotransferasa (ALT) inicialmente llamada transaminasa glutámico pirúvico (GPT) 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:



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 ensayada¹.

SIGNIFICADO CLINICO

La ALT es una enzima intracelular, se encuentra principalmente en las células del hígado y el riñón.

Su mejor aplicación es en el diagnóstico de las enfermedades del hígado. Se observan niveles elevados en enfermedades hepáticas como la hepatitis, enfermedades de los músculos y traumatismos.

Cuando se emplean en conjunción con la AST ayuda en el diagnóstico de infartos de miocardio, ya que el valor de la ALT se mantiene dentro de los límites normales y aumenta en los niveles de AST^{1,4,5}.

El diagnóstico clínico debe realizarse teniendo en cuenta todos los datos clínicos y de laboratorio.

REACTIVOS

R 1	TRIS pH 7,8	100 mmol/L
Tempón	L-Alanina	500 mmol/L
R 2	NADH	0,18 mmol/L
Substrato	Lactato deshidrogenasa (LDH)	1200 U/L
	α -Cetoglutarato	15 mmol/L

PREPARACION

Reactivo de trabajo (RT):

Ref. 1001170 Dissolver (→) una tableta de R2 Substrato en un vial de R1.

Ref. 1001171 Dissolver (→) una tableta de R2 Substrato en 15 mL de R1.

Ref. 1001172 Dissolver (→) una tableta de R2 Substrato en 50 mL de R1.

Taper y mezclar suavemente hasta disolver su contenido.

Estabilidad: 21 días a 2-8°C o 72 horas a temperatura ambiente.

CONSERVACION Y ESTABILIDAD

Todos los componentes del kit son estables, hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta, cuando se mantienen los frascos bien cerrados a 2-8°C, protegidos de la luz y se evita su contaminación.

No usar las tabletas si aparecen fragmentadas.

No usar reactivos fuera de la fecha indicada.

Indicadores de deterioro de los reactivos:

- Presencia de partículas y turbidez.
- Absorbancias del Blanco a 340 < 1,00.

MATERIAL ADICIONAL

- Espectrofotómetro o analizador para lecturas a 340 nm.
- Baño termostatable a 25°C, 30°C ó 37°C ($\pm 0,1^\circ\text{C}$)
- Cubetas de 1,0 cm de paso de luz.
- Equipamiento habitual de laboratorio.

MUESTRAS

Suero o plasma¹. Estabilidad de la muestra: 7 días a 2-8°C.

PROCEDIMIENTO

- Condiciones del ensayo:
Longitud de onda: 340 nm
Cubeta: 1 cm paso de luz
Temperatura constante 25°C / 30°C / 37°C
- Ajustar el espectrofotómetro a cero frente a agua destilada o aire.
- Pipetear en una cubeta:

RT (mL)	1,0
Muestra (μL)	100

- Mezclar, Incubar 1 minuto.
- Leer la absorbancia (A) Inicial de la muestra, poner en marcha el cronómetro y leer la absorbancia cada minuto durante 3 minutos.

- Calcular el promedio del incremento de absorbancia por minuto ($\Delta A/\text{min}$).

CALCULOS

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

Unidades: La unidad Internacional (UI) es la cantidad de enzima que convierte 1 μmol de sustrato por minuto, en condiciones estándar. La concentración se expresa en unidades por litro (U/L).

Factores de conversión de temperaturas

Los resultados pueden transformarse a otras temperaturas multiplicando por:

Temperatura de medición	Factor para convertir a		
	25°C	30°C	37°C
25°C	1,00	1,32	1,82
30°C	0,76	1,00	1,39
37°C	0,55	0,72	1,00

CONTROL DE CALIDAD

Es conveniente analizar junto con las muestras sueros control valorados:

SPINROL H Normal y Patológico (Ref. 1002120 y 1002210).

Si los valores hallados se encuentran fuera del rango de tolerancia, se debe revisar el instrumento, los reactivos y la técnica.

Cada laboratorio debe disponer su propio Control de Calidad y establecer correcciones en el caso de que los controles no cumplen con las tolerancias.

VALORES DE REFERENCIA^{4,5}

	25°C	30°C	37°C
Hombres	Hasta 22 U/L	29 U/L	40 U/L
Mujeres	Hasta 18 U/L	22 U/L	32 U/L

En recién nacidos normales se han descrito valores de referencia hasta el doble del de los adultos, debido a su inmadurez hepática, estos valores se normalizan aproximadamente a los tres meses.

Estos valores son orientativos. Es recomendable que cada laboratorio establezca sus propios valores de referencia.

CARACTERISTICAS DEL METODO

Rango de medida: Desde el límite de detección 1,20 U/L hasta el límite de linealidad 262 U/L.

Si la concentración de la muestra es superior al límite de linealidad, diluir 1/10 con ClNa 9 g/L y multiplicar el resultado final por 10.

Precisión:

	Intraensayo (n= 20)	Interensayo (n= 20)
Media (U/L)	34,9	118,4
SD	0,64	1,17
CV (%)	1,84	0,99

Sensibilidad analítica: 1 U/L = 0,000557 ΔA / min.

Exactitud: Los reactivos SPINREACT (y) no muestran diferencias sistemáticas significativas cuando se comparan con otros reactivos comerciales (x).

Los resultados obtenidos con 50 muestras fueron los siguientes:

Coefficiente de regresión (r): 0,99.

Ecuación de la recta de regresión: $y = 0,96x + 0,38$.

Las características del método pueden variar según el analizador utilizado.

INTERFERENCIAS

Los anticoagulantes de uso corriente como la heparina, EDTA oxalato o fluoruro no afectan los resultados. La hemólisis interfiere con la determinación¹. Se han descrito varias drogas y otras sustancias que interfieren en la determinación de la ALT^{1,2}.

NOTAS

SPINREACT dispone de instrucciones detalladas para la aplicación de este reactivo en distintos analizadores.

BIBLIOGRAFIA

- Murray R. Alanine aminotransferase. Kaplan A et al. Clin Chem The C.V. Mosby Co. St.Louis, Toronto, Princeton 1984; 1088-1090.
- Young DS. Effects of drugs on Clinical Lab. Tests, 4th ed AAOC Press, 1995.
- Young DS. Effects of disease on Clinical Lab. Tests, 4th ed. AAOC 2001.
- Burke A, et al. Tietz Textbook of Clinical Chemistry, 3rd edition. AAOC 1999.
- Tietz N. W. et al. Clinical Guide to Laboratory Tests, 3rd ed. AAOC 1995.

PRESENTACION

Ref. 1001170		20 x 2 mL
Ref. 1001171	Cont.	10 x 15 mL
Ref. 1001172		10 x 50 mL

