



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA



FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
DEPARTAMENTO DE ANÁLISIS CLÍNICOS

**“ESTUDIO DE ALTERACIONES HISTOLÓGICO-ENZIMÁTICAS
EN HÍGADO, INDUCIDAS POR EL CONSUMO CRÓNICO DE
VODKA CON BEBIDAS ENERGIZANTES EN RATAS WISTAR”**

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE LICENCIATURA EN:
QUÍMICO FARMACOBIOLOGO

PRESENTA:

p. Q.F.B ALICIA ANGÉLICA MARTÍNEZ PULIDO

DIRECTOR:

DC. SAMUEL TREVIÑO MORA
Depto. Análisis Clínicos, FCQ-BUAP

ASESOR:

DC. ALFONSO DANIEL DÍAZ FONSECA
Depto. Farmacia FCQ-BUAP

PUEBLA, PUE JUNIO 2017

INDICE

ABREVIATURAS.....	3
1. INTRODUCCIÓN	4
1.1 Generalidades del Hígado.....	4
1.2 Histología hepática	5
1.3 Funciones metabólicas del hígado.....	6
1.4 Enzimología hepática.....	8
1.5 Localización de las enzimas a nivel celular	11
1.6 Liberación celular de enzimas	12
1.7 Diagnóstico clínico de hepatopatías por consumo de alcohol crónico	14
1.8 Generalidades del etanol.....	15
1.9 Generalidades del vodka	16
1.10 Hepatotoxicidad del etanol.....	17
1.11 Manifestaciones clínicas.....	19
1.12 Epidemiología.....	20
1.13 Impacto a la salud.....	21
1.14 Generalidades de las bebidas energizantes.....	23
1.15 Componentes de las bebidas energizantes	24
1.16 Metabolismo de los componentes de las bebidas energizantes	27
1.17 Pruebas de Función Hepática	29
1.18 Índice de la actividad histológica.....	29
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	31
3. JUSTIFICACIÓN.....	32
4. OBJETIVOS	33
4.1. Objetivo General	33
4.2 Objetivos Específicos	33
5. HIPÓTESIS	34
5.1 Hipótesis Nula	34
5.2 Hipótesis Alternativa	34
6. DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN	35
6.1 Tipo de estudio.....	35

6.2	Definición del universo.....	35
6.3	Tamaño de la muestra.....	35
6.4	Criterios de Selección	35
6.5	Definición del grupo control.....	35
6.6	Variables y definición de variables	35
6.7	Manejo estadístico de los datos y pruebas estadísticas	36
7.	DIAGRAMA DE TRABAJO.....	37
8.	METODOLOGÍA.....	38
8.1	Animales de experimentación	38
8.2	Evaluación de la actividad motora en campo cerrado.....	39
8.3	Determinaciones séricas.....	39
8.4	Determinaciones tisulares.....	39
8.5	Preparación de los tejidos hepáticos para las técnicas histológicas.....	40
8.6	Evaluación de daño tisular.....	41
8.7	Análisis estadístico	43
8.8	Control de calidad.....	43
8.9	Medidas de seguridad	44
9.	RESULTADOS	45
9.1	Evaluación de la actividad motora de ratas por consumo crónico de vodka en combinación con bebidas energizantes.	45
9.2	Efecto del consumo crónico de vodka en combinación con bebidas energizantes sobre la actividad enzimática en suero.....	47
9.3	Efecto del consumo crónico de vodka en combinación con bebidas energizantes sobre el daño tisular en hígado.....	53
9.4	Evaluación histológica y cuantitativa del grado de alteración hepato-tisular.....	56
10.	DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	62
11.	CONCLUSIONES	97
12.	BIBLIOGRAFIA.....	99

ABREVIATURAS

γGT: Gamma-Glutamil Transpeptidasa

LDH: Lactato Deshidrogenasa

ALP: Fosfatasa alcalina

AST: Aspartato- aminotransferasa

ALT: Alanina- aminotransferasa

CHE: Pseudocolinesterasa

SNC: Sistema Nervioso Central

ADH: Alcohol Deshidrogenasa

ALDH: Aldehído Deshidrogenasa

NAD: Nicotinamida adenina dinucleótido

NADH: Nicotinamida adenina dinucleótido + Hidrogeno

MEOS: Sistema de Oxidación Microsomal

ATP: Adenosin Trifosfato

BE: Bebida energizante

CYP2E1: Citocromo P450 2E1

CYP1A2: Citocromo P 450 1A2

HAI: Índice de Actividad histológica

VHC: Virus de Hepatitis C

EHNA: Hepatitis no alcohólica

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Generalidades del Hígado

El hígado es después de la piel, el órgano más grande del organismo humano, alcanza un peso de 1500g. Anatómicamente, se localiza en el cuadrante superior derecho y parte izquierda por debajo del diafragma en la cavidad abdominal (Figura 1). Se considera una glándula mixta ya que posee funciones endócrinas y exocrinas. Está cubierto por la capsula de Glisson, que es una fina capa de tejido conectivo, a su vez rodeada en su mayoría por el peritoneo. (1) Esta irrigado por las arterias hepáticas derecha e izquierda del tronco celiaco, en un 15% y entre el 70 a 75% del riego proviene de la vena porta hepática con sangre procedente del tracto digestivo, páncreas y bazo, por ello recibe los nutrientes absorbidos en el intestino, agentes tóxicos, fármacos, secreciones pancreáticas, productos de la degradación de las células sanguíneas del bazo. Por lo tanto, las células hepáticas son las primeras en estar expuestas a una gran cantidad de compuestos tanto nutrimentos como sustancias tóxicas.

No hay ninguna duda de que el hígado es uno de los órganos más importantes del organismo, este tiene un enorme número de funciones metabólicas y reguladoras a su cargo y todo se debe a la complejidad de su estructura.



Figura 1 Localización anatómica del Hígado

For the National Cancer Institute © 2011 Terese Winslow LLC, U.S. Govt. has certain rights

1.2 Histología hepática

Casi todas las glándulas exocrinas están divididas en lóbulos y lobulillos más pequeños mediante una serie de tabiques de tejido conjuntivo, y su parénquima está constituido por grupos de células epiteliales que forman acinos en los extremos de un sistema ramificado de conductos (Figura 2).

Es posible observar un patrón repetido de áreas más o menos hexagonales en las que las trabéculas perforadas compuestas por células parenquimatosas se disponen radialmente alrededor de una vena central. En tres de los ángulos de estas zonas poligonales existe una pequeña área triangular formada por tejido conjuntivo en cuyo seno se advierte la presencia de un conducto biliar, una rama de la arteria hepática y una rama de la vena porta. Este complejo se le denomina triada porta o espacio porta. (2)

Las ramas laterales de estos vasos que se observan a intervalos cortos en su trayecto, concluyen en los sinusoides hepáticos de pared delgada que ocupan los espacios que quedan entre las trabéculas dispuestas radialmente y que drenan en la vena central. Su principal irrigación sanguínea aferente se realiza a través de la vena porta que transporta sangre escasamente oxigenada debido a que ya ha circulado a través de los intestinos, el páncreas y el bazo. (3)

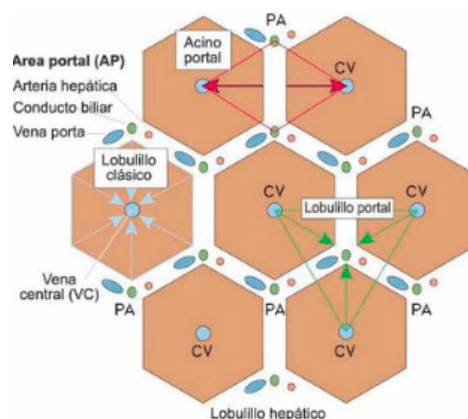


Figura 2. Lobulillo hepático unidad poligonal antes aludida tiene un diámetro aproximado de 0.7 mm y una longitud de 2mm, ha sido considerada la unidad estructural y funcional del hígado.

1.3 Funciones metabólicas del hígado

El hígado es un órgano que regula, distribuye, recicla y almacena nutrientes para que otros tejidos puedan utilizarlos adecuadamente. Se halla implicado en la mayoría de los procesos metabólicos del organismo, como la regulación de la glucemia, la síntesis de urea y de proteínas plasmáticas, así como la detoxificación, ya sea de compuestos resultantes del propio metabolismo celular, como de aquellos ajenos al organismo con los que entra en contacto a través de los alimentos o el medio ambiente.

Su función en la digestión (degradación de bilis) es importante para garantizar el proceso digestivo, pero ésta es una de las múltiples funciones de las células hepáticas. Las células hepáticas desintoxican drogas, alcohol, degradan las hormonas, fabrican muchas moléculas vitales para el organismo (colesterol, proteínas, como albúmina, de la coagulación y lipoproteínas, entre muchas otras).

Debido a las funciones principales del hígado, la naturaleza nos ha dotado de un excedente de tejido hepático, e incluso si parte de él se daña o se extrae, se trata de uno de los pocos órganos del cuerpo que puede regenerarse de forma rápida y sencilla. Cuando el hígado y sus células están lesionados, liberan ciertas enzimas y otras sustancias en el torrente sanguíneo, que delimitan el estado del órgano.

En la práctica clínica utilizamos numerosas determinaciones analíticas, que evalúan distintos aspectos de la funcionalidad hepática y que informan sobre:

-Citolisis o lesión hepatocelular: Transaminasas [Aspartato Aminotransferasa, AST o GOT (antes llamada Glutamato-Oxalato Transaminasa) y Alanino Aminotransferasa, ALT o GPT (también conocida como Glutamato-Piruvato Transaminasa)]

-*Colestiasis o éstasis biliar y metabolismos de la bilirrubina*: Fosfatasa alcalina (ALP), gamma glutamil traspeptidasa (γ GT), bilirrubina total y sus fracciones conjugada y no conjugada. (4)

1.4 Enzimología hepática

Como se mencionó anteriormente el hígado es una glándula importante porque no solo se realiza la síntesis proteica, sino también la detoxificación de una serie de compuestos que deben ser eliminados de nuestro organismo. Contiene un gran número de enzimas, sin embargo, las que tienen mayor interés clínico son las aspartato y alanino amino transaminasas, la fosfatasa alcalina, la gamma-glutamil transpeptidasa, lactato deshidrogenasa y colinesterasa. (5)

-Transaminasas

Son enzimas que realizan reacciones de transaminación dando lugar a aminoácidos y cetoácidos distintos de los originales. En el hígado se han detectado no menos de 60 reacciones de transaminación, pero las únicas transaminasas con valor clínico son la aspartato aminotransferasa (AST) y la alanino aminotransferasa (ALT) (5). Estas enzimas son intracelulares y se liberan hacia la sangre en grandes cantidades cuando hay daño en la membrana de las células que la contienen. La ALT, además del hepatocito, se encuentra en otros tejidos como corazón, músculo esquelético, riñones, cerebro, páncreas, pulmón, eritrocitos y leucocitos, mientras que la AST se localiza fundamentalmente en el hepatocito y en menor cantidad en otros tejidos, siendo por tanto más específica de daño hepático. (4)

Dichas enzimas son indicadores sensibles de lesión hepatocelular y son de gran ayuda para el diagnóstico de enfermedades hepáticas. Ambas aminotransferasas están normalmente presentes en el suero en niveles bajos (< 30 a 40 U/L). El rango normal varía ampliamente entre laboratorios. Un primer paso para la evaluación del resultado es obtener una historia clínica completa para identificar las causas más comunes de elevación de aminotransferasas: lesión hepática relacionada con alcohol, hepatitis por virus B y C, hepatitis autoinmune, esteatosis hepática, esteatohepatitis no alcohólica (EHNA), hemocromatosis, enfermedad de Wilson, y deficiencia de alfa1-antitripsina. (6)

La causa más importante del aumento de la ALT sérica es la enfermedad hepática, debida a una lisis de los hepatocitos o a una alteración transitoria de la permeabilidad de la membrana. La enfermedad hepática es también una causa frecuente del aumento de AST sérica. (4) Un cociente AST/ALT superior a la unidad con hipertransaminasemia moderada sugiere una hepatopatía alcohólica o neoplásica. (5)

-Gamma-glutamil transpeptidasa

La Gamma-glutamil transpeptidasa (γ GT), cataliza la transferencia de grupos γ -glutamil de un péptido a otro o de un péptido a un aminoácido. El tejido más rico en esta enzima es el riñón, seguido del páncreas, el hígado, el bazo y el pulmón. En las células se localiza en las membranas, fundamentalmente del retículo endoplásmico liso, en los microsomas, en la fracción soluble del citoplasma y en los conductos biliares. (7)

La γ GT es una enzima de especificidad baja para un tipo único de lesión. Dado que es una enzima sumamente sensible, aumenta en menor o mayor grado en todas las hepatopatías, los mayores incrementos se han observado en procesos obstructivos o neoplásicos, también está aumentada en hepatitis. El aumento más importante de la enzima se observa en procesos tumorales, en colestasis intrahepática o extrahepática por obstrucción de conductillos biliares, además su síntesis es inducida por el alcohol y también por barbitúricos. (6)

-Fosfatasa alcalina

La Fosfatasa Alcalina (ALP) sérica tiene varios orígenes como hígado, riñón, placenta, intestino, huesos, leucocitos. Cada tejido tiene su isoforma de ALP las cuales son hepática, ósea, renal, intestinal, etc. aunque las fuentes más importantes son el hígado, los huesos y el intestino. Durante el crecimiento, los niveles séricos son altos debido al aumento de la fracción ósea, que traduce la actividad

osteoblástica en el hueso. El aumento de fosfatasa alcalina de origen hepático revela obstrucción biliar intra o extrahepática, asociada principalmente a ictericia (coloración amarillenta de piel y mucosas, producidas por el aumento de bilirrubina por encima de 2 mg/dL), o la existencia de un proceso hepático expansivo, infiltrativo o de naturaleza granulomatosa.

-Lactato deshidrogenasa

La Lactato Deshidrogenasa (LDH) es una enzima citoplasmática que se encuentra presente en todas las células del organismo, aunque sus mayores concentraciones se hallan en el hígado, corazón, riñón, músculo esquelético y eritrocitos. Normalmente se encuentra en el interior de las células tisulares, es una enzima presente en múltiples tejidos, se libera al plasma como consecuencia de la destrucción celular (fisiológica o patológica) y es un marcador de destrucción celular sensible, aunque poco específico. (7)

LDH tiene 5 isoenzimas, propias de distintas partes del cuerpo, las cuales son:

LDH-1: se localiza en el corazón, músculos y eritrocitos.

LDH-2: en el sistema retículo endotelial y leucocitos.

LDH-3: en pulmones.

LDH-4: en riñones, placenta y páncreas.

LDH-5: en el hígado y músculo esquelético.

La elevación de la isoenzima hepática, la LDH-5, es indicativa de necrosis hepática o carcinoma metastásico de hígado.

Mediante las pruebas de laboratorio, pueden monitorear el estado de salud de ciertos órganos como el hígado ya que es uno de los órganos más susceptibles a daños por el consumo de fármacos, alcohol, toxinas, etc.; esto supone una elevada

incidencia de enfermedades hepáticas en México y en todo el mundo. Dentro de estas se encuentran básicamente la cirrosis, hepatitis, hepatopatía alcohólica, esteatosis hepática, entre otras: (7)

-Pseudocolinesterasa

La pseudocolinesterasa (CHE) sérica es una enzima específica del plasma, que tiene la capacidad de hidrolizar diferentes ésteres de ácidos grasos de cadena corta. Su función, dentro del organismo, resulta todavía desconocida. La CHE es sintetizada por el hígado, está contenida en el retículo endoplasmático liso de los hepatocitos. Su actividad sérica disminuye cuando se producen graves lesiones en el parénquima hepático. Dada la gran capacidad de reserva del hígado, sus valores pueden ser normales en la hepatitis aguda reciente en la colestasis, mientras que en la hepatitis crónica y en la cirrosis hepática, los valores pueden tener a los límites inferiores. Por esta razón, el mantenimiento de valores bajos de actividad enzimática de CHE indica un déficit de la capacidad sintética del hígado, con significado pronóstico desfavorable. (8)

1.5 Localización de las enzimas a nivel celular

Las enzimas se localizan en la célula en diferentes estructuras celulares (organelos) o bien se encuentran en el citosol. El conocimiento de la localización celular de las enzimas presenta un gran interés en clínica. Así, la aparición de enzimas mitocondriales (como la AST) indica una afectación celular mayor que las de las enzimas de distribución exclusivamente citoplasmáticas (ALT). Las enzimas de membrana como fosfatasa alcalina (ALP), la gamma glutamil transpeptidasa (γ GT), se encuentran ancladas con distinta profundidad y solidez en la membrana celular, y son liberadas irregularmente en función del daño: (8)

1.6 Liberación celular de enzimas

Las enzimas regularmente se encuentran en el plasma en un nivel muy constante. La concentración plasmática de enzimas celulares se mantiene mediante la desintegración normal de células, es decir, la destrucción celular fisiológica. La muerte celular no es la única condición para que la célula vierta su contenido enzimático a la sangre. Existen diversos grados de lesión celular, sin necesidad de muerte, que van asociados a la liberación de las enzimas. Cualquier circunstancia que altere la permeabilidad de la membrana celular va a traer como consecuencia la liberación de las enzimas. (8)

-Transaminasas

Estas enzimas son intracelulares AST se localiza en el citosol (20%) y en la mitocondria (80%), mientras ALT es exclusivamente citoplasmática; las lesiones celulares, aun cuando sean mínimas, permiten la salida de estas enzimas al torrente circulatorio. Lógicamente son las enzimas de distribución citoplasmática las que con mayor facilidad aparecen elevadas en suero. La enzima mitocondrial se eleva sólo cuando las lesiones son más profundas y comprometen los organelos donde se ubican.

Se trata de pruebas de función hepática muy sensibles para el daño hepatocelular, en especial la ALT. Cualquier situación que curse con sufrimiento hepatocelular puede asociarse a un ascenso de las transaminasas. Tanto la AST como la ALT son marcadores de citólisis, aunque su valor no siempre va paralelo a la intensidad del daño hepatocelular. En las lesiones graves de los hepatocitos, con necrosis de las células parenquimatosas la AST, presente en las mitocondrias y el citoplasma, aumenta con mayor intensidad que la ALT, que se encuentra solamente en el citoplasma.

-Fosfatasa alcalina

Se encuentra en las membranas celulares de numerosos órganos, la sensibilidad de esta enzima por las enfermedades hepáticas es baja, puesto que puede permanecer totalmente normal en multitud de ellas. Sin embargo, los niveles de fosfatasa alcalina aparecen ligeramente elevados en los cuadros de ictericia de origen hepatocelular y moderada o intensamente elevados en los cuadros de ictericia obstructiva y de colestiasis intrahepática. Por ello su determinación presenta bastante interés pues es un parámetro muy sensible en los procesos infiltrativos y colestásicos del hígado. A pesar de su escasa sensibilidad y especificidad, su determinación puede incluirse en la rutina diagnóstica, pues puede detectar algunas enfermedades hepatobiliares que no son reconocibles por otras pruebas analíticas de *screening*.

-Gamma-glutamil transpeptidasa

Esta enzima se encuentra principalmente en la membrana citoplasmática y en los microsomas hepatocitarios, siendo un marcador enormemente sensible de disfunción hepática. Si la γ GT es normal, la probabilidad de tener el hígado sano es muy alta. La γ GT se ha impuesto como el test serológico más sensible y más precoz en el diagnóstico biológico del alcoholismo ya que se encuentra elevada en un 30% o hasta un 90% en alcohólicos crónicos. La γ GT no se eleva en la ingesta aguda de alcohol, aunque si persiste elevada es probable que exista una lesión hepática subyacente. Parece ser que la elevación de la γ GT es el alcoholismo crónico se debe sobre todo al efecto inductor enzimático de etanol, aunque también se debe valorar la posible lesión/ disfunción hepatocelular. (8)

-Lactato deshidrogenasa

La lactato deshidrogenasa es una enzima presente en múltiples tejidos orgánicos, se libera al plasma como consecuencia de la destrucción celular (fisiológica o patológica) y es un marcador de destrucción celular sensible, aunque poco específico. La LDH se encuentra en el citoplasma de todas las células del organismo por lo que una pequeña lesión incrementa su concentración sérica, lo cual indica necrosis celular.

1.7 Diagnóstico clínico de hepatopatías por consumo de alcohol crónico

La elevación de parámetros analíticos se relaciona con el consumo de alcohol; los más frecuentes son ácido úrico, triglicéridos, γ GT, aspartato aminotransferasa (AST) y la alanino aminotransferasa (ALT), Fosfatasa alcalina entre otros. (9)

Diversas pruebas bioquímicas son útiles para estudiar y tratar a los pacientes con alteraciones de la función hepática estas pruebas pueden utilizarse para:

- Detectar la presencia de enfermedades hepáticas
- Distinguir entre los distintos tipos de trastornos del hígado
- Valorar el grado de extensión de una lesión hepática conocida
- Vigilar la respuesta al tratamiento. (10)

El diagnóstico para el abuso de alcohol puede ser difícil porque muchos pacientes ocultan esta información. Una elevación del doble de la gamma glutamil transferasa (γ GT) en pacientes cuya relación AST/ ALT es mayor que 2:1 sugiere fuertemente el abuso de alcohol. (11)

1.8 Generalidades del etanol

La OMS define al etanol como una sustancia depresora, la cual afecta los procesos mentales con propiedades causantes de dependencia, se ha utilizado ampliamente en muchas culturas durante siglos. El consumo nocivo de etanol conlleva a una alteración del SNC, relaja y eleva el estado de ánimo, altera el habla, el equilibrio, la visión y el oído; así como una pesada carga social y económica para las sociedades. (12) El etanol también llamado alcohol etílico es tóxico para la mayoría de tejidos del organismo. Su consumo crónico y excesivo se ha asociado al desarrollo del síndrome de dependencia al alcohol, pero también a numerosas enfermedades inflamatorias y degenerativas que pueden acabar con la vida de los sujetos que los sufren. (13)

- *Propiedades físicas del etanol*

El etanol (CH₃-CH₂OH) (Figura 3), tiene un bajo peso molecular (PM=46); es una sustancia líquida a temperatura ambiente, de elevada volatilidad, es un compuesto hidro y liposoluble, esta característica por lo cual es fácil de ser absorbido por cualquier vía y distribuirse rápidamente tanto en los compartimientos acuosos como en los lipídicos y penetrar en el sistema nervioso central (SNC). El alcohol se absorbe rápidamente en el estómago, y fundamentalmente, en intestino delgado. Alrededor del 90% es metabolizado en el hígado, mientras que el resto es eliminado por los riñones o a través de los pulmones. (14)

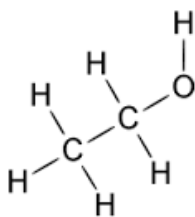


Figura 3 Estructura química del etanol

Su consumo está altamente difundido en la población al encontrarse como componente de bebidas como aguardiente, cerveza, ron, vodka, vino, entre otras.

1.9 Generalidades del vodka

A partir del descubrimiento del proceso de destilación se empezó a obtener una gran variedad de licores, que se diferencian entre sí, por la materia prima que ha sido utilizada para su obtención, como son los casos de: el vino y residuos de la obtención de este (brandy, cognac, armagnac, etc.), mezclas obtenidas por maceración de frutos (calvados) y granos triturados que han sufrido una previa fermentación alcohólica (whisky, vodka, gin, etc.).

El vodka típico es incoloro, es picante y ordinariamente no se añeja, se bebe sin dilución y como aperitivo. El vodka producido en Rusia contiene 40% de alcohol y los de Polonia alcanzan los 45° de graduación alcohólica.



Figura 4. Imagen comercial de vodka. Una de las empresas que produce esta botella vodka es The Smirnoff Company. Se obtiene mediante triple destilación de alcohol de grano y se filtra por carbón. Se presenta en su característica botella transparente y con etiqueta roja.

1.10 Hepatotoxicidad del etanol

Una vez que se ingiere, el alcohol pasa al sistema digestivo; 30% de él es absorbido por el estómago y el resto por el duodeno y el yeyuno; de ahí pasa al torrente sanguíneo a través de las venas que forman la vena porta y de esta manera llega al hígado. En el torrente sanguíneo el etanol se distribuye a todos los fluidos corporales, como se mencionó anteriormente sus propiedades químicas le permiten atravesar libremente las membranas celulares. En el hígado se metaboliza del 80 al 90% de etanol, mientras que sólo una mínima parte se oxida en otros órganos, como el tubo gastrointestinal, pulmones, riñón y cerebro. (15)

El etanol es oxidado en el citoplasma del hepatocito por acción de la enzima alcohol deshidrogenasa (ADH) en acetaldehído, y posteriormente en acetato por la enzima aldehído deshidrogenasa (ALDH) mitocondrial (Figura 5). La enzima citocromo P450E1 (CYP2E1) es inducida por la ingestión crónica de etanol y oxida al etanol en acetaldehído en el sistema mitocondrial de la célula. La oxidación del etanol aumenta la demanda de oxígeno por parte del hepatocito. Como producto directo de la oxidación del etanol a acetaldehído, se genera un exceso de equivalentes reductores en el citosol donde se localiza la enzima alcohol deshidrogenasa que está oxidando al etanol, lo cual se reconoce como la ruta general de la catálisis a nivel hepático. (16)

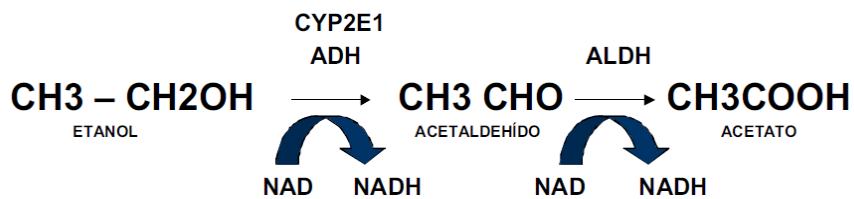


Figura 5. Metabolismo del etanol ADH, Enzima Alcohol Deshidrogenasa; ALDH, Enzima Aldehído Deshidrogenasa; CYP2E1, Enzima Citocromo P450E1

Particularizando, se han reconocido al menos tres vías de biotransformación:

a) La vía de la enzima alcohol deshidrogenasa: Es la principal; cataliza la conversión de etanol en acetaldehído con la participación del cofactor nicotinamida adenina dinucleótido (NAD), pasando de su forma oxidada a su forma reducida, lo cual genera un exceso de equivalentes reducidos en el citosol, favoreciendo la hiperlactacidemia y se presenta la alteración en el ciclo de Krebs con la consiguiente hipoglucemia.

b) La vía del Sistema Oxidación Microsomal dependiente de Citocromo P450 (MEOS): Es un sistema de oxidasas microsomales presentes en el retículo endoplásmico liso de los hepatocitos. Posee mayor actividad en los pacientes con alcoholismo crónico.

c) La vía de las Catalasas: Estas enzimas utilizan peróxido de hidrogeno. Se encuentran en sangre, médula ósea, hígado y riñón, convirtiendo el etanol en acetaldehído. La velocidad de eliminación del etanol es de 100 mg/kg/h. Las vías de eliminación son 3, Pulmonar (50-60%), entero hepática (25-30%), orina (5-7%), sudor, lágrimas, jugo gástrico, saliva y leche materna. (17)

Al presentarse una intoxicación etílica incrementa la síntesis de ácidos grasos y triglicéridos, con disminución de la oxidación de los primeros, generando una hiperlipidemia que conlleva al desarrollo de hígado graso. Se inhibe la utilización de ácidos grasos y la disponibilidad de precursores, lo cual estimula la síntesis hepática de triglicéridos, lo cual produce hígado graso, hallazgo característico en alcohólicos crónicos.

1.11 Manifestaciones clínicas

Las manifestaciones clínicas de la intoxicación etílica pueden clasificarse de dos maneras aguda o crónica. La sintomatología puede relacionarse con la concentración sanguínea de etanol.

-Intoxicación aguda

En intoxicación aguda con niveles altos de alcoholemia, se lesiona la mitocondria por interferencia directa del etanol y el acetaldehído sobre la síntesis de ATP. La relación NAD/NADH se altera por un daño mitocondrial generado por las altas concentraciones de acetaldehído. El acetaldehído es tóxico y reactivo, provoca precipitación de proteínas, las cuales tienen actividad osmótica, produciendo retención de agua, lo cual, sumado al depósito de grasa, llevará a edema del hepatocito y disminución del espacio intercelular, con la consiguiente hipertensión portal, la cual se agrava por la progresiva fibrosis.

-Intoxicación crónica

Muchos de los efectos del abuso crónico de etanol se deben a la toxicidad del acetaldehído o al fracaso de uno o más de los muchos mecanismos homeostáticos y sintéticos del hígado. Uno de los signos más precoces de abuso crónico de etanol es la hepatomegalia. Se debe a la acumulación de triglicéridos a causa de su síntesis aumentada por la sobrecarga de glúcidos y la reducción de la síntesis de proteínas. Una ingestión continuada elevada de etanol puede producir las siguientes secuelas:

- Alteración de la tolerancia a la glucosa y diabetes mellitus.
- Hipertrigliceridemia
- Cirrosis hepática con el resultado de una disminución de la concentración de albúmina en el plasma.
- Miocardiopatía

Los efectos iniciales de la ingesta de etanol se manifiestan en una depresión del sistema nervioso central; los primeros efectos que se sienten tras la ingesta de etanol se deben a la inhibición de los centros cerebrales. Por ello el control de la coordinación motora, la inhibición social, el habla, la visión y el estado natural de alerta se pierden progresivamente, según se van consumiendo mayores cantidades de etanol.

1.12 Epidemiología

El consumo de alcohol entre los jóvenes (15 a 29 años) es un problema de salud pública, en Puebla en 2012, la prevalencia más alta de consumo usual de alcohol entre los jóvenes corresponde al grupo de 20 a 24 años de edad (Figura 6); y por sexo, a los hombres de este mismo grupo (90.0 por ciento); tanto en hombres como en mujeres, la prevalencia aumenta con la edad.

Grupos de edad	Total	Hombres	Mujeres
15 a 19	39.3	43.5	35.0
20 a 24	72.1	90.0	52.7
25 a 29	68.1	87.7	50.7

Nota: Se utilizó el cuestionario de adolescentes (15 a 19 años) y de adultos (20 a 29 años). Se excluye a la población que no especificó el consumo de alcohol

Fuente: INSP. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2012. Base de datos.

Figura 6. Porcentaje de prevalencia de consumo usual de alcohol en la población joven por grupos de edad según sexo 2012

1.13 Impacto a la salud

El hígado tiene una capacidad limitada para absorber y metabolizar el etanol en un período dado de tiempo. El exceso de etanol que se distribuye a otras áreas por todo el cuerpo puede deteriorar otros órganos y alterar el bienestar psicológico de las personas. (18)

El exceso o abuso del etanol puede causar una gran variedad de problemas, tales como:

- Hipertensión (aumento de la presión arterial)
- Irritación del sistema digestivo, lo que causa úlceras, gastritis y una absorción incorrecta de los nutrientes
- Trastornos en el sistema nervioso central, entre ellos problemas cerebrales
- Depresión, ansiedad y muchos otros problemas psicosociales
- Lesiones en hígado que pueden encontrarse en forma aislada, pero que generalmente se encuentran coexistiendo en diversas combinaciones:
 - esteatosis
 - hepatitis alcohólica
 - fibrosis/cirrosis

Fisiológicamente cuando mayor es la cantidad de etanol ingerida, más actividad enzimática se requerirá en el hígado. Si en las horas que dura ese proceso de eliminación se consumen bebidas energizantes, no aparecerán los signos propios de la embriaguez alcohólica y así, aunque el metabolismo no pueda asumir el exceso de éste, sin embargo, el cerebro no lo reconocerá. (19)

Las bebidas energizantes surgieron en Escocia y en Japón con el objetivo de aumentar la energía y la concentración; inicialmente se componían de una mezcla de vitaminas y luego se les adicionaron la cafeína y los carbohidratos, surgiendo el Red Bull. Esta bebida gozaba de buena popularidad en Europa, pero al llegar a los

Estados Unidos las estrategias mercantiles tradicionales no funcionaron, por lo que empezaron a patrocinar a deportistas aéreos y aviadores aficionados. Más adelante, las bebidas energizantes entraron a los bares haciendo parte de las mezclas con alcohol para cocteles con lo que su popularidad aumentó. (20)

1.14 Generalidades de las bebidas energizantes

Las bebidas energizantes (BE) son bebidas analcohólicas, generalmente gasificadas, compuestas básicamente por cafeína e hidratos de carbono (azúcares diversos de distinta velocidad de absorción), más otros ingredientes como aminoácidos, vitaminas, minerales, extractos vegetales, acompañados de aditivos acidulantes, conservantes, saborizantes y colorantes. (21)

Estas bebidas anulan las señales de alarma que da el cuerpo con relación al cansancio y al sueño, que son sensaciones naturales que requerimos para saber cuándo hay que descansar, por lo que su consumo busca permitir el continuar en actividad y en estado de alerta. Los grupos más propensos a abusar de estas bebidas, son los deportistas, las personas que realizan largas jornadas de trabajo y los estudiantes universitarios. (22)

En los últimos años los jóvenes se han visto influidos por el consumo de bebidas energizantes. La bebida energizante más comercial es el Red Bull (Figura 7). Según la página oficial de Red Bull se habla de sus beneficios, como el aumento del rendimiento de la concentración y de la energía, al igual que estimula el metabolismo. Suele ser consumida por atletas o personas que quieren mejorar su rendimiento tanto físico como mental, principalmente jóvenes. En sí estas bebidas parecen no causar daños al consumidor, pero su mayor problema se da al combinarlo con otras bebidas como el alcohol, el cual es un depresor.



**Figura 7 Imagen comercial de Red Bull.
Tomada de página oficial de Red Bull. Bebida energizante**

1.15 Componentes de las bebidas energizantes

Un bote de Red Bull, con un contenido neto de 250 ml, está compuesta por agua carbonatada, sacarosa, glucosa, regulador de acidez citrato de sodio, taurina (400 mg / 100 ml), glucuronolactona (240 mg / 100 ml), cafeína (32 mg / 100 ml), Inositol, vitaminas (Niacina, ácido pantoténico, B6, B12), saborizantes artificiales y colorantes (caramelo, riboflavina) (Figura 8).

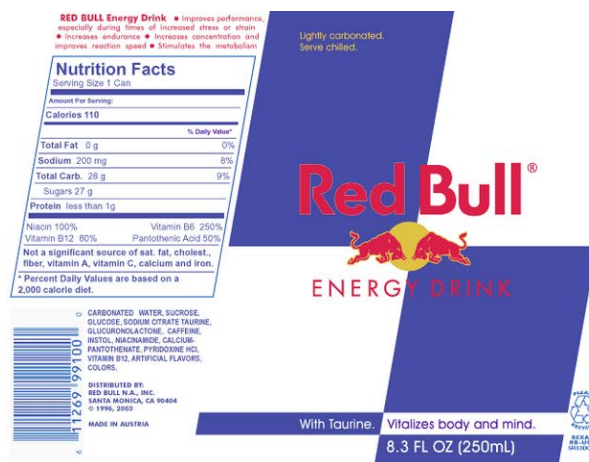


Figura 8 Tabla nutricional de Red Bull una bebida energizante

-Cafeína

La cafeína (1,3,7-metilxantina) es un alcaloide de estructura purínica que se encuentra naturalmente en los granos del café, provoca un estímulo al cerebro al disminuir la acción de la adenosina, un transmisor nervioso que produce calma. Se genera entonces una sensación de vitalidad, de fuerza durante algunas horas. Este estado de alerta hace que se aumente la concentración y la resistencia a los mayores esfuerzos físicos y mentales. (23)

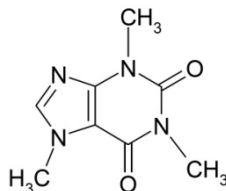


Figura 9. Estructura química de Cafeína

La cafeína se absorbe casi totalmente en el estómago y en el intestino delgado, distribuyéndose en casi todos los tejidos, incluido el cerebro ya que el alcaloide es muy permeable a la selectiva barrera hémato-encefálica. La metabolización de la cafeína ocurre primariamente en el hígado (95%), tejido en el que una isoforma del citocromo P-450 (CYP1A2) demetila la cafeína a 1,7-dimetilxantina (paraxantina), la que posteriormente es nuevamente demetilada y transformada por oxidación en ácido 1-metilúrico, el cual puede ser eliminado a través de la orina. (24)

Se ha sugerido que la cafeína tiene efectos nocivos sobre la salud, tales como: insomnio, ansiedad, osteoporosis, trastornos mentales, depresión, trastornos de la absorción de hierro y de zinc; durante el embarazo: daños al feto, al recién nacido y al lactante; enfermedades cardiovasculares y anemia. Las dosis que causan estos efectos son variadas. (25)

-Glucuronolactona

La glucuronolactona es un metabolito natural formado a partir de glucosa en el hígado, y también es encontrada en un reducido grupo de alimentos, de los cuales el vino es la fuente más rica (hasta 20 mg/dL).

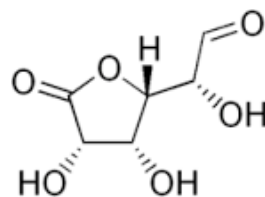


Figura 10. Estructura química de Glucuronolactona

El metabolismo de la glucuronolactona humana es desconocido. Todavía no hay información disponible acerca de la glucuronolactona y su interacción con el alcohol. (25)

-Taurina

La taurina es un aminoácido esencial del cuerpo humano, el cual abunda en músculos y plaquetas. Es condicionalmente esencial porque en situaciones de alto estrés o esfuerzo físico, grandes cantidades de taurina son eliminadas del cuerpo y no pueden ser repuestas por el organismo en cantidades suficientes. Este aminoácido participa en el metabolismo de las grasas, facilitando la absorción, transporte y utilización de los ácidos grasos con el fin de obtener energía. También actúa como un antioxidante y acelera la excreción de sustancias dañinas del cuerpo humano. (26)

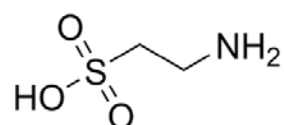


Figura 11. Estructura química de Taurina

Las alteraciones físicas que se presentan ante una intoxicación de taurina son temblor, intranquilidad, anorexia, náuseas, vómitos, taquicardia y confusión, así como alteraciones del comportamiento: cuadros psicosis aguda (manía aguda) con ideas de grandeza, hiperactividad, agresividad, ausencia del control de los impulsos, insomnio y agitación psicomotriz. (27)

-Vitaminas

Se encuentran fundamentalmente vitaminas del grupo B así como también C y E. Sin embargo, múltiples investigaciones han demostrado que el agregado de éstas no ofrece beneficio extra, siempre y cuando la persona mantenga la recomendación nutricional óptima para su edad, género y demanda física.

Las vitaminas se captan desde la sangre y luego se almacenan en el hígado, donde se conservan inalteradas o sufren modificaciones bioquímicas.

Es poco probable que exista una intoxicación de vitamina B y C, ya que son vitaminas Hidrosolubles y los excesos son eliminados a través de la orina. Pero si la dosis diaria supera los 2000 mg/día pueden aparecer molestias como gastrointestinales, diarreas, malestar en el estómago, cálculos renales, insomnio y exceso de absorción de hierro.

Un exceso de vitamina E puede dar lugar a trastornos metabólicos, por ser una vitamina liposoluble. Estas pueden acumularse y provocar toxicidad cuando se ingieren en grandes cantidades. (28)

1.16 Metabolismo de los componentes de las bebidas energizantes

El hígado es un órgano central del metabolismo que realiza numerosas funciones esenciales para la vida. A él llegan los aminoácidos, hidratos de carbono, lípidos, vitaminas y minerales absorbidos en el intestino que se metabolizan, almacena y distribuye al resto del organismo.

-Metabolismo de los carbohidratos

El hígado juega un papel clave en la utilización de los monosacáridos principales, glucosa, fructosa y galactosa. El paso inicial en el metabolismo de glucosa hepática es la fosforilación por la glucoquinasa. Síntesis glucoquinasa se incrementa en alto dietas de glucosa y altas concentraciones de insulina. Dependiendo de la necesidad metabólica, la glucosa puede ser utilizada para la producción de energía, la síntesis de otros sustratos (es decir, aminoácidos, ácidos grasos), o almacenada en forma de glucógeno. El glucógeno es un polímero de unidades de glucosa, sirve como un depósito de almacenamiento de glucosa en el hígado, que puede ser movilizado fácilmente cuando la glucosa está en la demanda inmediata. Debido a su polimérica estructura, glucógeno tiene una osmolaridad baja y se almacena más fácilmente en los hepatocitos que la glucosa monomérica.

-Metabolismo glucoronolactona

La glucoronolactona es un carbohidrato derivado de la glucosa, es un intermediario en su metabolismo en el hombre. Está involucrada en varios caminos metabólicos en los mamíferos, que están localizados en el hígado. En los humanos, la glucoronolactona es un intermediario en la ruta de la pentosa fosfato. El ácido glucorónico, el precursor metabólico inmediato de la glucoronolactona, es esencial para la detoxificación y el metabolismo, mediante conjugación en el hígado, de una amplia variedad de sustancias que finalmente se eliminan por la orina. La ingesta de D-glucoronolactona, aparte de ser metabolizada y eliminada como ácido glucárido, L-xilulosa y xilitol, también puede ser convertida a ácido D-glucorónico y así ayudar al proceso de glucoronización. (29)

-Metabolismo de la cafeína

La cafeína se absorbe en el intestino delgado, se metaboliza en el hígado, por la isoenzima del citocromo P-450 (CYP1A2), por desmetilación se transforma en paraxantina (85%), teobromina (10%) y teofilina (5%), excretándose solo el 1% como cafeína inalterada por la orina. Estos compuestos se transforman en derivados del ácido úrico. La paraxantina tiene el efecto de aumentar la lipólisis (descomposición de los lípidos), dando lugar a glicerol elevado y los niveles de ácidos grasos libres en el plasma sanguíneo. La teobromina dilata los vasos sanguíneos y aumenta el volumen de orina, mientras que la teofilina relaja los músculos lisos. La cafeína inhibe competitivamente la fosfodiesterasa, la enzima que degrada AMP cíclico. Este aumento de AMP cíclico por lo general media la mayoría de las acciones farmacológicas de la cafeína. Esto es debido a la similitud estructural de la cafeína con adenosina. Al bloquear el proceso de degradación del AMP cíclico, la cafeína afecta indirectamente a la regulación de las proteínas quinasas dependientes de cAMP, que son responsables de la regulación del

glucógeno, azúcares y metabolismo de los lípidos. Además, estimula la liberación de hormonas, en particular: la epinefrina (adrenalina).

1.17 Pruebas de Función Hepática

Se sugiere que la alteración en la actividad enzimática es un indicador importante de daño tisular. La biopsia hepática ha sido considerada como el método estándar para clasificar a la fibrosis, ya que permite obtener información diagnóstica, no solo acerca de la fibrosis sino también de otros procesos de daño hepático, como la necrosis, inflamación, esteatosis y entre otros. La alteración de la citoarquitectura en relación a cambios morfológicos, membranales, citoplasmáticos, de distribución celular, entre otros, en forma semicuantitativa puede hacerse en índices numéricos o también conocidos como índices de actividad histológicas. (30)

1.18 Índice de la actividad histológica

En la actualidad los sistemas de puntuación más utilizados para evaluar la biopsia hepática son, Knodell, Ishak y Metavir. Estos constituyen informes convencionales de la evaluación de biopsias, la cuales en sus inicios no proporcionaban criterios claros de valoración, convincentes y/o concluyentes para su análisis estadístico. Por lo que Knodell y cols., en 1981 establecieron la construcción un «índice de actividad histológica» (HAI). El método de Ishak, que es una modificación del método de Knodell, evalúa cuatro lesiones necroinflamatorias en cinco categorías, las cuales establecen a la necrosis periportal, lesiones necroinflamatorias del lobulillo, inflamación portal y necrosis confluyente. El sistema de puntuación Metavir, ha sido especialmente diseñado para evaluar el estado del hígado de personas infectadas con el virus de la hepatitis C (VHC). El índice incluye la suma de la puntuación asignada al grado de actividad inflamatoria observada en la muestra (0-4; siendo, 0 sin actividad y 3 o 4 la actividad considerada grave), además de la proporcionada por la estratificación, que representa la cantidad de fibrosis: 0 (sin cicatrices), 1 (cicatrices mínimas), 2 (la cicatrización ha ocurrido y se

extiende fuera de las áreas que contienen vasos sanguíneos), 3 (puentes de fibrosis extendiéndose y conectándose con otras áreas que contienen fibrosis) y 4 (cirrosis). (30)

La propuesta del método cuantitativo de este trabajo de investigación, es un análisis mediante el método de Ishak, el cual se basa en evaluar de una forma detallada y precisa, las alteraciones histológicas producidas por el consumo crónico de vodka con una bebida energizante, después de analizar los métodos de Knodell, Ishak y Metavir. Siempre tomando en cuenta que las lesiones presentes en hígado, nos sugieren un estado grave del órgano.

El método Ishak es un procedimiento histológico desarrollado para la evaluación cuantitativa de las alteraciones producidas por la hepatitis crónica, en el cual se consideran a la inflamación portal, necrosis, actividad periportal, necrosis lobulillar y fibrosis. Se compone de 4 números asignados en forma individual para conformar una sola puntuación. El primer componente de necrosis periportal y/o en puente evaluado en una escala de 0-4. El componente siguiente inflamación portal se puntúa de 0-4. La combinación de estos 2 marcadores es un indicador infalible de la inflamación en el hígado. El tercer componente se evalúa de 0-4 y se refiere a necrosis lítica focal. El cuarto componente indica la cantidad de fibrosis en el hígado y se puntúa de 0-6 como: siendo 0 (sin fibras), 1 (fibras cortas y cuerpos de Mallory Denk), 2 (fibras largas), 3 (fibras cerca de portal sin nódulo <25%), 4 (fibras en expansión de 25-50%), 5 (Fibras en zona lobulillar, presencia de nódulo >50%) y 6 (cicatrización, presencia de nódulo y esteatosis). (31)

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La mezcla de bebidas energizantes y vodka, se ha vuelto muy popular entre los jóvenes, representa un alto riesgo para la salud, ya que su consumo excesivo puede generar daños hepáticos irreversibles, además de coma etílico o un infarto fulminante. Prueba de ello lo muestra un estudio realizado en 10 universidades de Puebla, el cual reveló que 49% de los estudiantes de entre 17 y 23 años consumen la bebida energizante de manera regular y 65% la ingiere combinada con alcohol, principalmente cuando los jóvenes conviven en bares y antros.

Por lo que se plantea la siguiente pregunta científica:

¿Qué alteraciones histológico-enzimáticas en hígado, pueden ser inducidas por el consumo crónico de vodka combinado con una bebida energizante?

3. JUSTIFICACIÓN

La ingestión de alcohol combinado con las llamadas bebidas energizantes, ha sido de gran interés por la alta popularidad que ha obtenido en tan poco tiempo. Los consumidores frecuentemente hablan sobre una reducción en el sueño y un aumento en la sensación de placer cuando estas bebidas son combinadas con alcohol, indicando que pueden reducir los efectos depresivos en individuos. Este comportamiento es observado en poblaciones de jóvenes adultos, que, al buscar reactivarse, mezclan las bebidas energizantes con alcohol, creando cócteles potencialmente peligrosos en diferentes órganos con serios efectos secundarios, sin embargo, esto aún no es claro.

Se comienza a vislumbrar que la mezcla de estas bebidas con alcohol, pueden provocar hepatologías, las cuales son un problema grave de salud para la población. Por tales motivos, la finalidad de este proyecto es estudiar los efectos que produce el consumo crónico de esta combinación, pone en evidencia las alteraciones histológicas y enzimáticas que se presentan, las cuales a largo plazo contribuyen a patologías de suma gravedad como cirrosis, fibrosis, hígado graso no alcohólico y cáncer hepático.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo General

- Estudiar las alteraciones histológico-enzimáticas en hígado y sus consecuencias sobre la actividad motora en ratas administradas crónicamente con vodka y una bebida energizante.

4.2 Objetivos Específicos

- Evaluar la actividad motora en ratas Wistar con consumo crónico de vodka, bebida energizante y su combinación.
- Evaluar la actividad sérica de enzimas hepáticas de ratas Wistar con consumo crónico de vodka, bebida energizante y su combinación.
- Evaluar la actividad tisular de las enzimas hepáticas en rata Wistar con consumo crónico de vodka, bebida energizante y su combinación.
- Determinar el daño tisular inducido por el consumo crónico de vodka, bebida energizante y su combinación.

5. HIPÓTESIS

5.1 Hipótesis Nula

El consumo crónico de vodka, bebida energizante y su combinación en rata no genera cambios sobre la actividad motora, así mismo, la actividad enzimática e histológica en el hígado no se modifican a largo plazo.

5.2 Hipótesis Alternativa

El consumo crónico de vodka, bebida energizante y su combinación en rata genera cambios sobre la actividad motora, así mismo, modifican la actividad enzimática e histológica en el hígado a largo plazo.

6. DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN

6.1 Tipo de estudio

Experimental, analítico, prospectivo, observacional de corte transversal

6.2 Definición del universo

40 ratas macho Wistar con un peso de 250-300 g

6.3 Tamaño de la muestra

40 ratas macho Wistar macho

6.4 Criterios de Selección

-Criterios de inclusión: Ratas macho de la cepa Wistar, que médicamente no presenten signos de enfermedad, con zoometría dentro de los parámetros referenciados para la cepa y que alcancen el peso indicado dentro de las curvas de crecimiento establecidas.

-Criterios de exclusión: Ratas hembras, ratas macho de peso y tallas bajas, ratas con signos de enfermedad visibles, ratas con signos de daño hepático (oscurecimiento de la cola), con lesiones visibles.

-Criterios de eliminación: Ratas macho que presenten alguna malformación física o enfermedades metabólicas, enzimáticas o de lesiones previas o durante el proceso de exposición.

6.5 Definición del grupo control

Grupo control conformado por 10 ratas macho Wistar las cuales estarán en exposición con agua y alimentadas con Rodent Lab Chow 5001

6.6 Variables y definición de variables

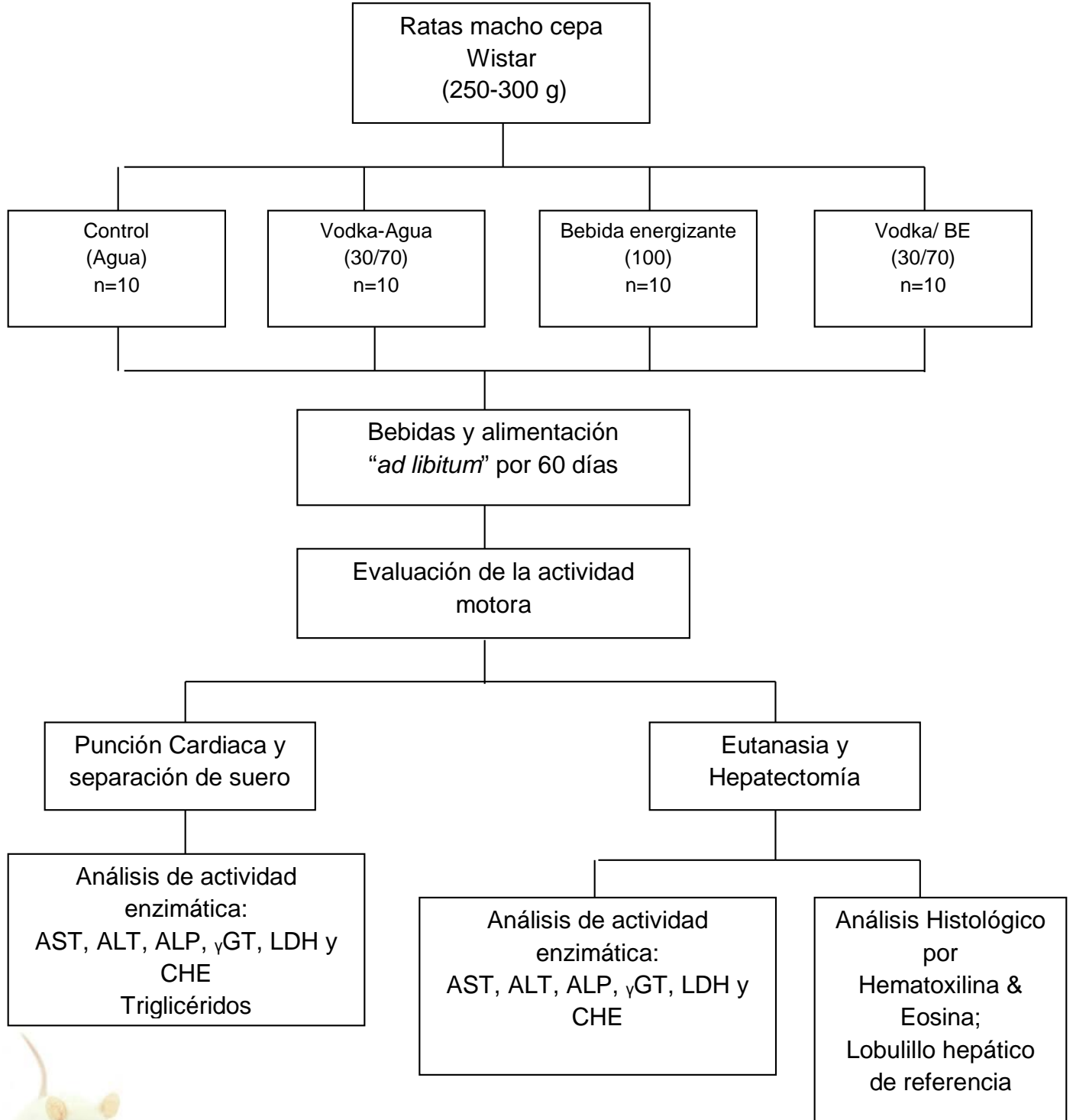
Independientes: Edad.

Dependientes: Daño tisular, valores enzimáticos: AST, ALT, ALP, γ GT, CHE y LDH.

6.7 Manejo estadístico de los datos y pruebas estadísticas

El análisis de resultados se realizará por ANOVA de una vía con un test post-hoc de Bonferroni.

7. DIAGRAMA DE TRABAJO



8. METODOLOGÍA

8.1 Animales de experimentación

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar de 250-300 gr de peso, provenientes del Bioterio Claude Bernard de la BUAP. Los animales se alojaron en el bioterio, se colocaron en cajas de acrílico, se mantuvieron con un ciclo de luz – oscuridad 12 / 12 horas a una temperatura de $22 \pm 20^{\circ}\text{C}$ con alimento y bebida *ad libitum*.

Se formaron los grupos experimentales (n=10) a los cuales se les dio diferente tratamiento, durante un periodo de 60 días.

Grupo 1: Grupo control el cual se expuso a agua

Grupo 2: Grupo el cual solo se expuso vodka al 30% y agua al 70%.

Grupo 3: Grupo el cual solo se expuso a bebida energizante al 100%

Grupo 4: Grupo problema en el cual se expuso la combinación de vodka con bebida energizante al 30%-70%.

Finalizando el tiempo de administración, los animales se sometieron a una prueba de la actividad motora en campo cerrado y posteriormente fueron anestesiados para obtener una muestra sanguínea y disecar el hígado de cada uno de los animales, los cuales serán procesados para evaluar las alteraciones histológico-enzimáticas.

8.2 Evaluación de la actividad motora en campo cerrado

Se utilizó una caja de actividad motora en campo cerrado de ocho fotodiodos (BUAP). Está hecha con material acrílico oscuro con dimensiones de 28 x 31 x 45 cm. La caja cuenta con ocho fotodiodos en la parte inferior y un contador automatizado que registra la interrupción de luz. Los animales fueron introducidos en las cajas durante 60 min y se cuantificó el número de cuentas acumuladas, las cuales son las veces en que la rata pasa a través la luz, esta se interrumpe por el movimiento y se contabiliza.

8.3 Determinaciones séricas

Los animales se sometieron a un ayuno de 4 a 5 horas, posteriormente fueron anestesiados con ketamina+xilazina (0.2 ml/100 g, ip.) para muestra por punción intracardiaca y se les extrajo 700 μ L de sangre (aproximadamente). Se recolectó la muestra en un tubo eppendorf, se centrifugó la muestra a 8000 r.p.m. durante 10 minutos, se separó el suero y se analizó.

El análisis enzimático de AST, ALP, γ GT, CHE Y LDH se llevó a cabo por medio del kit comercial SPINREACT y fue cuantificado por espectrofotometría en un analizador automatizado de química clínica (AUTOKEM II), para la medición de ALT se utilizó el kit de BIO SYSTEM y se cuantificó en el mismo equipo.

8.4 Determinaciones tisulares

Una vez extraída la muestra sanguínea, y se llevó a cabo la perfusión intracardiaca. Para ello, se hizo pasar solución salina isotónica a través de la arteria que lleva sangre del corazón al hígado para eliminar el exceso de sangre. Posteriormente se realizó la hepatectomía, en la cual, se hizo una incisión a lo largo del abdomen en la parte media del abdomen, seguidamente, se identificó el hígado es un órgano de color rojo purpúreo, tiene forma de un cuadrilátero irregular

aplanado; el cual se encuentra en el lado derecho fijado a la cara inferior del diafragma y a la pared ventral del abdomen.

Para la determinación enzimática 100 mg de tejido fueron homogenizados en 800 µl de SSI, se llevó a centrifugación a 13000 rpm por 10 min a 4°C. De los sobrenadantes se procedió a realizar el protocolo del kit comercial SPINREACT y fue cuantificado por espectrofotometría en un analizador automatizado de química clínica (AUTOKEM II)

Respecto a la determinación de triglicéridos séricos se siguió el protocolo descrito por el fabricante para el kit de SPINREACT de triglicéridos.

8.5 Preparación de los tejidos hepáticos para las técnicas histológicas.

Los tejidos obtenidos tras la hepatectomía se fijaron en formol al 4%, proceso por el cual se mantienen las estructuras celulares y moleculares en sus posiciones iniciales. Paso seguido se procedió a la deshidratación de las muestras eliminando gradualmente el agua de los tejidos por medio de xiloles y alcoholes, estos últimos a diferentes porcentajes, y finalmente se realiza el infiltrado con parafinas, hasta la completa inclusión del tejido, tomando en cuenta la orientación del tejido. Los tejidos fueron cortados en un micrótopo Leica RM2125 a un grosor de 5µM y colocados en portaobjetos previamente embebidos en poli-L-lisina al 0.1%, resguardándose hasta su uso para las diferentes técnicas utilizadas.

- **Tinción de hematoxilina y eosina**

La tinción de hematoxilina y eosina (H-E) es más comúnmente usada para el estudio histológico como en el patológico; consiste en la aplicación de hematoxilina de Harrison que tiene un carácter básico y tiñe a los núcleos (carácter ácido) de color azul morado; la eosina que es un colorante ácido, tiñe el citoplasma y las fibras colágenas en un color rosado por tener un carácter básico. La técnica consistió en desparafinar e hidratar los tejidos, posteriormente, se tiñeron durante cinco minutos en hematoxilina de Harrison, y se lavaron (2 baños) con agua destilada durante un minuto. Para eliminar el exceso de colorante, se empleó alcohol ácido durante un minuto, para luego ser contrastados con eosina durante dos minutos. Finalmente, los tejidos fueron deshidratados, aclarados a través de alcohol etílico durante 2 minutos.

La tinción de H-E se utilizó para analizar y cuantificar el número de células dañadas en el hígado. El daño de las células fue reconocido en el caso de observar alteraciones como fibrosis, inflamación, necrosis lítica, necrosis confluyente e necrosis periportal.

8.6 Evaluación de daño tisular

El análisis de daño tisular se evaluará a través de la modificación del Índice de Actividad Histológica, por sus siglas en inglés (HAI - Ishak Score). El cual se basa en la evaluación histológica se tomó como referencia la triada portal, se observaron las laminillas a 20X y se tomó una fotomicrografía. La evaluación de las fotomicrografías se basó en el Índice de Actividad Histológica de Ishak, donde se evaluarán los siguientes aspectos:

-Fibrosis:

- 0- Ausente
- 1- Fibras cortas con presencia de cuerpos de Mallory Denk
- 2- Fibras largas con presencia de cuerpos de Mallory Denk
- 3- Fibras cerca de espacios porta < 25 % sin presencia de nódulo
- 4- Fibras expansión 25-50%
- 5- Fibras en zona lobulillar < 50%, presencia de nódulo
- 6- Cirrosis, presencia de esteatosis

-El infiltrado inflamatorio intraportal:

- 0- Ausente
- 1- Inflamación presente <25%
- 2- Presencia de leucocitos + hepatocitos inflamados <25%
- 3- Presencia de leucocitos + hepatocitos inflamados 25% a 50%
- 4- Presencia de leucocitos + hepatocitos inflamados 50% a 100%

-Necrosis lítica focal:

- 0- Ausente
- 1- Presencia de necrosis focal, apoptosis e inflamación focal 10%
- 2- Presencia de necrosis focal, apoptosis e inflamación focal 25%
- 3- Presencia de necrosis focal, apoptosis e inflamación focal 25% - 50%
- 4- Presencia de necrosis focal, apoptosis e inflamación focal 50% -100%

-Necrosis confluyente:

- 0- Ausente
- 1- Presencia de necrosis confluyente 10%
- 2- Presencia de necrosis confluyente 10 %-25%
- 3- Presencia de necrosis confluyente 25% - 50%
- 4- Presencia de necrosis confluyente 50% - 75%

- 5- Presencia de necrosis confluyente + zona central y portal
- 6- Presencia de necrosis confluyente + zona central y portal al 100%

-Necrosis periportal:

- 0- Ausente
- 1- Presencia de necrosis + infiltrado leucocitario en vena o arteria <50%
- 2- Presencia de necrosis + infiltrado leucocitario en vena o arteria 50% - 100%
- 3- Presencia de necrosis + infiltrado leucocitario en vena y arteria < 50%
- 4- Presencia de necrosis +infiltrado leucocitario en vena y arteria 50 %- 100%

8.7 Análisis estadístico

Los datos obtenidos serán expresados como la Media \pm el Error Estándar del Método (EEM) para todos los experimentos. El análisis de resultados se realizará por ANOVA de una vía con un test post-hoc de Bonferroni, considerándose significativa cuando p sea \leq a 0.05.

8.8 Control de calidad

Se realiza según los procedimientos estándares del Laboratorio Clínico Especializado “Los Ángeles”, los cuales se basan en: Verificación de limpieza y autocalibrado de la lámpara, rejillas y celdillas de lectura del equipo AutoKem II, calibración del equipo, y verificación de función con controles normal y patológico alto.

8.9 Medidas de seguridad

Las medidas de seguridad serán acatadas bajo la NORMA Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002, protección ambiental-Salud ambiental-Residuos peligrosos biológico infecciosos-Clasificación y especificación de manejo y las Normas establecidas por el Laboratorio Clínico Especializado “Los Ángeles”, Puebla.

El manejo de los animales de laboratorio se realizará de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 “Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio”, se deberá tomar el curso de uso y manejo de animales de laboratorio, haciendo énfasis en el de rata Wistar en el bioterio Claude Bernard, de la BUAP.

Portar bata al entrar al laboratorio y durante el manejo de los murinos, despejar y acondicionar por completo el área antes de trabajar, trabajar de una manera organizada.

9. RESULTADOS

9.1 Evaluación de la actividad motora de ratas por consumo crónico de vodka en combinación con bebidas energizantes.

Para demostrar el efecto del consumo crónico de la combinación de vodka con bebidas energizantes sobre la actividad locomotora en ambiente novedoso, se emplearon cajas de acrílico de actividad locomotora de campo cerrado. La prueba se desarrolló a los días 0 y 60 del tratamiento respectivo. Los resultados demostraron que el grupo control registró un promedio de 876 cuentas acumuladas en el día 0, mientras que al día 60 se registró un promedio de 872 de cuentas acumuladas.

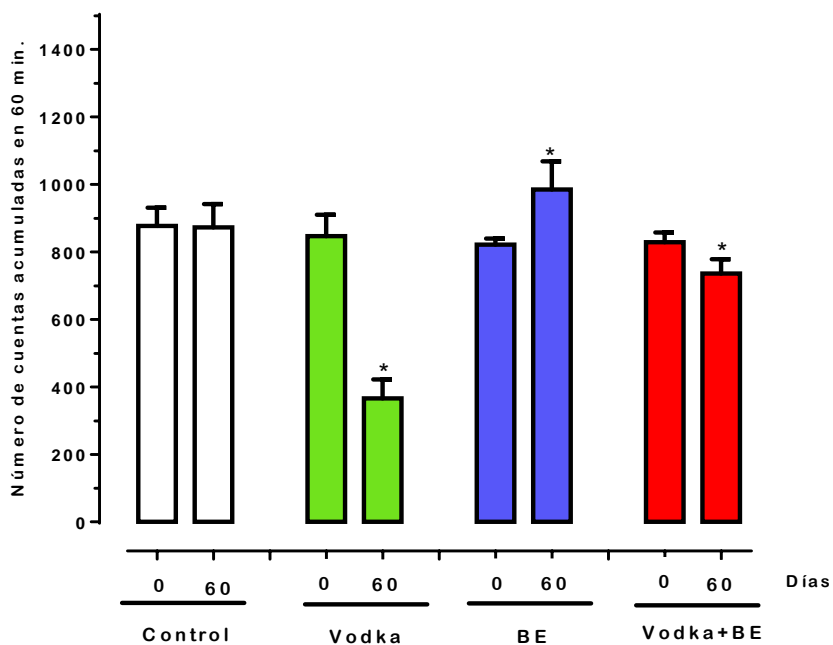


Figura 12.- Efecto del consumo crónico de alcohol en combinación con bebidas energizantes (BE) sobre la actividad motora en campo cerrado. - Se midió la actividad motora a los días 0 y 60 de tratamiento, se observa la comparación de las evaluaciones en los grupos experimentales respecto al control. Los datos graficados, corresponden a la media \pm EEM. ANOVA de una vía, (*). Indica diferencia significativa con respecto al grupo control $p < 0.05$.

El análisis estadístico demostró que el tratamiento con agua no modifica la actividad motora. Por otra parte, el grupo que consumió únicamente vodka mostró un promedio 846 y 365 de cuentas acumuladas, en los tiempos 0 y 60 respectivamente. Lo cual demuestra que el consumo por 60 días de vodka disminuye la actividad motora en un 55%. Respecto al grupo que consumió la bebida energizante el promedio de cuentas acumuladas fue de 821, 947 respectivamente, relevando un incremento significativo del 14% de la actividad motora. Finalmente, el grupo que consumió la combinación vodka-bebida energizante registró un promedio de 829 en del día 0 y 736 de cuentas acumuladas en el día 60. Esto indica que la combinación de estas bebidas disminuye un 11 % la actividad motora.

9.2 Efecto del consumo crónico de vodka en combinación con bebidas energizantes sobre la actividad enzimática en suero

El daño a nivel hepático fue caracterizado por la actividad enzimática sérica, producto del incremento en rutas secretorias o daño en la estructura de los hepatocitos. Para efectos de este estudio se tomó en cuenta los marcadores más utilizados clínicamente para un perfil hepático, que evalúa enzimas como ALT, AST, ALP, γ GT, LDH y CHE.

Se evaluó la actividad de ALT en suero obtenido de ratas a 60 días, en los diferentes grupos. El análisis de los datos revela el incremento de los grupos vodka, bebida energizante y vodka-bebida energizante (**Figura 13-A**) con un porcentaje de 1201%, 992% y 879%, respectivamente. Siendo estadísticamente diferentes respecto al control.

Al igual se evaluó la actividad de la enzima AST. Los resultados revelan el aumento de la misma (**Figura 13-B**), el grupo que consumió vodka aumentó en un 327.6%, el grupo que consumió la bebida energizante mostró un incremento de 215.9%, mientras que el grupo con la combinación vodka-bebida energizante aumentó 89.7%. La comparación contra el grupo control revela que existe diferencias significativas.

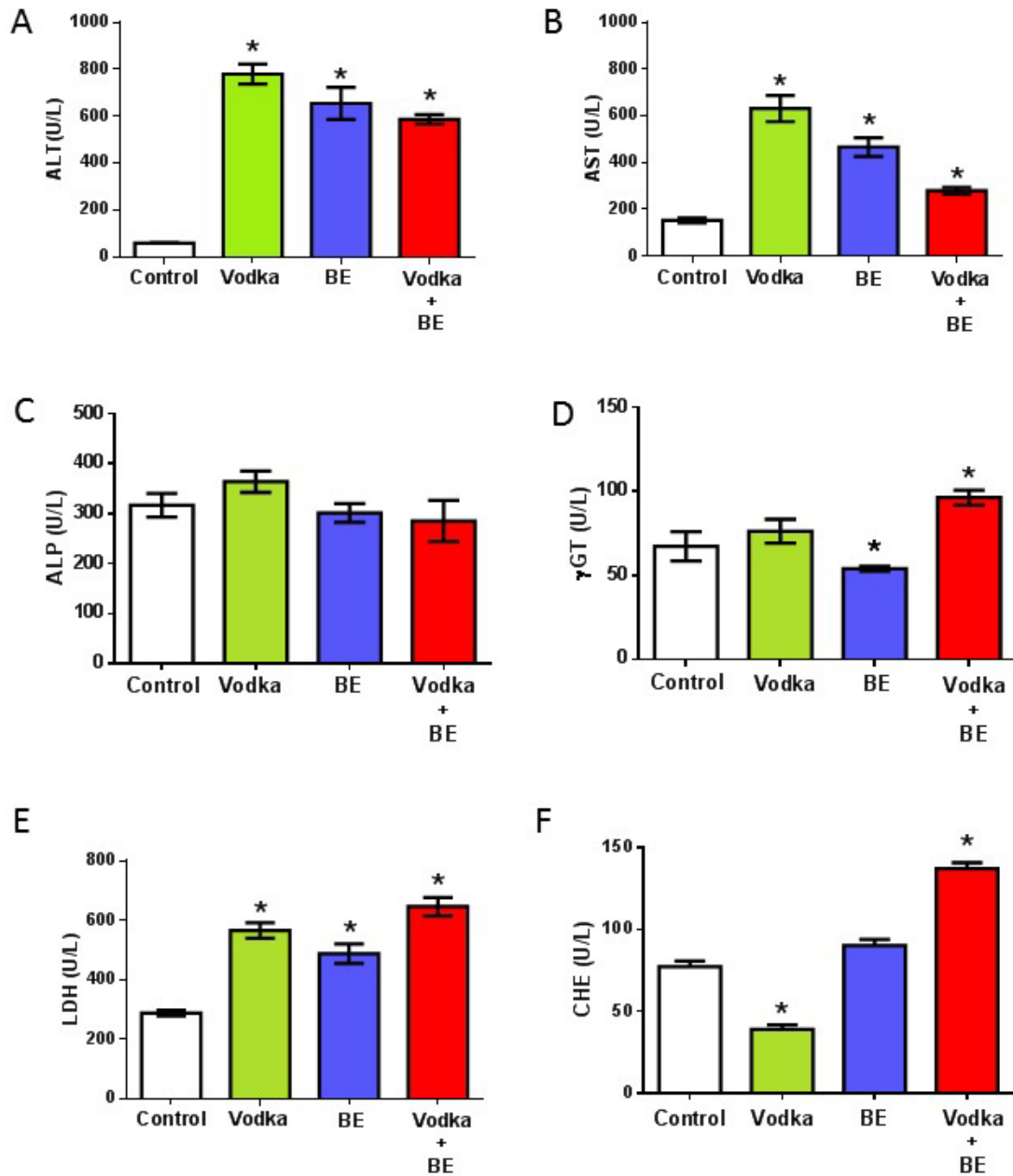


Figura. 13- Enzimología sérica. A) Alanino aminotransferasa (ALT). B) Aspartato aminotransferasa (AST) C) Fosfatasa alcalina (ALP) D) Gamma glutamiltranspeptidasa (γ GT), E) Lactato deshidrogenasa (LDH), F) Colinesterasa (CHE). La actividad enzimática sérica se expresó en U/L (*) indica diferencia significativa respecto al grupo control por el estadístico ANOVA $p < 0.05$

La evaluación de ALP (**Figura 13-C**) reveló que el grupo tratado con vodka presenta un ligero aumento de 14.9%, mientras que el grupo que bebió la bebida energizante y el grupo que consumió la combinación vodka-bebida energizante presenta una disminución de 4.8% y 9.8% respectivamente. Sin diferencias respecto al grupo control.

La valoración de la enzima γ GT (**Figura 13-D**) muestra un ligero incremento de 13.3% en el grupo que consumió vodka, disminución del 19.9% en el caso del grupo BE. Por su parte, el grupo que consumió vodka en combinación con la bebida energizante presentó una elevación del 43.0% respecto al control. Siendo significativa la disminución en el grupo BE e incrementada en el grupo vodka + BE.

En la **Figura 13-E** se muestra la actividad enzimática de LDH, en la cual los resultados indican que existe una diferencia significativa durante el consumo, se observa el incremento significativo de la actividad en un 97.1%, 69.7%, 125.1%, en los diferentes grupos respectivamente.

Otra de las enzimas evaluadas fue CHE (**Figura 13-F**) en la cual se muestra una disminución en su actividad del 49.4% en los animales que consumieron vodka, sin embargo, de manera contraria el grupo que consumió la bebida energizante incrementó 16.4%, el grupo con la combinación, presentó elevación del 77.1% existiendo diferencias significativas con respecto al grupo control.

Se ha reconocido que la elevación sérica de las aminotransferasas es el parámetro bioquímico que mejor refleja la lesión hepatocelular. El índice AST/ALT en suero es un indicador útil de hepatopatía alcohólica, vírica o tóxica. (5) La **Figura 14**, representa el índice AST/ALT en donde muestra para cada grupo una disminución de 66.7%, 69.8%, 80.6% respecto al grupo control; este índice presenta diferencias significativas en todos los grupos.

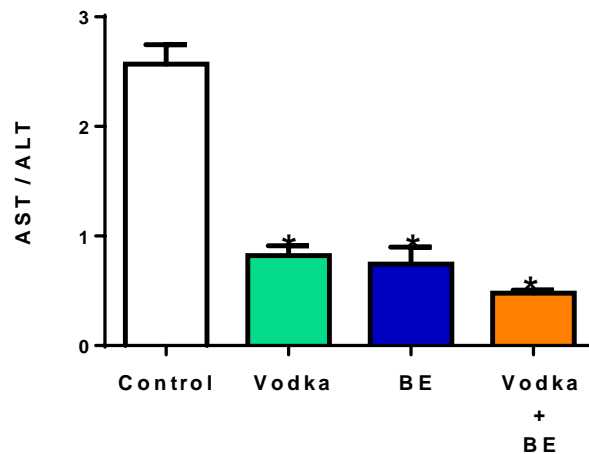


Figura. 14.- Índice AST/ALT. Diferentes grupos de consumo con los protocolos de las bebidas y su combinación. (*) Indica diferencia significativa respecto al grupo control por el estadístico ANOVA $p < 0.05$

Dado el Índice AST/ALT los resultados sugieren una dinámica citoplasmática en la cual existe una excreción de ALT mayor a AST. Por lo que para confirmar los resultados fue evaluado el índice de ALT /LDH, que de existir una necrosis lítica presentarían valores por debajo del control (64). La evaluación del índice ALT/LDH mostró que el grupo que consumió vodka + BE presenta un aumento de 337.9% estadísticamente significativo. Así mismo, el grupo que consumió vodka presentó un incremento de 561.2% y el grupo tratado con BE presentó un comportamiento similar del 544.2%.

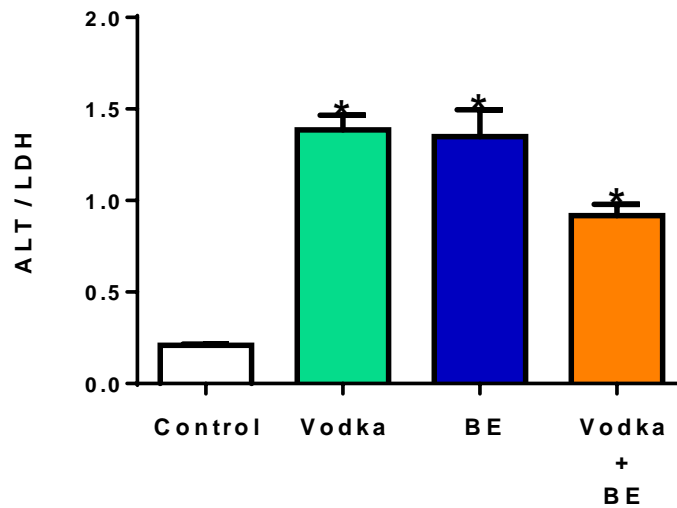


Figura. 15. Índice ALT/LDH. Diferentes grupos bajo el consumo de los protocolos de las bebidas y su combinación. (*) Indica diferencia significativa respecto al grupo control por el estadístico ANOVA $p < 0.05$

Además de las enzimas existen cambios muy bien definidos que desencadenan el daño hepático, tales como la acumulación de lípidos dentro de los hepatocitos, principalmente en forma de triglicéridos.

La síntesis de triglicéridos tiene lugar en el retículo endoplásmico de las células, principalmente en el hígado, es donde este proceso es más activo y de mayor relevancia metabólica. Se observó que un incremento de triglicéridos séricos en los tres casos respecto al control; en el caso del grupo que solo consumió vodka se observó un incremento del 66.5%, el cual presenta diferencias significativas al igual que el grupo que consumió la BE con un porcentaje de 29.7%; mientras que el grupo tratado con la combinación vodka + BE se observó un ligero aumento del 4.6% sin diferencia significativa (**Figura 16**).

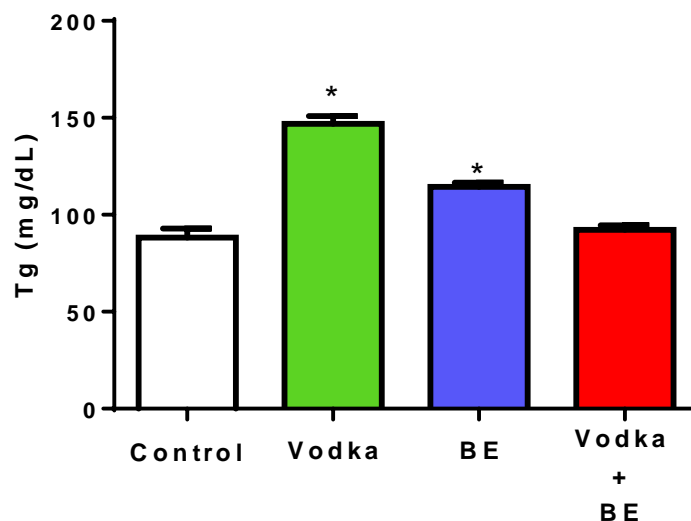


Figura. 16. Evaluación de Triglicéridos séricos. La medición de triglicéridos se expresó en (mg/dL) (*) Indica diferencia significativa respecto al grupo control por el estadístico ANOVA $p < 0.05$

Una vez finalizada la evaluación de las enzimas séricas, se llevó a cabo la hepatectomía para extraer los hígados de los animales, los cuales fueron separados utilizando el lóbulo izquierdo para la evaluación de enzimas a nivel tisular y el derecho para ser procesado por la técnica de hematoxilina- eosina; con la finalidad de evaluar la morfología celular. Para evaluar el daño hepatológico inducido por el alcohol, BE y la combinación de vodka con BE.

9.3 Efecto del consumo crónico de vodka en combinación con bebidas energizantes sobre el daño tisular en hígado

La evaluación de la actividad de las enzimas presentes en este tejido proporciona una mejor comprensión de los cambios bioquímicos que sufre el hígado ante el consumo de vodka así como las BE, la alteración de la citoarquitectura, los probables cambios morfológicos indicarán el grado de lesión.

Como muestra la **Figura 17-A** la determinación de ALT, la cual es una enzima que se localiza en citoplasma, indica que el consumo de vodka, BE y su combinación induce una mayor producción de la enzima con respecto al grupo únicamente tratado con agua. De forma particular los resultados de los niveles de ALT muestran que el grupo tratado con vodka más BE incremento en 90.9%, 11.9% y 150.2% con vodka y BE, respectivamente.

En el caso de la AST se localiza tanto en citoplasma como en mitocondria, en esta última en mayor medida, se observó que en el caso contrario de ALT, su actividad disminuye, Por lo que el grupo que fue tratado con la combinación de vodka + BE presenta un incremento mayor de 376.0%, el cual tiene diferencia significativa en comparación con el grupo control, mientras que los grupos tratados con vodka y BE presentan un incremento de 125.2% y 94.0%, como se muestra en la **Figura 17-B**

Respecto de la evaluación de ALP, enzima que se encuentra en la superficie de hepatocitos de canalículos biliares, las lesiones únicas de hepatocitos no observan cambios importantes en su síntesis, debido a esto se observó un ligero incremento en los animales del grupo que consumió vodka y el grupo que consumió vodka + BE, de 15.82% y un 15.33% respectivamente, ambos con diferencias significativas similares. Por otra parte, el grupo de animales que consumió BE

presentan una disminución significativa de 36.92% respecto al grupo control, por lo que se sospecha que en este grupo no existe diferencia significativa. **Figura 17-C**

En la **Figura 17-D** se presenta la actividad enzimática de γ GT, la cual se sitúa en la membrana de hepatocitos y células del conducto biliar, abunda también en sus microsomas, en donde se observó un comportamiento similar a las transaminasas, lo que evidencia una mayor producción de esta enzima. El grupo que consumió vodka + BE presenta un incremento 219.7% de producción, mientras que los grupos bajo el consumo de vodka y BE tienen un comportamiento similar aumentando un 104.5% y 100% respectivamente, presentando un incremento significativo respecto al grupo control.

En la **Figura 17-E** LDH se encuentra incrementada con la combinación de alcohol + BE con un porcentaje de 442.3%; se observa un alza de 240% por el consumo de vodka, mientras que el grupo tratado con BE presentó un 59.2%, muestran diferencias significativas durante el consumo respecto al control.

Finalmente, la evaluación de la colinesterasa (**Figura 17-F**) mostró que la combinación de vodka + BE presenta un incremento del 67.4%, los cuales presentan estadísticamente diferencias significativas respecto al control, mientras tanto el grupo de vodka como el de BE tiene una disminución del 26.3% y 7.2% respectivamente.

Aunado a los resultados obtenidos se considera que alteraciones plasmáticas pueden sugerir cambios notables en la estructura de los tejidos, por lo que requiere ser reforzado con el estudio de histología hepática con otras evaluaciones para la detección de daño tisular.

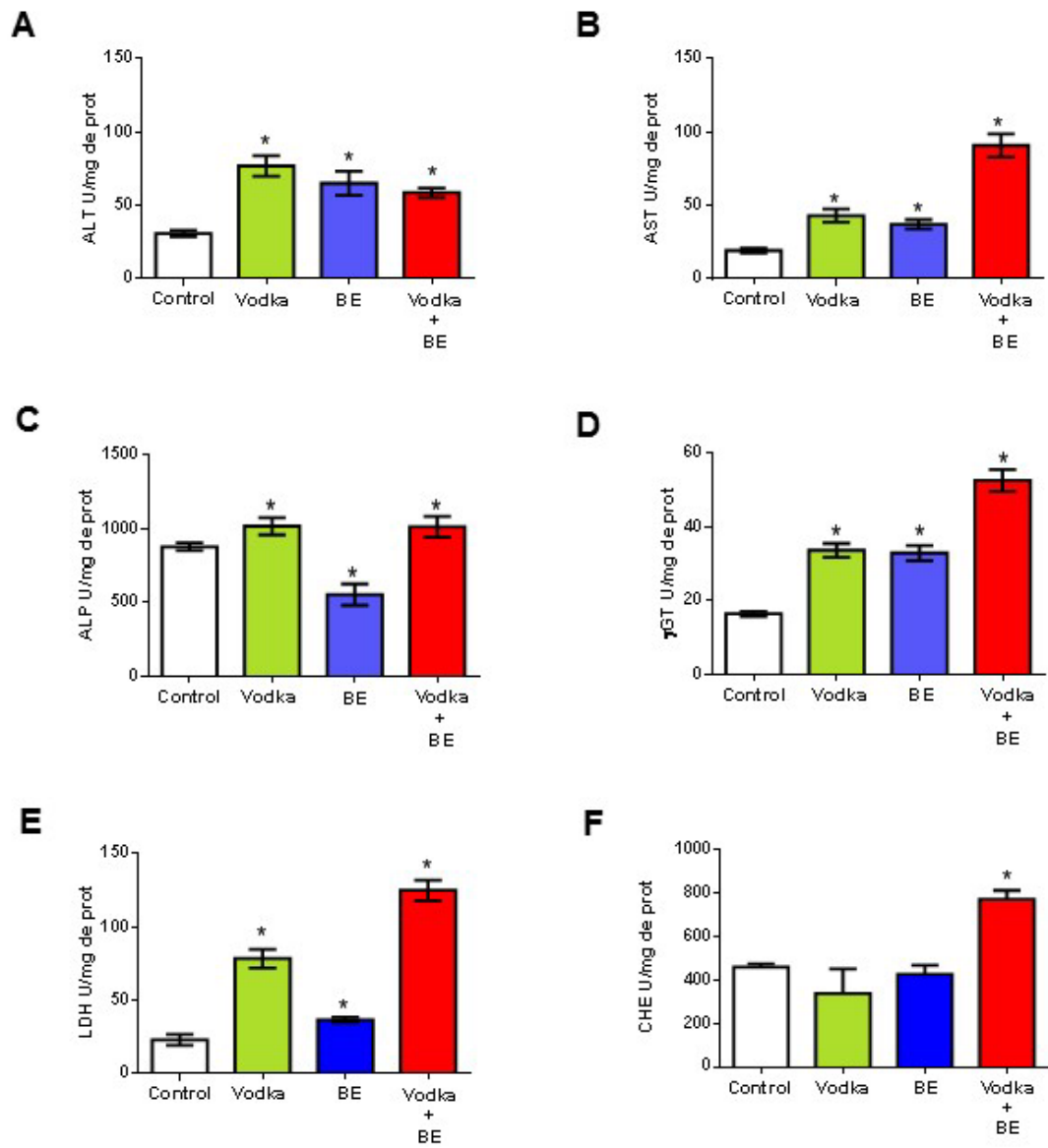


Figura. 17.- Actividad de la enzimología hepato-tisular. A) Alanino aminotransferasa (ALT). B) Aspartato aminotransferasa (AST) C) Fosfatasa alcalina (ALP) D) Gamma glutamiltranspeptidasa (γGT), E) Lactato deshidrogenasa (LDH), F) Colinesterasa (CHE). La actividad enzimática a nivel tisular se expresó en U/mg de proteína (*) indica diferencia significativa respecto al grupo control por el estadístico ANOVA $p < 0.05$

9.4 Evaluación histológica y cuantitativa del grado de alteración hepatotisular.

Para la evaluación histológica se observaron las laminillas a 20X, posteriormente se tomaron fotomicrografías, para hacer la evaluación histológica en base al Índice de Actividad Histológica de Ishak.(31)

El primer parámetro a evaluar fue la presencia de fibrosis hepática la cual se localiza alrededor de la vena portal, así como, se encuentra finamente entre las sinusoides y alrededor de los conductillos hepáticos.

En la **Figura 18-A** se aprecian fibras cortas de colágeno las cuales se identifican por ser fibras gruesas localizadas principalmente alrededor de la vena central y largas caracterizadas por ser más delgadas orientadas al azar entre sinusoides, además de observó la presencia de cuerpos de Mallory Denk los cuales se identifican por ser células balonizadas que contienen acumulaciones eosinofílicas en su citoplasma.(200) En los diferentes grupos que consumió vodka, BE y su combinación, se observan fibras entre sinusoides, así como alrededor de la vena portal. Por otra parte, de acuerdo al HAI- Ishak Score se observó que en comparación con el grupo control, el grupo que consumió vodka + BE muestra un alza de 136.5%, así como el grupo que solo se trató con Vodka tuvo un incremento de 102.5%, mientras que el grupo que consumió BE presentó un alza de 85%. **(Figura 18-B)**

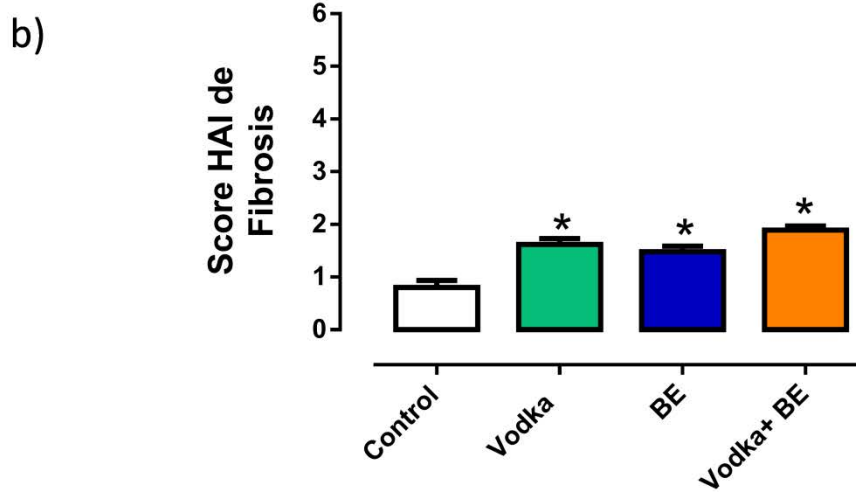
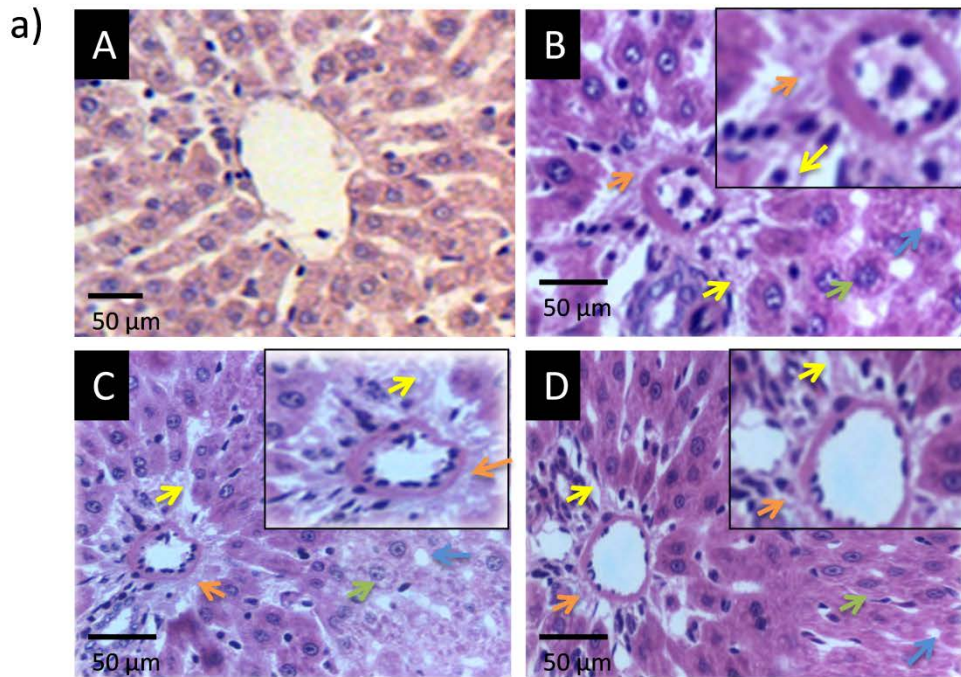


Figura. 18- Corte histológico del lobulillo hepático. A. Grupo Control el cual solo consumió agua **B.** Grupo que consumió vodka **C.** Grupo que consumió la bebida energizante **D.** Grupo que consumió la combinación vodka con bebida energizante **a)** Fotomicrografía muestra la presencia de fibrosis al termino del consumo. Técnica H&E, 20X. Presencia de fibras cortas (→), Presencia de fibras largas (→), Presencia de Cuerpos de Mallory Denk (→), Presencia de esteatosis(→) **b)**Evaluación cuantitativa del grado de fibrosis hepato-tisular. El análisis cuantitativo del grado de fibrosis se expresó en puntos (*) indica diferencia significativa respecto al grupo control por el estadístico ANOVA $p < 0.05$

El infiltrado inflamatorio intraportal está compuesto por leucocitos, los cuales se pueden observar desde pocas células, hasta formar paquetes densos celulares (**Figura 19-A**). De acuerdo al HAI- Ishak Score se evaluó bajo la presencia de leucocitos, en el caso de los tres grupos vodka, BE y su combinación presentan un incremento significativo respecto al control (**Figura 19-B**).

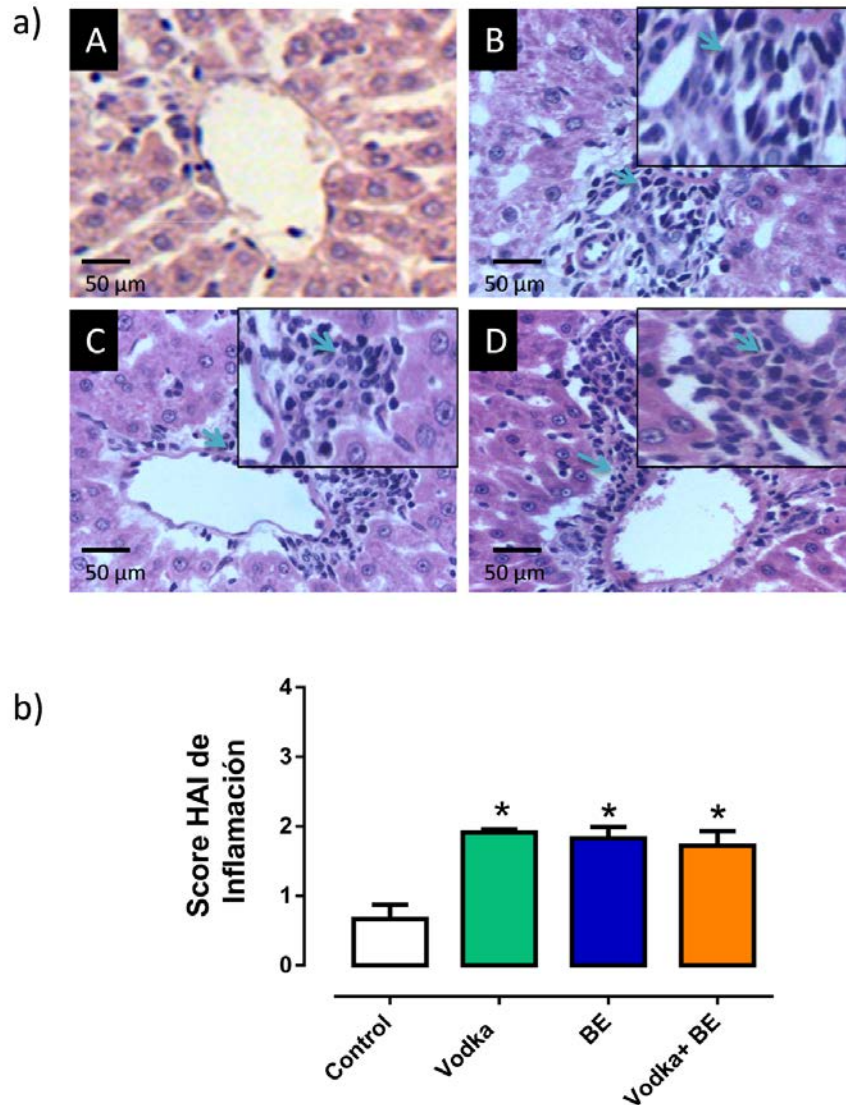


Figura. 19- Corte histológico del lobulillo hepático. **A.** Grupo Control el cual solo consumió agua **B.** Grupo que consumió vodka **C.** Grupo que consumió la bebida energizante **D.** Grupo que consumió la combinación vodka con bebida energizante **a)** Fotomicrografía muestra la presencia de inflamación al término del consumo. Técnica H&E, 20X. Presencia de infiltrado leucocitario (→) **b)** Evaluación cuantitativa del grado de inflamación hepato-tisular. El análisis cuantitativo del grado de inflamación se expresó en puntos (*) indica diferencia significativa respecto al grupo control por el estadístico ANOVA $p < 0.05$

La necrosis lítica focal produce una respuesta inflamatoria con acumulo de linfocitos con material lisado. En estos sitios de necrosis hay colapso y ruptura de la trama reticular con el citoplasma de aspecto pálido, además de la presencia de apoptosis, así como inflamación focal (**Figura 20-A**). En base al HAI- Ishak Score en el caso del grupo que consumió Vodka mostró un incremento de 160%, el que consumió la BE aumentó 184 %, mientras que la combinación 127%, todos los grupos presentan un incremento significativo respecto al grupo control (**Figura 20-B**).

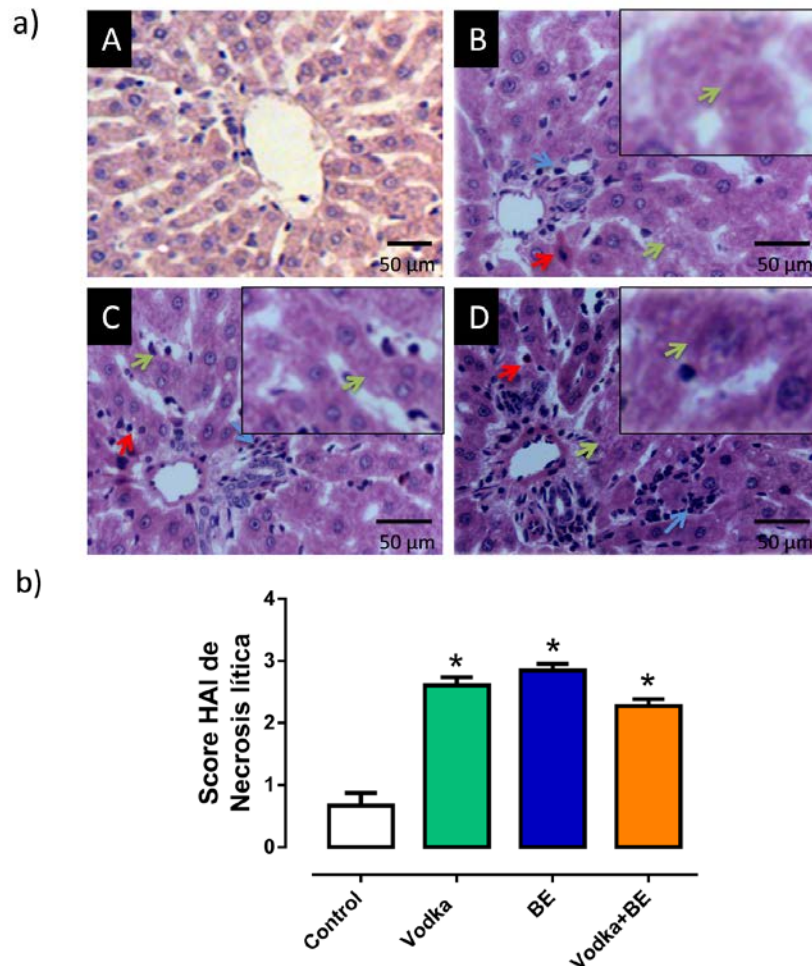


Figura. 20- Corte histológico del lobulillo hepático. A. Grupo Control el cual solo consumió agua **B.** Grupo que consumió vodka **C.** Grupo que consumió la bebida energizante **D.** Grupo que consumió la combinación vodka con bebida energizante **a)** Fotomicrografía muestra la presencia de necrosis lítica al termino del consumo. Técnica H&E, 20X Presencia de necrosis lítica (\rightarrow), apoptosis (\rightarrow) e infiltrado leucocitario (\rightarrow) **b)** Evaluación cuantitativa del grado de necrosis lítica hepato-tisular. El análisis cuantitativo del grado de necrosis lítica se expresó en puntos (*) indica diferencia significativa respecto al grupo control por el estadístico ANOVA $p < 0.05$

La necrosis confluyente se caracteriza por ser un área que cubre el espacio ocupado por cuatro o cinco hepatocitos (**Figura 21-A**). Respecto al HAI-Ishak Score se observó que el grupo que consumió vodka presentó un 74.1%, mientras que el grupo que consumió la BE un 50.7% y la combinación de estos un 35.6 %, los diferentes grupos presentan un incremento significativo respecto al control (**Figura 21-B**)

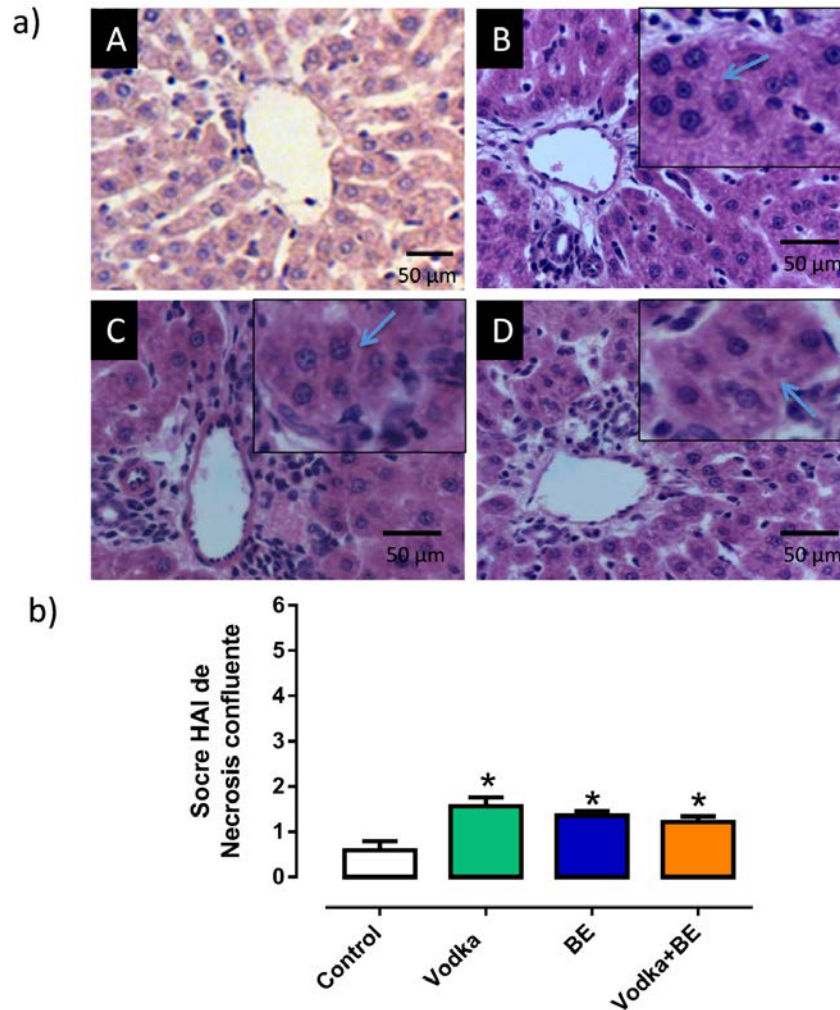


Figura. 21- Corte histológico del lobulillo hepático. A. Grupo Control el cual solo consumió agua **B.** Grupo que consumió vodka **C.** Grupo que consumió la bebida energizante **D.** Grupo que consumió la combinación vodka con bebida energizante a) Fotomicrografía muestra la presencia de necrosis confluyente al termino del consumo. Técnica H&E, 20X Presencia de necrosis confluyente (→) **b)** Evaluación cuantitativa del grado de necrosis confluyente hepato-tisular. El análisis cuantitativo del grado de necrosis confluyente se expresó en puntos (*) indica diferencia significativa respecto al grupo control por el estadístico ANOVA $p < 0.05$

La necrosis periportal es aquella en la que hay una gran cantidad de hepatocitos necróticos cercanos a la vena centrolobulillar, por presencia de infiltrado leucocitario comprendiendo áreas que abarcan zonas entre la vena y arteria portal (**Figura 22-A**). Al ser evaluados con el HAI los tres grupos presentaron un incremento, en el caso de vodka aumentó un 314.4%, al igual que el grupo que consumió la BE obtuvo un porcentaje de 323.3%, mientras que el grupo que consumió vodka-BE alcanzó un 354.1% en comparación con el grupo control.

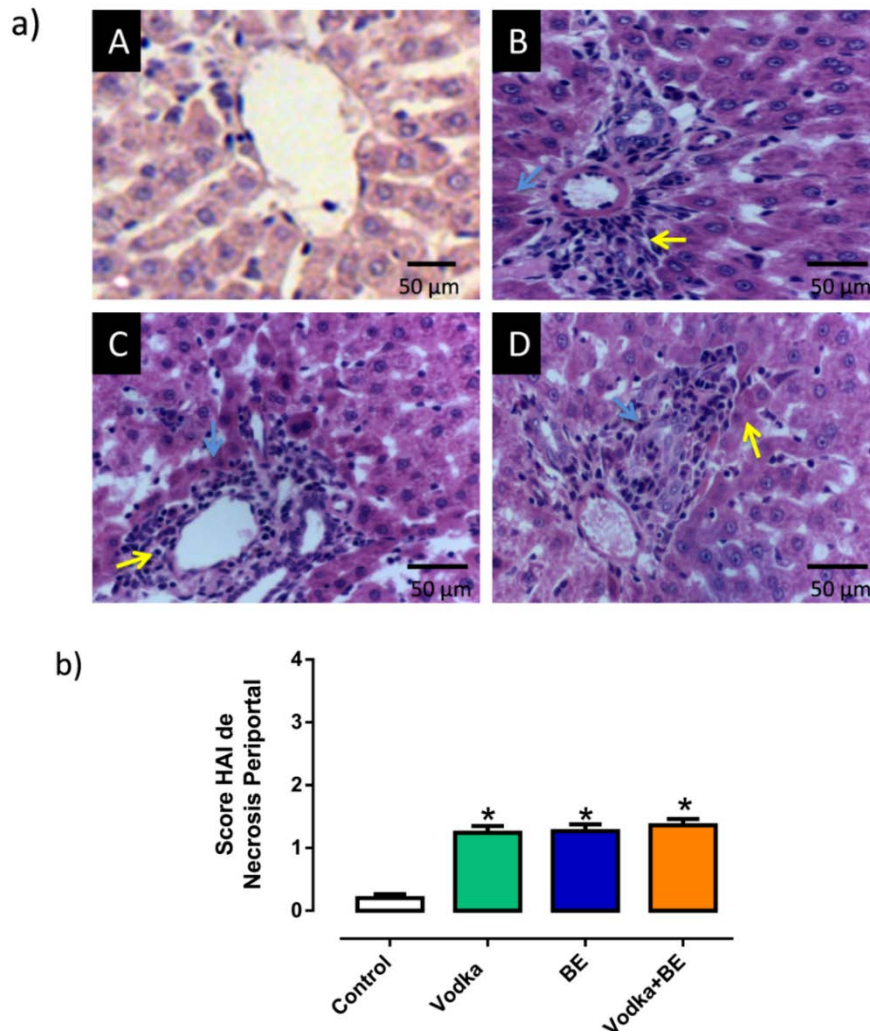


Figura. 22- Corte histológico del lobulillo hepático. A. Grupo Control el cual solo consumió agua **B.** Grupo que consumió vodka **C.** Grupo que consumió con bebida energizante **D.** Grupo que consumió la combinación vodka con bebida energizante a) Fotomicrografía muestra la presencia de necrosis periportal al termino del consumo. Técnica H&E, 20X Presencia de infiltrado leucocitario en vena portal, arteria portal y canículos biliares (→), Presencia de necrosis periportal (→) b) Evaluación cuantitativa del grado de necrosis periportal hepato-tisular. El análisis cuantitativo del grado de necrosis periportal se expresó en puntos (*) indica diferencia significativa respecto al grupo control por el estadístico ANOVA $p < 0.05$

10. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En el presente trabajo se estudiaron las alteraciones enzimáticas e histológicas a nivel hepático, que son inducidas por el consumo crónico de vodka en combinación con bebida energizante por 60 días, los cuales fueron acompañados por un deterioro en la actividad motora, evaluada en una prueba de campo cerrado.

En una primera instancia, para abordar la toxicidad propiciada por consumo de vodka y bebidas energizantes por separado o en su combinación se evaluó la actividad motora. Diversos artículos demuestran que la toxicidad ocasionada por consumo crónico de alcohol disminuye la actividad motora. (32) Esto se debe a que el vodka es una sustancia que inhibe el SNC. Cuando se ingiere alcohol, éste se absorbe rápidamente por la vena porta, posteriormente pasa al corazón y por medio de la sangre (15% del total de sangre bombeada por minuto) se distribuye a los diferentes órganos, incluyendo el cerebro. Los efectos iniciales de la ingesta de alcohol se manifiestan en una depresión del SNC debido a la inhibición de los centros cerebrales superiores, que luego se extiende a las zonas bajas del encéfalo y a los centros emocionales ubicados bajo la corteza, hasta el tronco cefálico. Por ello el control de la actividad motora, la inhibición social, el habla, la visión y el estado natural de alerta se pierden proporcionalmente al consumo de alcohol. (33)

Por lo contrario, el consumo prolongado de los constituyentes de las bebidas energizantes como la cafeína y la taurina, incrementan la actividad motora, debido a que promueven la liberación de dopamina, el cual es el neurotransmisor catecolaminérgico más importante del SNC, participa en la regulación de diversas funciones como la conducta motora, la emotividad y la afectividad, así como en la comunicación neuroendocrina. Así mismo, también se ha demostrado que la cafeína es un antagonista de los receptores de adenosina, los cuales, se localizan en el SNC; por lo tanto, el consumo de cafeína inhibe la acción de adenosina sobre

diferentes grupos neuronales, que regulan los efectos sedativos, ansiolíticos e inductores de sueño. (34)

La cafeína se ha utilizado como tratamiento en la intoxicación moderada por los depresores del sistema nervioso. (35) Sus acciones estimulantes podrían ser responsables en relación al antagonismo parcial a los efectos depresivos del alcohol. (36) Sin embargo, los investigadores no han llegado a un consenso sobre la dosis necesaria para un efecto significativo en la reducción del estado depresivo causado por la ingesta de alcohol. La mayoría de los estudios referentes a los efectos de la cafeína en relación al deterioro causado por la ingestión de alcohol se basan en pruebas las cuales evalúan la eficiencia locomotora. En general, la reducción en el deterioro causado por el alcohol, sólo se observó después de la administración de dosis altas de cafeína, lo que contraindicaría su uso. (37) (38)

Por otra parte, la taurina actúa inhibiendo los receptores GABA_A, GABA_B y en particular con gran afinidad por el receptor de glicina. Es así como promueve una despolarización en las neuronas, en donde aumentan los niveles de calcio intracelular. (39) Estudios previos han demostrado interacciones farmacológicas entre alcohol y algunos de los principales componentes de las bebidas energéticas (taurina y cafeína). De acuerdo a Olive (40), la taurina puede alterar la locomoción estimulante, sedante, y los efectos motivacionales cuando es combinado con alcohol, y esto es dependiente de la dosis ingerida o administrada. Estudios de microdiálisis han revelado que el etanol eleva los niveles extracelulares de taurina en numerosas regiones del cerebro. Adicionalmente también se ha sugerido que el sistema de taurina endógena puede ser un importante modulador de los efectos del alcohol sobre el sistema nervioso. (40)

Los estudios sobre la interacción de los otros componentes de las bebidas energizantes con alcohol aún son poco certeros y la información es escasa. Otras sustancias presentes en las bebidas energéticas, como lo son los carbohidratos y vitaminas del complejo B, cuando se administran juntos, pueden promover la

estimulación del metabolismo energético, contribuyendo así a la reducción de los efectos depresivos del alcohol. En consecuencia, no hay que descartar una posible contribución de los otros componentes de las bebidas energizantes en la disminución de la intensidad de la intoxicación alcohólica. (41)

A pesar de que diferentes estudios han demostrado que algunos componentes de las bebidas energizantes pueden presentar propiedades que antagonizan algunos de los efectos del alcohol, ocasionalmente el consumo combinado de estas bebidas no es suficiente para antagonizar la mayor parte de los efectos de este, en relación a las pruebas de coordinación motora y el tiempo de reacción, en los sujetos de estudio. Sin embargo, se ha observado una reducción en la sensación subjetiva de intoxicación. Nuestros resultados demuestran que en el tiempo cero (antes de iniciar el consumo), todos los animales manifiestan una actividad motora similar, demostrando que se encuentran fisiológicamente sanos y carecen de alguna afectación motriz congénita. Sin embargo, el consumo de vodka en combinación con BE se observa que los animales incrementan de forma significativa la actividad motora, con respecto al grupo únicamente que consumió vodka con alcohol, pero esta disminuye al compararlo con el grupo que consumió solo BE. Estos resultados son consistentes con otras investigaciones sobre la interacción cafeína-alcohol. (42)

Con la finalidad de correlacionar la afección del sistema nervioso central mostrada en los resultados, se presume exista una alteración marcada en los órganos participantes en procesos detoxificantes, como lo son riñón e hígado, para lo cual fue determinado el comportamiento sérico del perfil enzimático que comúnmente evalúa a este órgano (hígado). Así mismo, el hígado es un órgano grande y complejo que está diseñado para el manejo de hidratos de carbono, proteínas y metabolismo de las grasas. También es el sitio donde los productos de desecho del metabolismo son desintoxicados a través de procesos tales como la desaminación de aminoácidos, dando paso a la producción de urea. Es responsable de sintetizar y secretar la bilis, lipoproteínas y proteínas plasmáticas, incluyendo factores de

coagulación. (43) Las enfermedades hepáticas se reflejan a menudo por anormalidades bioquímicas, que se refieren a la actividad enzimática o a la producción proteica (Tabla 2). Aunque las pruebas que miden la actividad de enzimas hepáticas en suero se conocen comúnmente como pruebas de función hepática, por lo general reflejan la integridad de los hepatocitos o colestasis, en lugar de la función hepática. Por otro lado, en relación a la producción proteica los cambios en el nivel de albúmina en suero y el tiempo de protrombina están directamente asociadas con una disminución en la masa funcional hepática, aunque tampoco es específica para definir la gravedad de la enfermedad.

Tabla 2: Marcadores bioquímicos clave en el sistema y en el funcionamiento hepático			
Sistema o función	Biomarcador	Sitio o importancia	Función
Integridad de los hepatocitos	Aspartato aminotransferasa	Hígado, músculo esquelético, corazón, riñón, cerebro, eritrocitos	Catabolizan aminoácidos, lo que les permite entrar en el ciclo del ácido cítrico.
	Alanina aminotransferasa	Hígado	
Colestasis	Fosfatasa alcalina	Huesos, intestino, hígado, placenta	Enzima canicular que juega un papel en la producción de bilis
	γ -Glutamyl-transpeptidasa	Niveles correlacionados con fosfatasa alcalina indicar el origen hepatobiliar	Cataliza la transferencia de grupo γ - glutamil de péptidos a otros aminoácidos.
	Bilirrubina	La elevación puede indicar alteraciones hepáticas o extrahepáticas	Producto del catabolismo de la hemoglobina, captado por las células del hígado y conjugado con agua- producto soluble se excreta en la bilis.
Función hepática	Albúmina en suero	Dieta o hígado	El hígado sintetiza la albumina.
	Tiempo de Protrombina	Hígado sintetiza factores de coagulación	Las sales biliares son sintetizadas en el hígado y es necesario para la absorción de la vitamina K.

Tabla tomada de: *The key biochemical markers and liver function System*, Eduardo G. Giannini, Roberto Testa, Vincenzo Savarino. Liver enzyme alteration: a guide for clinicians. Canadian Medical Association or its licensors 2005

La lesión hepática, ya sea aguda o crónica, eventualmente resulta en un aumento de las concentraciones séricas de aminotransferasas. Ambas aminotransferasas AST y ALT están muy concentradas en el hígado. AST también

está presente en el corazón, músculo esquelético, riñones, el cerebro y hematíes; así mismo, ALT se presenta en bajas concentraciones en músculo esquelético y riñón. (44) Un aumento en los niveles séricos de ALT, por lo tanto, es más específico de daño hepático. En el hígado, ALT se localiza exclusivamente en el citoplasma celular, mientras que es a la vez AST citosólica (20% de la actividad total) y mitocondrial (80% de la actividad total). (45) La zona 3 del acino hepático tiene una mayor concentración de AST, y daños en esta zona, ya sean isquémicos o tóxicos, pueden dar lugar a una mayor alteración en los niveles de AST. El aclaramiento de las aminotransferasas se lleva a cabo dentro del hígado por las células sinusoidales. (45) La vida media en la circulación es aproximadamente 47 horas para ALT, cerca de 17 horas para AST total y, en promedio, 87 horas para AST mitocondrial. (46)

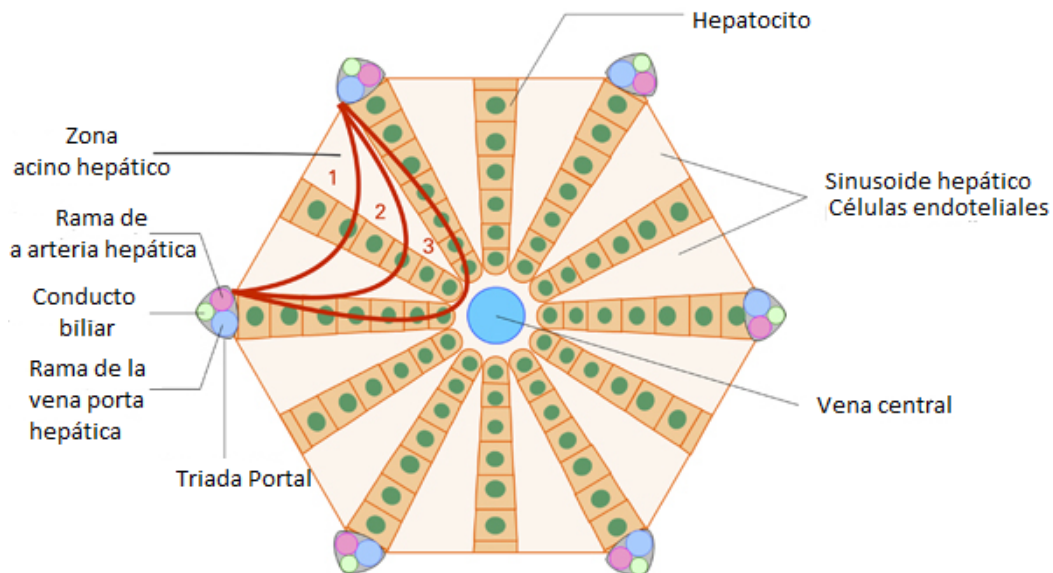


Figura 23. Tomada y modificada de: Sinusoidal obstruction syndrome/veno-occlusive disease: current situation and perspectives—a position statement from the European Society for Blood and Marrow Transplantation (EBMT) M Mohty, F Malard, M Abecassis, E Aerts, A S Alaskar, M Aljurf, M Arat, P Bader, F Baron, A Bazarbachi, D Blaise, F Ciceri, S Corbacioglu, J-H Dalle, R F Duarte, T Fukuda, A Huynh, T Masszi, M Michallet, A Nagler, M NiChonghaile, T Pagluica, C Peters, F B Petersen, P G Richardson, T Ruutu, B N Savani, E Wallhult, I Yakoub-Agha and E Carreras

La lesión mínima de los hepatocitos puede permitir la salida de las enzimas antes mencionadas, hacia la sangre; sin embargo, alteraciones en la permeabilidad de la membrana celular, hasta lesiones celulares o tisulares, afectará la presencia enzimática en plasma de manera progresiva. En este sentido, primero encontraremos incremento en la actividad de enzimas citoplasmáticas, posteriormente de las que se encuentran en organelos y por último las que se hallan en núcleo. (47) De tal forma que lesiones en membrana incrementan niveles de ALP, γ -GT, mientras que lesiones que provocan liberación o secreción de citoplasmas incrementan a AST, ALT, LDH y pseudocolinesterasa (CHE), en cantidades significativas, lo que se puede interpretar como una alteración tisular como lo plantean Schmidt E. y Schmidt F. en 1974.

La magnitud de la alteración de las aminotransferasas puede ser clasificado como "leve" (<5 veces el límite superior de referencia), "moderado" (5-10 veces el límite superior de referencia) o "marcado" (> 10 veces el límite superior de referencia). Esta clasificación es un tanto arbitraria, ya que no existe una definición uniforme, aunque empiezan a ser consideradas de esta manera en las guías de diagnóstico clínico.(48-50)

El consumo de bebidas alcohólicas es una de las causas cada vez más comunes de aberraciones metabólicas y esteatosis hepática. Aunque es bien sabido que no todos los consumidores de alcohol llegan a desarrollar la enfermedad hepática avanzada, los factores que determinan una evolución benigna o enfermedad hepática progresiva han sido poco esclarecidos. (51) Los datos actuales indican que el efecto del consumo de bebidas alcohólicas aumenta de manera importante la actividad de enzimas en suero, reflejando el estatus hepatocelular. A pesar que los efectos hepáticos de etanol se han abordado en varios estudios, (52) (53) (54) (55) las interacciones de fase temprana entre el consumo de etanol y las variables bioquímicas que reflejan el estado hepático han recibido menos atención. Se ha informado el consumo de alcohol puede aumentar la actividad en suero de AST y

ALT. (56) Del mismo modo, Ruhl y Everhart, demostraron que el riesgo de la actividad de aminotransferasas incrementa de manera anormal en relación dependiente con la cantidad de alcohol consumida. (57)

Otro biomarcador importante es la relación De Ritis quien sugiere que la valoración del índice AST/ALT puede distinguir del tipo de lesión hepática y su relación se halla dado por la etiología de esta. (58) (59) El valor normal de la relación entre las transaminasas para humanos es de 0.70 – 0.88; los valores por debajo de 0.7 son indicativos de inflamación (por ej., hepatitis viral, hepatitis tóxica, ictericia obstructiva reciente, etc.); mientras que, los cocientes superiores a 1 sugieren necrosis, debido a que la AST se libera de las mitocondrias (por ej., cirrosis hepática descompensada, carcinoma hepático primario, hígado con metástasis hepática, etc.). (47) Sin embargo, en rata este indicador no se interpreta del mismo modo ya que la actividad de AST es mayor a la ALT en suero, por lo que índice AST/ALT en condiciones clínicamente sanas está entre valores de 2 – 3; sin embargo, se puede observar una reducción importante en los animales que expuestos crónicamente a la bebida alcohólica (<1), incluso la liberación de ALT es 16 veces mayor al control; mientras que AST incrementó aproximadamente 5 veces. El comportamiento en rata Wistar sugiere fuertemente que existe un grado importante de lesión hepática, sin embargo, esta no llega a ser necrosante. Estos datos fueron corroborados con la determinación de la actividad de ALP y γ GT, las cuales no mostraron diferencias de actividad en relación al control. Se sabe que este par de enzimas son liberadas al suero durante procesos en los que se lleva a cabo colestasis y existe degeneración de la membrana de las células de los canalículos biliares y hepatocitos. (56)

Por otro lado, LDH y otras enzimas citosólicas pueden ser liberadas desde el hígado como consecuencia del daño a los hepatocitos o lesión hepática crónica o disfunción (por ejemplo, cirrosis, necrosis hepatocelular, o inflamación). (60) LDH es una enzima que se halla involucrada en la lipogénesis hepática ya que provee sustrato al reducir lactato a piruvato, este es importado a la mitocondria y se metaboliza para

generar acetil-CoA. La Acetil-CoA se combina con oxaloacetato por la enzima citrato sintasa para formar citrato. El citrato se exporta en el citoplasma y sirve como sustrato para la enzima Acetil-CoA carboxilasa que induce la *novo* síntesis de ácidos grasos que se biotransforman en triacilgliceroles que incrementa su movilidad en suero en lipoproteínas de muy baja densidad. (61) (62) (63) Los resultados mostraron una elevación del doble de actividad de LDH en suero, en el grupo expuesto al consumo crónico de vodka, además de un incremento del 50% de triglicéridos circulantes.

Un indicador adecuado para resaltar características hepáticas isquémicas es el ratio ALT/LDH, ya que en lesiones gravosas se ve reducido de manera importante a tal grado que LDH se ha considerado también como un marcador de muerte celular cuando se incrementa. (64) Las células necróticas tienen liberación de su contenido intracelular al medio extracelular (suero o plasma). En este sentido la producción intracelular de LDH es mayor a la de ALT, por lo tanto, la muerte celular necrótica presenta mayor liberación de LDH sobre ALT, y una reducción de su ratio. (65) (66) (67) (68)

El ratio ALT/LDH mostró una elevación de aproximadamente 5 veces en el grupo que consumió alcohol, por lo que los datos sugieren que el efecto de la elevación de las transaminasas no es derivado de daño necrótico hepático, o este no es relevante en relación al comportamiento enzimático.

Finalmente, la cuantificación de la actividad de la pseudocolinesterasa hepática o butilcolinesterasa tiene la capacidad de hidrolizar rápidamente butirilcolina en relación a otros ésteres. La butilcolinesterasa se sintetiza principalmente en el hígado y se encuentra en una forma hidrófoba, en membranas de hepatocitos. En caso de insuficiencia hepática, la síntesis pseudocolinesterasa también se ve afectada. Disminución de la actividad de la enzima en suero se ha demostrado en muchas enfermedades hepáticas, como cirrosis, enfermedad hepática en fase terminal, hepatitis y abscesos hepáticos. En pacientes con enfermedad hepática en

fase terminal, los niveles normales de butilcolinesterasa suero fueron recuperados posterior al trasplante hepático, por lo que se asume que el hígado juega un papel relevante en la producción de la enzima. (69) Así mismo, en enfermedades inflamatorias agudas, tanto butilcolinesterasa y albúmina parecen estar inversamente relacionada con respuesta de fase aguda, debido a la acción de citocinas proinflamatorias. (70) En el consumo de alcohol, butilcolinesterasa ha mostrado decrementos séricos en relación a la cantidad y el tiempo de consumo. (71) (72) Nuestros datos concuerdan con el efecto del consumo de bebidas alcohólicas de forma crónica ya que muestra reducción importante en suero de su actividad.

Por otro lado, el consumo de bebidas energizantes crónicamente por los sujetos de estudio mostró de manera similar un incremento de la actividad de transaminasas en suero en niveles ligeramente inferiores a lo mostrado por el grupo con consumo de alcohol. Estas bebidas contienen gran cantidad de cafeína, taurina y guaraná con hidratos de carbono, ginseng, vitaminas del complejo B. (73) (74) (75) La cafeína puede inducir rutas metabólicas asociadas al complejo xantina oxidasa/reductasa debido a que en realidad se trata de una metilxantina, por lo que la producción de ácido úrico se puede ver aumentada en el consumo crónico de bebidas energizantes los cuales se han asociado con grados diferenciales de necrosis hepática. (76) Nuestros resultados mostraron incremento de la actividad enzimática de ALT y AST en suero sugiriendo ligera lesión hepática. Adicionalmente se han propuesto mecanismos que involucran a taurina en relación al daño celular. La taurina o ácido 2-aminoetanosulfónico es un ácido amino más abundantes en tejidos de mamíferos. Se cree que sus funciones bioquímicas y fisiológicas incluyen la anti-oxidación, desintoxicación, la osmoregulación, estabilización de la membrana y la neuromodulación. (77) Sin embargo, cuando existe un sobre consumo de taurina el funcionamiento celular hepático se puede comprometer y se ha descrito inducción de hipertrofia celular que se asocia fuertemente al incremento de dichas enzimas en suero, (78) (79) (80) (81) el cual también se ha asociado al desarrollo de fibrosis

hepática. La relación AST/ALT por su parte mostró un comportamiento similar entre el grupo que consumió vodka así como el que consumió la bebida energizantes, lo cual sugiere que el consumo crónico de bebidas energizantes puede mediar daño hepático.

Por otro lado, mientras la actividad de ALP no observó cambios en su actividad, la γ GT disminuyó en suero, hecho que confirma que el consumo de taurina se halla envuelto en la misma ruta de síntesis de dicha enzima, ya que taurina procede del metabolismo de aminoácidos sulfurados, principalmente a través de la vía de transulfuración, lo que resulta en la transferencia de azufre de la metionina a serina para formar cisteína. La cisteína se metaboliza de manera irreversible para producir ya sea taurina, sulfato inorgánico, o glutatión (GSH). Por lo tanto, la utilización de cisteína para la generación de GSH y para la generación de la taurina son competitivos. Lo cual puede ser regulado por la necesidad de GSH en los sistemas biológicos en dependencia de la necesidad celular. (82)

Adicionalmente, es importante remarcar que las principales sales biliares en los mamíferos, es decir las formas ionizadas de ácidos biliares, se sintetizan a partir del colesterol en el hígado y luego conjugarse (N-acil amidados) con glicina o taurina. La composición de sales biliares biliares en el ser humano difiere significativamente de la de la rata. En los seres humanos, la mayoría de las sales biliares se conjugan con glicina, mientras que, en las ratas, la mayoría de las sales biliares se conjugan con taurina. La bilis humana, pero no la bilis de rata, contiene amidación sulfatada y no sulfatada de litocolato, por esta razón es importante resaltar que un sobre consumo de taurina en las bebidas energizantes puede promover una mayor formación de sales biliares que alteren el funcionamiento celular. (83)

Como ya se ha establecido anteriormente la actividad de LDH puede ser correlacionada con una liberación tipo isquémica por la sobre síntesis y liberación de sales biliares hacia los sinusoides hepáticos, lo que puede coadyuvar al daño celular y liberación de enzimas como LDH, dicho efecto se observó en las ratas

administradas crónicamente con bebida energizante, aunque es de resaltar que correlacionan negativamente con los dos primordiales marcadores para colestasis como lo son ALP y γ GT. Corroborando este hecho la relación entre ALT y LDH fue muy parecida a lo observado en el grupo administrado con vodka, lo que sugiere fuertemente mecanismos interrelacionados en el comportamiento enzimático. De manera consistente, el incremento de triglicéridos fue observado, hecho imputado con el desvío o saturación de rutas de obtención energética, íntimamente relacionado con la sobre actividad de LDH. (61) (62) Complementando el panel diagnóstico la butilcolinesterasa no mostró cambios en relación a su actividad en suero en el grupo de consumo de bebida energizante.

Una vez comprendido el comportamiento sérico de las enzimas relacionadas con el daño celular de las bebidas por separado, se analizó el panel de pruebas funcionamiento enzimático hepático en el grupo de la combinación de estas. En este sentido cabría esperar un efecto aditivo de los resultados debido a las marcadas modificaciones enzimáticas observadas. Sin embargo, este grupo fue el que menos actividad de ALT y AST observó, este hecho podría ser mal interpretado en relación al daño celular, es decir, si es observada la relación entre estas dos enzimas, el ratio AST es el más bajo en todo el estudio. De lo anterior es posible establecer que en combinación vodka y BE no promueven la liberación de la fracción mitocondrial de la AST por lo que el proceso parece estar en mayor relación con procesos de estirpe apoptótico-fibrótico, más que procesos necróticos. (84) (85) Por su parte, la enzima LDH la cual mostró la máxima actividad sérica de todos los grupos indica fuertemente que la combinación de las bebidas puede influir fuertemente en su liberación, y que posiblemente su actividad sea primordialmente asociada a alteraciones metabólicas severas, y estas a su vez otorguen las condiciones hepáticas o posiblemente en otros tejidos, los cuales incrementan la enzima en suero y por tanto incrementen su actividad (2.5 veces). Los patrones de isoenzimas de LDH son característicos de muchos tejidos, tales como: LDH1, LDH2 que se encuentran en los eritrocitos, el corazón y del riñón; LDH4, LDH5 encuentra en el

hígado, y LDH3 en el tejido linfático y las plaquetas. Los cambios en el patrón de LDH en suero se han empleado para la detección de cambios fisiológicos de dichos tejidos en seres humanos, por lo que, en este sentido es probable que también suceda en la rata Wistar. (86) (87) (88)

Para descartar el efecto combinado entre tejidos en relación a lo que sucede en hígado, también se realizó en índice ALT/LDH el cual resultó incrementado 3 veces en relación a los animales no expuestos a las bebidas, lo cual es característico del daño hepático no fulminante, es decir, en condiciones inflamatorias de baja intensidad. Sin embargo, este no mostró el incremento observado en los grupos de las bebidas por separado. En el contexto de estos resultados, la hipótesis de que la relación ALT/LDH podría ser un marcador que indique el grado de hipoxia hepática causada por macrófagos, que igualmente podría ser útil para discriminar alteraciones inflamatorias crónicas. (89) (90) (91) El consumo de crónico de vodka y bebidas energizantes parece ser que entra dentro de las alteraciones inflamatorias en diferentes tejidos. (92) (93) (94) (95)

Así mismo, fue investigada la actividad de ALP, la cual no presentó diferencias en relación al control intacto. Mientras que γ GT del grupo de bebidas combinadas mostró la máxima actividad en suero, dicho incremento está en concordancia con estudios que muestran un exceso de estrés oxidativo en diversos tejidos, siendo el hígado un blanco característico de estos procesos. (96) El estrés oxidativo crónico asociado a un doble inductor como lo son alcohol y la bebida energizante, incrementa también la defensa celular, la cual a su vez responde agilizando la síntesis de γ GT y el tráfico intravesicular que son característicos del estrés en el retículo endotelial, por lo que en estados de estrés celular prolongado pueden ser excretadas grandes concentraciones de las enzimas limitantes de la síntesis de glutatión como lo es la enzima γ GT. (97) (98) Finalmente, la actividad de CHE fue la que más se incrementó en cuanto al consumo de bebidas en combinación, aproximadamente al doble. El incremento en de la actividad sérica de CHE ha

mostrado en diversos estudios una fuerte correlación positiva con niveles incrementados de triglicéridos, de colesterol total y una correlación negativa con la lipoproteína de alta densidad (HDL). (99) (100) Niveles más altos de actividad de la enzima se encuentran en el suero de pacientes con hiperlipidemias, diabetes y obesidad en comparación con individuos clínicamente sanos. (101) Además, la inducción de diabetes u obesidad en modelos animales se asocia con un aumento paralelo de tanto de triglicéridos como de la actividad de CHE en suero, patrón que se ha demostrado en ratas y cobayos, además de en seres humanos. (102) A pesar de ello, los niveles de triglicéridos en suero no mostraron incrementos respecto del grupo control, sin embargo, en estudios paralelos en nuestro grupo de estudio se ha evidenciado que esta combinación de bebidas administradas crónicamente disminuye los niveles de HDL, por lo que el consumo combinado de las bebidas puede compaginar rutas metabólicas que propicien la hepatoesteatosis. (99)

Con la finalidad de poder discriminar apropiadamente el proceso lesivo hepático, y conocer si las enzimas detectadas pudieran ser en su mayoría de dicho tejido, se analizó la actividad enzimática directamente en el tejido. Es bien conocido que el etanol, debido a su tamaño pequeño y su grupo hidroxilo es soluble tanto en entornos acuosos como de lípidos, es decir, puede pasar libremente a las células. Dado que la circulación portal desde el intestino pasa primero a través del hígado, la mayor parte del alcohol ingerido se metaboliza en este tejido. (103)

El etanol no puede ser excretado en su forma de alcohol y debe ser catabolizado. Su metabolismo se produce por dos vías principales. La primera vía se compone de dos pasos. La primera etapa, catalizada por la enzima alcohol deshidrogenasa (ADH), la cual tiene lugar en el citoplasma, y lleva a cabo el proceso de oxidación del etanol implicando al menos tres vías enzimáticas distintas. La vía más importante, responsable de la mayor parte del metabolismo del etanol, es iniciada por la alcohol deshidrogenasa (ADH). La ADH es una enzima citosólica requirente de NAD⁺ que se expresa en altas concentraciones en los hepatocitos y generando

acetaldehído y NADH como productos de la reacción. El acetaldehído luego entra en la mitocondria donde se oxida a acetato por acción de la aldehído deshidrogenasa mitocondrial (ALDH). Existe una ALDH citosólica, pero es responsable de sólo una cantidad menor de la oxidación de acetaldehído (Fig 24). (104) (105) (106)

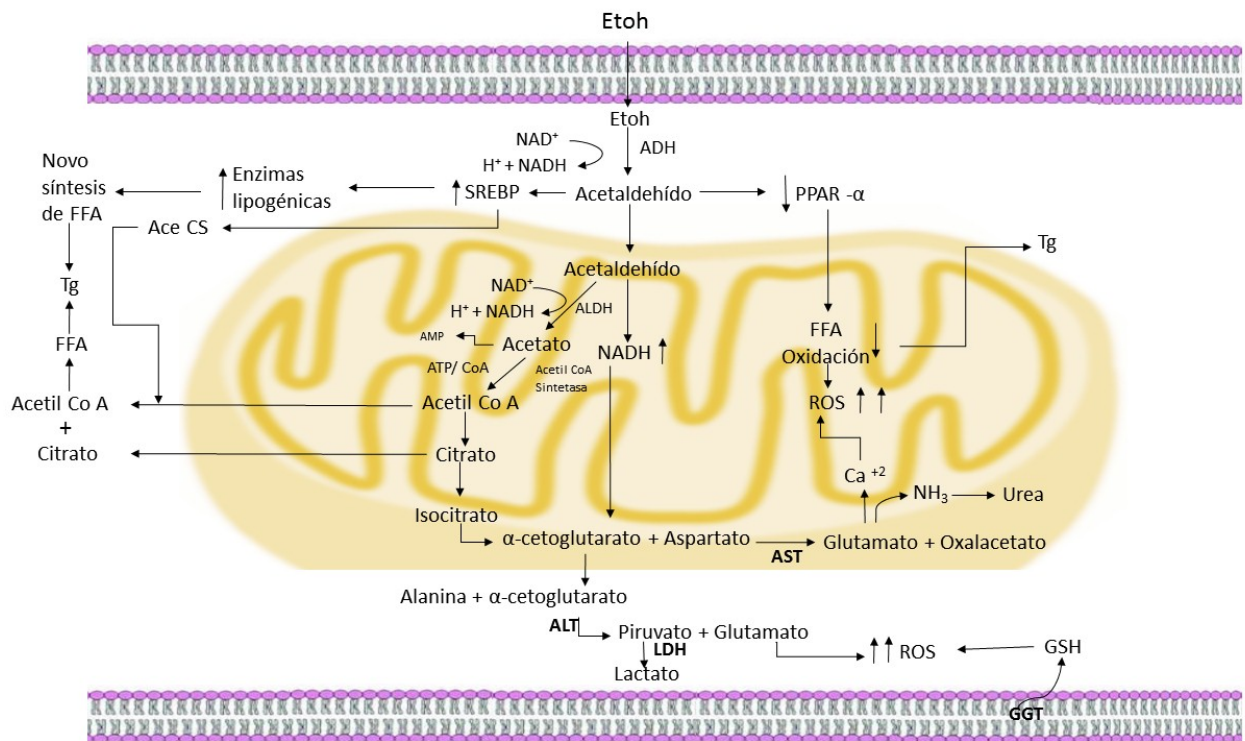


Figura 24. Metabolismo del etanol dentro del hepatocito. La vía principal del metabolismo hepático del etanol se lleva a través de la deshidrogenasa alcohólica. El etanol pierde su hidrógeno, genera equivalentes reducidos (NADH) y es oxidado a acetaldehído. Cada uno de estos productos es directamente responsable de una variedad de alteraciones que incluyen disfunciones del metabolismo enzimático y lipídico.

Se debe tener en cuenta que el consumo de etanol conduce a una acumulación de NADH. La alta concentración de NADH inhibe vías metabólicas como la gluconeogénesis, mediante la prevención de la oxidación del lactato a piruvato. De hecho, la alta concentración de NADH ocasiona que la reacción de piruvato a lactato sea predominante, y por lo tanto este puede ser acumulado por los hepatocitos,

teniendo como consecuencia: hipoglucemia y acidosis láctica. (107) (108) (109) (110) (111)

El exceso de NADH también inhibe la oxidación de ácidos grasos, ya que el propósito metabólico de la oxidación de ácidos grasos es la generación de NADH para la generación de ATP mediante la fosforilación oxidativa. De hecho, el exceso de NADH propicia las condiciones adecuadas para la síntesis de ácidos grasos. Por lo tanto, los triglicéridos se acumulan en el hígado, dando lugar a una condición conocida como "hígado graso". (112) (113) Las mitocondrias hepáticas pueden convertir acetato en acetil CoA en una reacción que requiere ATP y Coenzima A, esta reacción está mediada por la enzima acetil CoA sintetasa. Posteriormente, la completa conversión en el ciclo de Krebs de la acetil CoA se encuentra bloqueada, debido a que el NADH inhibe dos importantes enzimas reguladoras como lo son la isocitrato deshidrogenasa y α -cetoglutarato deshidrogenasa. (114)

El incremento de α -cetoglutarato en la mitocondria con inhibición de la enzima que lo biotransforma a succinil-CoA, conlleva a la activación de enzimas que pueden utilizarlo como sustrato, como lo es la AST, esta enzima cataliza la transferencia de grupos α -amino del aspartato al grupo α -ceto del α -cetoglutarato para generar oxalacetato y glutamato (Fig. 24). (46) (115) En estudios en los cuales se ha administrado crónicamente alcohol y acetaldehído por separado en rata Wistar, se ha observado incremento de la actividad de AST mitocondrial con incremento importante en la concentración de glutamato. (116) Debido a que la AST posee una alta afinidad a los sustratos intermediarios como el α -cetoglutarato por su ubicación membranal en la capa interna mitocondrial puede generar altas concentraciones de glutamato, el cual puede ingresar a rutas detoxificantes secundarias para la producción de amonio y finalmente urea. Sin embargo, en altas concentraciones el glutamato producido puede ser tóxico para el hepatocito. (117) Por otro lado, se ha determinado la acumulación de glutamato en hepatocitos pericentrales, debido a su carácter impermeable de la membrana de dichas células. (118) (119)

Mientras ALT se encuentra abundantemente en el citosol del hepatocito su actividad es de aproximadamente 3.000 veces mayor que la de la actividad sérica. Así mismo, la AST en los hepatocitos se encuentra asociada a una mayor actividad mitocondrial para la obtención de intermediarios gluconeogénicos en procesos de alto requerimiento energético celular, y su liberación está ampliamente asociada a la lesión hepática, como se ha discutido anteriormente: (120) En las primeras 24 a 48 horas, la actividad de ALT será más alta que AST. Así mismo, en procesos de lesión hepatocelular crónica, ALT está elevada con más frecuencia que AST; aunque a medida que los estímulos que conllevan a fibrosis progresiva, las actividades de ALT típicamente declinan, y la relación de AST/ALT aumenta gradualmente, de modo que en ese momento la evolución hacia cirrosis se hace presente, en donde la actividad de AST es a menudo mayor que la de ALT. (121)

La enzimología de los grupos en el presente estudio mostró un incremento en la actividad de ambas enzimas en el tejido hepático de las ratas expuestas, sin embargo, se pudo observar un incremento en la actividad de ALT sobre la actividad de AST en los grupos de consumo de vodka y de la bebida energizante por separado. El consumo alcohólico conlleva a la elevación de la actividad de ALT en respuesta a la coexistencia de deficiencia de piridoxal-6-fosfato en los alcohólicos, que es un cofactor para la actividad enzimática de la ALT.

LDH normalmente funciona como una reductasa para la producción de lactato a partir del piruvato o como un precursor de gluconeogénesis, oxidando NAD^+ . En circunstancias en donde se eleva el lactato en presencia de exceso de NAD^+ , como se encontraría en un consumo de bebidas alcohólicas basado en la reacción primaria de deshidrogenada alcohólica (ADH), la reacción reversible oxida al lactato en piruvato con la reducción concomitante de NAD^+ a $\text{NADH} + \text{H}^+$ (Figura 25). Por lo tanto, es razonable sugerir tanto la concentración como la actividad de LDH se va a incrementar durante el consumo de alcohol ya que provee de intermediarios energéticos que conllevarán a la estimulación de las rutas lipogénicas como forma

compensadora del incremento de acetil-CoA, así como, las subsecuentes reacciones encausadas a la producción de triglicéridos hepáticos. (122)

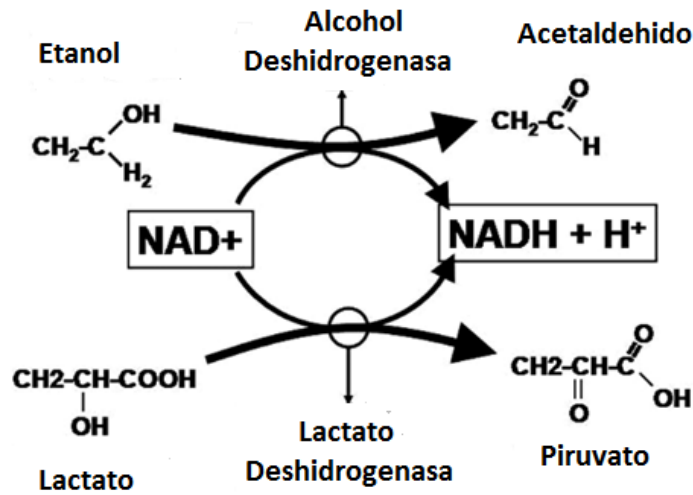


Figura25. Tomada y modificada de: Oxidación de lactato y etanol a piruvato y acetaldehído, catalizado por LDH y ADH. Robert H. Power and Dorothy E. Dean. Evaluation of Potential Lactate/Lactate Dehydrogenase Interference with an Enzymatic Alcohol Analysis. Journal of Analytical Toxicology, Vol. 33: 561-563, October 2009

Por otro lado, la γ GT la cual es un glicoenzima que se encuentra en las membranas de células endoteliales de los diversos órganos, y mayoritariamente en las células canaliculares hepáticas. Esta enzima media el transporte de péptidos a las diferentes células, en las que se involucra la síntesis y metabolismo del glutatión. La elevación de γ GT en suero, sigue siendo el marcador más ampliamente utilizado de abuso de alcohol, en el presente trabajo no se observó el incremento mencionado, sin embargo, el tejido hepático incrementó al doble su actividad, lo cual sugiere fuertemente que el consumo de alcohol se halla involucrado en alteraciones oxidativas que llevan a estrés a los hepatocitos, y por esta razón el sistema de protección celular se halla incrementado. Así mismo, se ha descrito que los niveles de la enzima se elevan después de la ingesta abundante de alcohol que se ha llevado de manera continua durante varias semanas. (123) (124) Por el contrario, en abstinencia de 2-6 semanas, los niveles séricos de la enzima disminuyen generalmente dentro del rango normal de referencia. Cabe mencionar que la vida media de la γ GT es 14 - 26 días, en tejido y circulación. (125) (126)

La γ GT puede elevarse debido al aumento de su síntesis por demandas celulares, y su liberación acelerada es debido a las células hepáticas dañadas o muertas. Su liberación continua parece estar ligada a episodios de bebedores crónicos de alto consumo, aunque algunos bebedores moderados también producen niveles elevados de la enzima. (127) (128) No hay que perder de vista que el exceso de alcohol no es la única causa de los niveles de γ GT elevados; también pueden aumentar como resultado de la mayoría de los trastornos hepatobiliares, obesidad, diabetes, hipertensión e hipertrigliceridemia. (129) (130) También hay que considerar el gran número de falsos negativos para la γ GT. Por ejemplo, Brenner et al. (1997) observaron que en grupos de bebedores de consumo moderado sólo el 22.5% muestran valores elevados de la enzima, e incluso entre bebedores de consumo > 100 g / día, sólo el 36.5% presenta altos niveles de γ GT. (131)

Así mismo, la síntesis de ALP se lleva a cabo en hígado, y en otros órganos, sin embargo, en el adulto el tejido hepático es el mayor productor, sobre todo en las células de los conductos del colédoco (en la superficie del epitelio ductal), por ello el aumento de la actividad enzimática en suero se puede observar, durante procesos de colestasis con una mayor concentración de ácidos biliares causada por la obstrucción intra o extrahepática del árbol biliar. (132) La vida media de la enzima en circulación se encuentra alrededor de una semana, lo cual explica el porqué del lento descenso de la actividad enzimática una vez que se resuelve el proceso obstructivo. (46) La actividad de la ALP sérica proporciona un indicador sensible de lesiones obstructivas, que alteran el espacio hepático; estas últimas incluyen lesión neoplásica (primaria o metastásica), así como enfermedades infiltrativas dentro de las que se halla de manera representativa la hepatitis granulomatosa. (133) Ligeros incrementos fueron observados en el grupo asociado al consumo de alcohol, lo cual sugiere daños mínimos relacionados con el tejido. Estos resultados se hallan en concordancia con otros reportes realizados en rata Wistar. (134)

Aunque el grado de alteración de ALP es variable y puede ser acompañado por hiperbilirrubinemia. Diversos grados de ALP se han podido observar en los pacientes con enfermedades inflamatorias como en la colitis ulcerosa, lo cual sugiere la presencia de la colangitis esclerosante primaria; alrededor del 70% de estos casos están asociados con la enfermedad inflamatoria intestinal. (135) La misma anomalía bioquímica ha sido observada en mujeres de mediana edad con una historia de prurito y la enfermedad autoinmune lo que plantea que el proceso inflamatorio es un factor que influye en la dinámica hepática y puede alterar la enzimología de estos procesos. (136) En los pacientes con colangitis esclerosante primaria o con cirrosis biliar primaria, los niveles de bilirrubina en suero tienen un significado pronóstico, y la ecografía del hígado pueden revelar ecotextura alterada, sugestivo de enfermedad difusa o incluso cirrosis hepática. Los niveles de ALP anormales también pueden ser un signo de cáncer metastásico del hígado, linfoma o enfermedades infiltrativas como la sarcoidosis.(137-139) En algunos de estos casos los niveles de fosfatasa alcalina pueden ser marcadamente elevado y el único signo de afectación hepática. En estos casos, el examen de ultrasonido de hígado es muy importante cuando la historia del paciente no es sugestiva de la enfermedad, aunque algunos pacientes pueden requerir una biopsia de hígado con el fin de obtener un diagnóstico definitivo. (49) (50) La clínica debería ayudar a establecer un diagnóstico en la mayoría de los pacientes con niveles elevados de fosfatasa alcalina. El grado de elevación parece no tener importancia diagnóstica específica. Sin embargo, el diagnóstico no siempre es evidente incluso después de una evaluación exhaustiva en pacientes asintomáticos con leves aumentos en los niveles de fosfatasa alcalina. Como se mencionó anteriormente, la biopsia hepática puede proporcionar una mejor fundamentación para algunos diagnósticos inusuales e insospechados.

Aunque niveles de CHE no fueron diferentes entre el grupo control y el expuesto al consumo de alcohol, ya se ha demostrado en otros trabajos que la administración crónica de etanol a ratas produce un aumento dependiente de la concentración en

la actividad CHE suero y el aumento persiste después de 24 h de la abstinencia de etanol. (140) CHE se distribuye ampliamente en todo el cuerpo, incluyendo el plasma, hígado, riñón y tracto gastrointestinal. No hay ninguna función fisiológica específica conocida para esta enzima, pero puede ser importante para la hidrólisis de ésteres ingeridos. (141) Los resultados del presente estudio indican claramente que puede haber una relación entre la actividad CHE suero y desarrollo de dependencia física al etanol, debido a que los niveles séricos tampoco demuestran incremento.

Por su parte, el consumo de BE mostró características similares a lo observado por el grupo alcohol solo (Fig. 26). En este sentido, las actividades enzimáticas hepáticas de ALT, AST, γ GT y CHE fueron similares entre estos grupos, de la misma manera que correspondieron en suero. Aunque existen pocos estudios que relacionan el consumo de la bebida energizante con el daño hepático, algunos han observado que ante el consumo de la BE se inhiben rutas glucogénicas hepáticas, lo cual incrementa la glucosa de ayuno en rata Wistar, lo cual es considerado un daño hepático.(142-144) En concordancia con otros estudios, el incremento enzimático en hígado se ha demostrado por el grupo de Khayyat et al., 2012, el cual estudió tres tipos de bebidas energizantes, incluida el consumo de RedBull por 4 semanas recibiendo 1.5 mL diarios, el resultado fue un incremento de la actividad enzimática de transaminasas hepáticas, así como alteraciones tisulares hepáticas. (145) Akande and Bankojo (2011) por su parte, administraron a ratas de la cepa Sprague-Dawley de manera aguda Power Horse una bebida energizante similar al RedBull, tras la administración hallaron niveles incrementados de AST, ALT y ALP. (146)

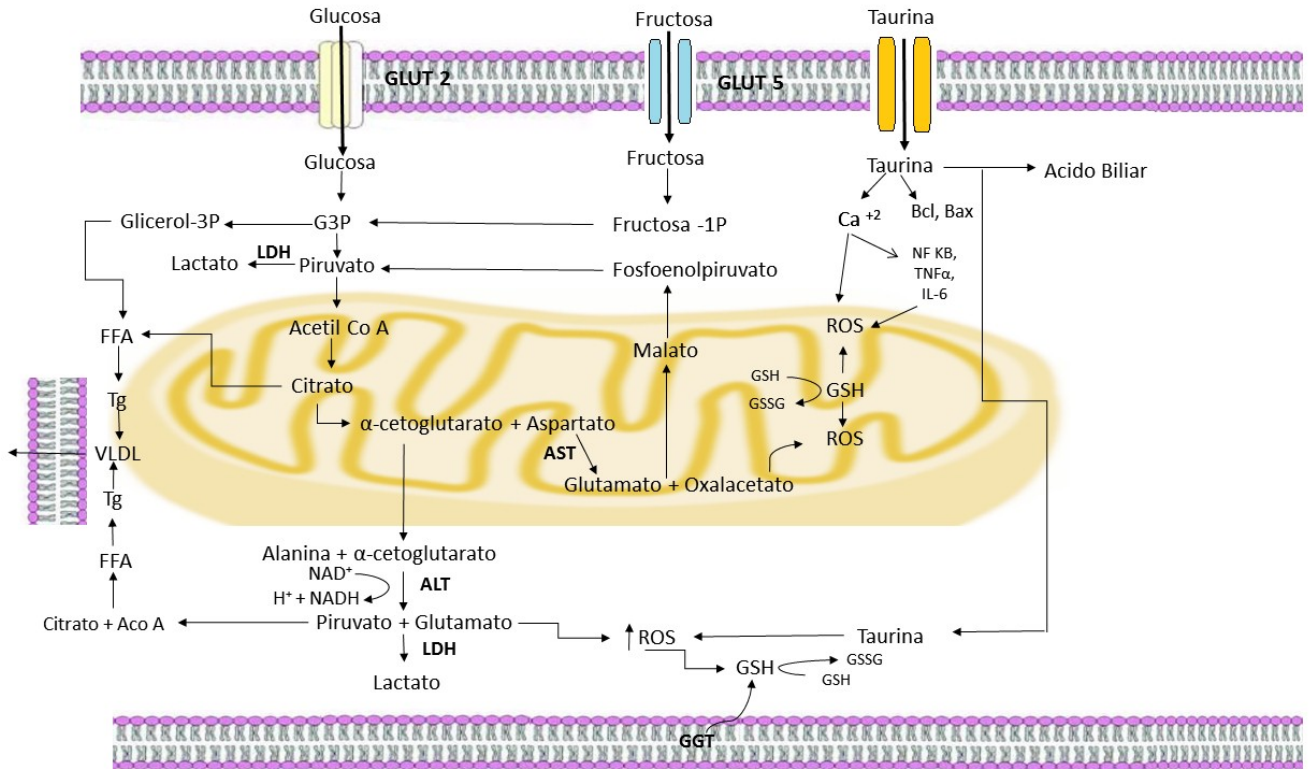


Figura 25. Metabolismo de las bebidas energizantes dentro del hepatocito. Metabolismo hepático de glucosa, fructosa y taurina, componentes principales de las bebidas energizantes

La combinación de las bebidas comúnmente conocidos como “shots” ha ganado popularidad entre la población de jóvenes y adultos-jóvenes, incrementando su consumo en algunos países entre un 20 y un 40% en antros y fiestas. (75) Aunque los informes sugieren que el consumo de bebidas energéticas con alcohol reduce la conciencia de la intoxicación por etanol, aumento en el consumo de alcohol es inminente, a pesar de ello no hay evidencia científica confiable para apoyar estos puntos de vista. (147) Los informes sobre la seguridad del uso de energizantes han sido inconsistentes. Por ejemplo, mientras Sionaldo et al., informaron que no hubo diferencia en los parámetros fisiológicos y bioquímicos entre voluntarios que consumen bebidas energéticas solas o en combinación con el alcohol, Ebuehi y sus colegas demostraron que las ratas administradas con bebidas energéticas

tenían elevación en proteínas totales, triglicéridos, HDL, colesterol LDL y glucosa, pero las actividades enzimáticas de ALT, AST y concentraciones de creatinina, ácido úrico y la albúmina, se presentaron sin anormalidades. (93) (148) Modificaciones histopatológicas en el corazón e hígado se han informado ante la exposición a largo plazo a los diferentes componentes de las bebidas energéticas, las cuales pueden resultar en alteraciones significativas en los sistemas hepáticos y cardiovasculares. (149) Si bien las investigaciones están en progreso para ser concluyentes sobre la seguridad o no del consumo de bebidas energéticas, la Sociedad Internacional de Nutrición Deportiva y el Comité sobre Nutrición y el Consejo de Medicina del Deporte y la aptitud, expresaron recientemente su preocupación sobre la seguridad y eficacia del uso de las bebidas energéticas. (150)

En el presente estudio la actividad enzimática en el tejido hepático fue la de mayor agresión, debido a que tanto ALT, pero sobre todo AST incrementó su actividad hepática lo cual es traducido como una sobre exigencia al órgano y particularmente a mitocondrias, aunque en suero no se reflejó en las mismas condiciones, sin embargo, esta conducta es ampliamente vinculada al desarrollo de fibrosis y cirrosis hepática. (151-153) Lerut en 2011, reportó que en pacientes consumidores de bebidas energizantes y vodka se presentaba daño perivenular con necrosis hepatocelular, con una marcada inflamación en las zonas centrolobulillar y portal, y signos menores de endotelitis y colangitis, las cuales se asociaron a niveles elevados de AST y ALT, además de ligera elevación de γ GT, aunque la LDH no fue monitoreada, la ALP mostró ligeros cambios por encima de los límites biológicos de referencia. (154) En nuestro estudio, la actividad hepática de LDH y γ GT también fueron superiores respecto al consumo individualizado de las bebidas, estas dos enzimas sugieren fuertemente que el tejido hepático se halla sobre expuesto a moléculas energizantes o a aspectos hipóxicos tisulares, ya que la LDH por su parte se encarga como ya se ha mencionado de la reacción reversible de la transformación de piruvato a lactato y viceversa, siendo mucho más favorecida la primera. Así mismo, la LDH es una enzima esencial para la respiración anaeróbica,

y el incremento en su producción se ha demostrado en condiciones de hipoxia en varias líneas celulares, (155) (156) aunque la hipoxia de los hepatocitos en la cirrosis ha sido bien establecido en modelos experimentales, ha sido difícil demostrar esta misma condición en los hepatocitos de pacientes cirróticos por consumo de bebidas alcohólicas, y es menor dicha información en relación a bebidas energizantes o su combinación con vodka, sin embargo LDH sugiere fuertemente condiciones de hipoxia hepática en nuestro modelo. (157) (158) Cuando el suministro de oxígeno a las células llega a ser insuficiente, la función de la cadena respiratoria mitocondrial se altera inmediatamente porque no hay aceptor final de electrones. El estado redox de las mitocondrias se reduce, con una relación de disminución de la forma / forma reducida oxidada de dinucleótido de nicotinamida y adenina (NAD^+ / NADH). La depleción de ATP con lleva a acidosis celular que surge después del agotamiento de ATP, por lo que la activación de LDH es determinante para la protección en contra la muerte celular, ya que desvía las rutas de acidificación y por lo tanto de muerte celular. (159)

Por otro lado, γ GT es una proteína de síntesis hepática que se encarga de la reacción de transpeptidación de polipéptidos que contienen un grupo γ -glutamil, en el feto humano la actividad γ GT en el hígado es aproximadamente 10 veces mayor que la observada en el adulto, mientras que en la rata los niveles hepáticos fetales de la actividad γ GT son 30 veces más altas que las observadas en el adulto; haciendo una comparación entre especies en la rata adulto la actividad hepática de γ GT constituye sólo 10% de la observada en los seres humanos, por lo que es más susceptible a cambios o agresiones hepáticas. (160) (161) Existen un gran número de literaturas que hablan sobre la correlación entre la actividad γ GT en suero y la lesión hepática, y algunos han sugerido que su liberación a plasma es el resultado de un incremento de su síntesis y actividad en hepatocitos. (162) (163) Los estudios histopatológicos han demostrado que γ GT incrementa su síntesis tanto en hepatocitos como en fibroblastos, células de canalículos biliares y pseudolóbulos, siempre en correlación con un incremento marcado de infiltrado de células

inflamatorias. (164) (163) Tumores, fibrosis, cirrosis entre otras patologías crónicas inflamatorias degenerativas han demostrado el incremento de la actividad de la enzima en el tejido hepático, mostrando una correlación estrecha con el incremento de AST, ALT, LDH y α -fetoproteína. (163) En el hígado de rata adulta la actividad enzimática de γ GT, evaluada por métodos histoquímicos, se limita a unos pocos grupos de hepatocitos predominantemente localizados en la región periportal y a las células epiteliales del conducto biliar, la distribución heterogénea de la actividad histológica de γ GT en hígado de rata también se ha confirmado por estudios bioquímicos que implican procedimientos de fraccionamiento celular, tal y como se realizó en nuestro estudio, aunque en el humano se restringe a la enzima a la membrana de las células de los canaliculos, en la rata la actividad no es exclusiva de dicha fracción membranal, también se halla distribuida en las zonas 1, 2 y 3 del lobulillo hepático,(165-168) lo que sugiere fuertemente que tanto el consumo separado de las bebidas como el combinado puede agredir diferentes zonas hepáticas incrementando la síntesis de la enzima, así como su presencia y actividad sérica.

La γ GT se halla en la membrana de las células de los sinusoides hepáticos en cerdos de guinea, estas células se asocian a la alta producción de glutatión hacia la zona periportal hepática lo cual confirma que γ GT es una enzima asociada a la protección hepática en procesos de inflamación o agresión por estrés oxidativo; mismo caso se ha observado en el resto del parénquima hepático. (163) El incremento de la actividad de la enzima en modelos de exposición aguda y crónica a alcohol se ha mostrado, (169) (170) sin embargo hasta el momento no hay reportes con la administración única de la bebida o la combinación de esta con vodka. En concordancia al hecho de no afección canalicular la actividad de γ GT hepática solo mostró ligeros incrementos asociados primordialmente al consumo del alcohol y no al de la bebida energizante ya que con esta de manera individual no mostró incremento, sino por el contrario disminuyó su inducción tisular.

Finalmente fue estudiada la hepatotoxicidad desde el punto de vista enzimático de CHE, que generalmente su inhibición está asociada a procesos tóxicos, sin embargo, diferentes inductores de toxicidad pueden incrementar la actividad tisular de la enzima. Dentro de los factores que pueden influenciar positivamente la actividad de la proteína se halla en revisión con un amplio campo de estudio la disfunción en el metabolismo lipídico y la hepatotoxicidad presentada por la esteatosis en dicho órgano. (171) Los niveles más altos de actividad de la enzima se encuentran en el suero de pacientes con hiperlipidemias, diabetes y obesidad en comparación con individuos clínicamente sanos o con límites biológicos dentro de rango e incluso inferiores. Además, la inducción de diabetes u obesidad en modelos animales se asocia con un aumento paralelo de niveles de triglicéridos en suero y la actividad de CHE. (172) (173) Aunque en nuestro estudio no se presentaron elevaciones importantes de los triglicéridos en suero por la combinación de las bebidas, el consumo por separado mostró un incremento importante de los lípidos, es posible que la acumulación de triglicéridos hepáticos suceda ante la combinación de las bebidas y por ende exista daño tisular asociado, lo cual en primera instancia propiciaría la síntesis de CHE y posteriormente su liberación a torrente sanguíneo en donde se halló incrementada su actividad.

En procesos patológicos que determinan síndrome metabólico y la resistencia a insulina puede afectar positivamente a la actividad hepática de CHE, así mismo, γ GT se encuentra elevada en los sujetos obesos debido a un efecto de la insulina en el hígado. (174) El hiperinsulinismo compensatorio también se ha asociado con esteatosis hepática y ocurre cuando los niveles elevados de insulina bloquean oxidación de ácidos grasos, pero son insuficientes para prevenir la movilización de ácidos grasos del tejido adiposo. La acumulación de ácidos grasos en el hígado promueve la síntesis de triglicéridos y aumenta la producción de VLDL. Discordancia entre la síntesis hepática de triglicéridos y la secreción de VLDL puede producir efectos citotóxicos de la acumulación de triglicéridos intrahepáticos y dar lugar a la liberación de los hepatocitos de γ GT y CHE (entre otras enzimas). Los datos del

presente estudio ponen de manifiesto la posibilidad de que CHE puede servir como un marcador del mismo proceso fisiopatológico que resulta en el síndrome metabólico.

Por otro lado, la evidencia sérica y tisular en relación a la actividad enzimática sugiere que existe daño tisular por lo que se procedió al análisis de biopsias hepáticas mediante el score o índice Ishak, también conocido como Índice de Actividad Histológica de Ishak, el cual evalúa el grado de lesión a partir del desarrollo de fibrosis, inflamación, necrosis lítica, confluyente y periportal. La evaluación fue desarrollada en relación a la vena centrolobulillar, la cual se asoció a la presencia de canalículos biliares y la arteria lobulillar hepática. Para conocer la gravedad de las lesiones, la biopsia hepática es una herramienta fundamental, que pretende alcanzar un diagnóstico más certero, además que la evaluación de las alteraciones histopatológicas permite efectuar o confirmar un diagnóstico. (175) No solamente su utilidad es para establecer un diagnóstico, sino también para la determinación del grado de actividad necroinflamatoria de la enfermedad o grado de fibrosis, para la detección o exclusión de otras lesiones. (47)

La expresión de estas evaluaciones de la arquitectura y de la actividad en forma semicuantitativa puede hacerse a través de índices de actividad histológica. La literatura ofrece numerosos métodos como Ishak, Knodell y Metavir. (31) (176) (177) El método de Ishak, ha demostrado su simplicidad, reproducibilidad y su validación en varios trabajos de investigación; es uno de los más utilizados actualmente, lo que lo convierte en una buena herramienta. El método propuesto para la evaluación de la actividad histológica gradúa la magnitud de cinco lesiones histológicas, las cuales se modificaron para evaluar los diferentes grados de intensidad de las mismas, en una forma detallada, sencilla y reproducible, constituyendo estas lesiones los patrones básicos para el diagnóstico, como son la fibrosis, la inflamación del espacio porta, necrosis periportal y necrosis confluyente. En el método propuesto, la necrosis representa un grado de destrucción celular y posterior alteración de la arquitectura

hepática. Se incluye la presencia de células en apoptosis, además de la presencia de los cuerpos de Mallory Denk, en las zonas de necrosis periportal o en el lobulillo, por representar una forma importante de daño o muerte celular. Como otra variable histológica a evaluar es la presencia a infiltrado leucocitarios que representan una lesión importante de daño celular de causa inmunológica. Se considera que este índice refleje más fielmente la magnitud de las lesiones histológicas, que los métodos antes citados.

En nuestro estudio los hepatocitos de las ratas control mostraron un aspecto normal, se observaron sinusoides hepáticos uniformes, con su estructura definida, no se observaron células necróticas, ni áreas de inflamación en ninguna de las tres zonas del lobulillo hepático. Sin embargo, el grupo que fue tratado con alcohol, reveló lesiones hepáticas caracterizadas por la presencia de grados bajos de fibrosis, inflamación por infiltrado celular leucocitario medio e necrosis lítica moderada-severa asociada a la zona centrolobulillar. Una primera respuesta a la lesión hepática es la infiltración de células inflamatorias (linfocitos, granulocitos y monocitos / macrófagos), su adhesión a la capa endotelial, y la transmigración a través del revestimiento sinusoidal en el parénquima. (178) (179) Estas células inflamatorias participan en la iniciación y progresión de la fibrosis hepática mediante la liberación de mediadores que estimulan la síntesis de matriz extracelular (MEC) por las células estelares hepáticas (HSC). (180) (181) (182)

La bibliografía enmarca que el hígado expuesto a consumos crónicos de alcohol puede desarrollar Enfermedad Hepática Alcohólica (EHA), en la cual el espectro histológico de esta enfermedad se extiende desde la esteatosis simple a la esteatohepatitis (caracteriza por la infiltración de células inflamatorias, células de Mallory Denk (células globosas), apoptosis y necrosis, además de la acumulación de grasa), fibrosis y cirrosis manifiesta. La esteatosis en esta configuración es principalmente macrovesicular y más prominente en la región centro lobulillar o zona 3. Las etapas iniciales de la lesión hepática inducida por el alcohol son reversibles

y la prevención de la esteatosis en modelos experimentales se ha demostrado para prevenir la progresión de la inflamación y fibrosis. (183) (184) Conjuntamente a la inflamación se ha observado un incremento en la producción de estrés oxidativo y cambios en el estatus redox, el cual puede conllevar a modificaciones metabólicas y enzimáticas como las que se pudieron observar. (184) La activación de rutas mitógenas de proteínas cinasas (MAPK), conjuntamente a NFκB y AP-1 son las principales vías de involucradas en la acción hepática del etanol, sus metabolitos y el desarrollo de desórdenes relacionados con el consumo alcohólico. (185)

Mezey et al., (2004) han mostrado que el abuso del alcohol incrementa la migración de monocitos, los cuales inducen el incremento de interleucinas y citocinas, primordialmente de TNF-α y por ende la migración leucocitaria de polimorfonucleares y linfocitos de estirpe T, la cual media hepatitis alcohólica. (186) (187) (188) El espectro infiltrativo leucocitario media la muerte y regeneración de los hepatocitos, durante la primera etapa y la inducción de necrosis (Lítica, Confluente y Periportal) existe el incremento en la producción de especies reactivas de oxígeno, además de IL-18, TNF-α y otras citocinas ya mencionadas, lo cual explica la liberación enzimática observada. (189) (190) (191) La agregación linfocítica en el hígado es una característica prominente del consumo alcohólico, sobre todo en la zona 3 hepática. La acumulación predominante de linfocitos T forman “sinapsis inmunológicas” ya que se unen a complejos antigénicos presentes en la membrana de los hepatocitos, primordialmente aductos de los hidroxietilos, (192) (193) (194) que inducen la activación del pool mitocondrial de GSH y por lo tanto las enzimas involucradas en el resguardo del pool como la γGT. (195) Cuando es insuficiente la protección de GSH entonces el estrés mitocondrial y retículo endoplasmático inducen muerte celular por apoptosis. (196) (197) El estrés reticular puede activar factores de transcripción como SREPB-1c y 2 que desvían a los hidroxietilos, aldehídos y acetil-CoA derivados del consumo alcohólico para la formación de triglicéridos y colesterol. (198) (197)

Los resultados en nuestro proyecto evidenciaron dichos infiltrados leucocitarios con predominio linfoide, además de un incremento en el estatus de necrosis lítica y esteatosis caracterizada por la presencia de vacuolas grasas en el parénquima hepático, como un signo prematuro de daño hepático. (199) Además de la presencia de hepatocitos en forma balonzante, caracterizados por la acumulación de fluido intracelular y por el hinchamiento del mismo, así como, la granulación presente y dilatación del citoplasma, conocidos como cuerpos de Mallory Denk.

Es importante resaltar que las células de Mallory Denk es una forma inicial de esteatohepatitis dispersa. Hacia el final de la etapa de la esteatohepatitis y cirrosis en la etapa de la hepatitis, un gran número de hepatocitos forman células o cuerpos de Mallory Denk. A menudo, esto predice la muerte del paciente, incluso antes de que haya desarrollado la cirrosis. En el estadio de cirrosis por EHA, los cuerpos de Mallory Denk se forman en el hígado en las fronteras de los tabiques fibróticos. La patogénesis de la formación de cuerpos de Mallory Denk ha sido revisada recientemente. (200) Los cuerpos de Mallory Denk son agresomas queratinizados compuestos por proteínas alteradas, las cuales resisten la proteólisis del proteasoma 26S. (200) Las proteínas acumuladas por dicha falla en la digestión incluyen a las citoqueratinas 8 y 18, ubiquitina, proteínas de shock térmico 70 y 90, tubulina, subunidades proteosómicas, transglutaminasas entre otras.(201-207) Estos cuerpos son inducidos debido a que el etanol induce la fosforilación de la citoqueratinas (208) y estas comienzan su agregación y acumulación. Los hepatocitos con estas características pierden su función de endocitosis y adquieren un reensamble tipo amiloideo engrosando su ultraestructura. (209) (210) Sin embargo, a pesar de las lesiones observadas en el presente estudio en los análisis histopatológicos el daño se consideró de leve – moderado.

De manera similar, los hígados de los grupos administrados con la bebida energizante y su combinación con alcohol, mostraron alteraciones similares a grupo alcohol. La cafeína contenida en la bebida energizante se ha mencionado como un

factor de hepatoprotección, ya que inhibe la expresión del factor de crecimiento de tejido conectivo en las células hepáticas, evitando así su proliferación en el hígado. (220) Adicionalmente, las bebidas energizantes también poseen un coctel de vitaminas del complejo B. Las vitaminas del complejo B son vitaminas solubles en agua como coenzimas necesarias para la función apropiada de la célula, en especial la función mitocondrial y la producción de energía. (211)

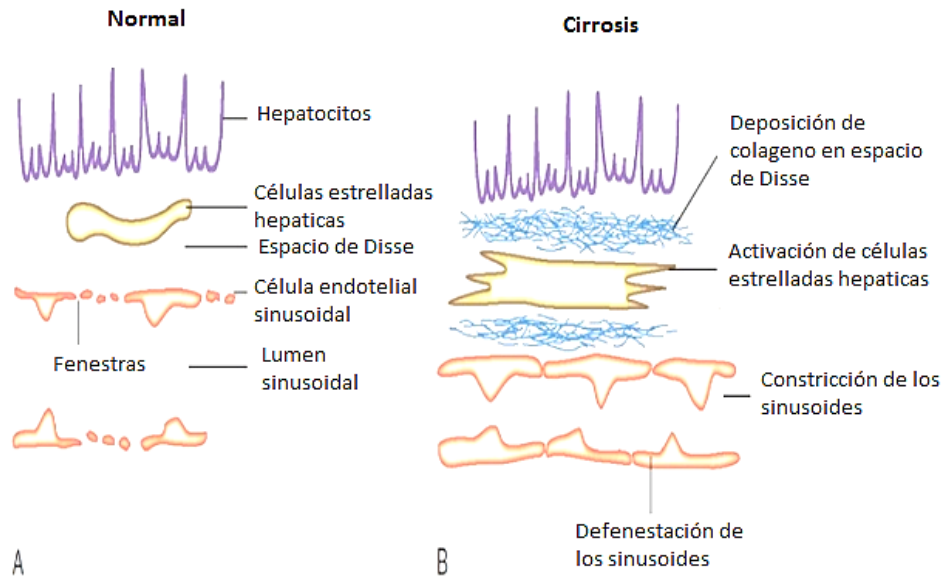
Las vitaminas B incluyen tiamina, riboflavina, niacina, ácido pantoténico, hidrocloreuro de piridoxina, biotina, inositol, y cianocobalamina. Debido a que los BE contienen grandes cantidades de azúcar, estas vitaminas son ingredientes necesarios para convertir la glucosa en energía. Por lo tanto, las vitaminas del complejo B son la "llave" que se necesita para desbloquear toda la energía proporcionada por los azúcares simples en los BE. (212) La Tiamina contenida (Vitamina B₁) es esencial para la carboxilación oxidativa del complejo multienzimático que se une a la cadena de la ácido α -ceto deshidrogenasa en el ciclo de Krebs y además sirve como coenzima precursora de algunas enzimas claves en el metabolismo de los carbohidratos. (213) Mientras que la Riboflavina (vitamina B₂) es requerida en la cadena respiratoria y además soporta el metabolismo energético de grasas, carbohidratos y proteínas. (214) La Niacina o vitamina B₃, por su parte es limitante en la producción de nicotin adenin dinucleótido (NADH) ya que es su precursor inmediato, además de ser una coenzima requerida como suplemento de protones para la fosforilación oxidativa y juega un rol de suma importancia en el metabolismo energético. (215) La vitamina B₅ o ácido pantoténico es requerido por la formación de coenzima A, α -cetoglutarato y piruvato deshidrogenasa, así como para la oxidación de los ácidos grasos. (211) Finalmente, la vitamina B₆ es una coenzima requerida para el metabolismo de glucosa y lípidos, así como para la síntesis de DNA y RNA; de manera muy específica la piridoxina es relevante para la actividad de AST y sobre todo de ALT. (216)

A pesar de que se encuentran ampliamente descritos los beneficios del consumo de cafeína y de vitaminas del complejo B, un consumo crónico conlleva a una hipervitaminosis (en el caso de las segundas), de la cual se halla descrito que el hígado sufre consecuencias graves de dicha toxicidad conllevando a hiperglicemia o a la formación de hígado graso no alcohólico. (217) Así mismo se han reportado un incremento de la presión sanguínea ante el consumo de bebidas energizantes, así como cambios en las ondas Q/R de los electrocardiogramas, ya que propicia el incremento de la contracción cardíaca.(218-220) Sin embargo, la falta de estudios sobre el consumo de estas bebidas dejan a la controversia los beneficios de su consumo.

Los cambios hipertensivos observados, pueden afectar la irrigación periportal, este tipo de hipertensión es definida como el incremento patológico de la presión hepática sinusoidal. Las secuelas de la hipertensión periportal se asocian fuertemente a la generación de cirrosis, (221) (222) la cual es resultado de procesos mecánicos de reducción en el diámetro de vasos, en donde la resistencia es inversamente proporcional al radio del vaso, conllevando a la deposición progresiva de matriz extracelular en el espacio de Disse, y causa estrechamiento de la luz sinusoidales y aumento de la resistencia a portal flujo. La consecuencia natural es la activación de las células estelares hepáticas (HSC) por lo que incrementa la producción de colágeno lo que conllevaría a la conversión de un tejido fibrótico, un paso determinante en la señalización irreversible de la obstrucción mecánica en el flujo hepático, resultando en una distorsión de la arquitectura hepática como pudo observarse en nuestro estudio. (223)

En conjunto con la deposición de colágeno, la resistencia hepática se incrementa aún más por la compresión de las vénulas centrilobulillares mediante la regeneración de nódulos de hepatocitos y la inflamación. Otros mecanismos bien caracterizados de resistencia mecánica incluyen capilarización del espacio de

Disse, que implica el desarrollo de una membrana basal subendotelial de tipo patológico. El endotelio sinusoidal sufre defenestración en la cirrosis, lo que debilitaría aún más la comunicación bidireccional entre la sangre sinusoidal y parénquima hepático. (224) (225)



Adicionalmente al proceso inflamatorio observado y asociado a la hipertensión periportal, también hay que tomar en cuenta la hiperactividad de la vitamina sobre el metabolismo energético, sobre todo el asociado a lípidos, el cual puede conllevar al desarrollo de dislipidemias observadas y secundariamente a la formación de hígado graso no alcohólico, que es una causa común de enfermedad hepática crónica. (226) Histológicamente es espectro de esta patología se encuentra habituado a la presencia de evidencias estatohepatíticas, sin embargo en estadios tempranos las principales evidencias es la presencia de celularidad inflamada, es decir, la aparición de los cuerpos de Mallory Denk, (227) con asociación a necroinflamación y fibrosis, la cual se observó en relación a lo determinado con el índice de Ishak en fibrosis grado leve, inflamación leve moderada, necrosis lítica moderada, necrosis confluyente y periportal leves.

La generación inicial de esteatosis hepática está asociada con el incremento de los niveles plasmáticos de triglicéridos y ácidos grasos provenientes del feedback adipocitario ante una inflamación desregulada o resistencia a insulina, ambos factores son determinantes para que el hígado reciba un mayor flujo lipídico o se halle comprometido en la síntesis de los mismos, y por lo tanto es su acumulación. (228) (229) La disminución en la exportación lipídica por las VLDL es resultado de los disturbios en el metabolismo de los ácidos grasos asociados a defectos mitocondriales y peroxisomales, (230) por alteraciones en la sobreproducción de especies reactivas de oxígeno (231) e inflamación caracterizada por el incremento de citocinas como TNF- α , IL-1, IL-6 que contribuyen al desarrollo de resistencia a insulina hepática, inhibiendo la activación del sustrato del receptor de insulina (IRS-1) y al mismo tiempo compitiendo por los sitios supresores de señalización de citocinas (SOCS), lo que lleva a una estimulación de la lipogénesis sin exportación de triglicéridos (Figura 26). (232)

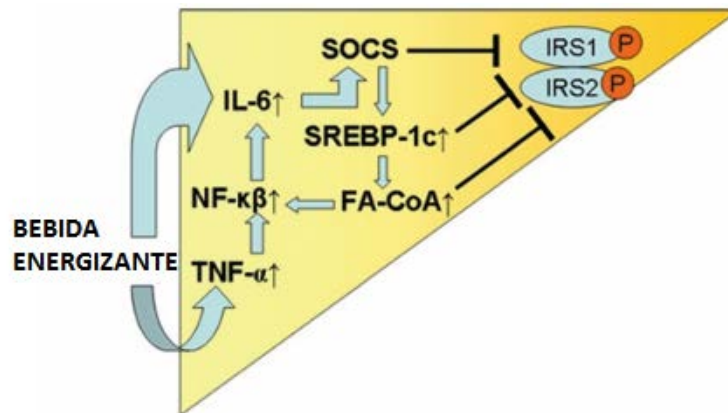


Figura 26. Modelo hipotético de la generación de esteatosis hepática por insulino resistencia hepática, generada por el consumo de BE. La disminución en la exportación lipídica por las VLDL es resultado de los disturbios en el metabolismo de los ácidos grasos asociados a defectos mitocondriales y peroxisomales, generando el incremento de citocinas como TNF- α , IL-1, IL-6 que contribuyen al desarrollo de resistencia a insulina hepática.

Khayyat et al., 2012 menciona que el exceso de consumo de bebidas energizantes muestra efectos dañinos a hepatocitos, los cuales correlacionaron con la actividad enzimática sérica, dichos efectos del consumo crónico de 4 semanas específicamente de Red Bull fueron relacionados con infiltración leucocitaria y congestión sinusoidal, así como incremento en el número de células picnóticas y progresiva acumulación lipídica, aumento de cuerpos de Mallory Denk. Los cambios ultraestructurales evidenciados por microscopia electrónica mostraron la acumulación lipídica en vesículas citoplasmáticas, dilatación del retículo endoplasmático rugoso, pérdida en el número de ribosomas, “hinchazón” mitocondrial, cisternas en el retículo endoplasmático liso, ampliación del espacio intercelular entre los hepatocitos, cuerpos de Golgi, lisosomas primarios y estructuras membranales tipo mielina. Además, muchos núcleos mostraron contracción y deformación, los nucléolos se desplazaron a la periferia del núcleo o desaparecieron. (145) Las alteraciones observadas coinciden con los indicadores mostrados en nuestro trabajo por el índice de Ishak y la correlatividad enzimática mostrada.

La toxicidad relativa de algunos componentes las bebidas energizantes no se ha comprobado a nivel estructural de diferentes tejidos, sin embargo aparte de los ya mencionados también debe considerarse el benzoato de sodio y los umbrales toxicológicos de las vitaminas y cafeínas, sin descartar el efecto de la taurina, la combinación de estos componentes así como el exceso en su ingestión puede producir daños o alteraciones hepáticas que pueden favorecer el desarrollo de enfermedades metabólicas y degenerativas, (233) (234) así como modificaciones en la regulación lipídica, modulación celular de calcio y desestabilización de los osmoreguladores. (235)

Finalmente, respecto al consumo de la combinación de bebidas energizantes y alcohol, se pudo observar comportamientos similares en la histología evaluada, aunque la actividad enzimática en tejido hepático se observó con un mayor

incremento, los resultados sugieren fuertemente que a pesar de que el daño por consumo alcohólico tiene mecanismos bien definidos, el consumo de bebidas energizantes conllevan a daños similares por rutas metabólicas diferentes. Los mecanismos de agresión hepática por el consumo combinado de las bebidas no presentan características aditivas, sin embargo, la actividad enzimática en los hepatocitos fue claramente superior, aparentemente con la finalidad de mantener limitados los cambios estructurales y funcionales del tejido. La combinación de estas bebidas se ha catalogado como “la tormenta perfecta”, (236) debido a que poseen componentes que incrementan la presión y son estimuladores del sistema nervioso central y al mismo tiempo despresurizadores de los mismos. Haciendo del consumo combinado de estas bebidas un problema de salud pública, aunque la naturaleza de la relación de bebidas energizantes - alcohol aún no se ha aclarado completamente, en relación al grado en que los efectos combinados pudieran presentar un mecanismo aditivo o sinérgico relación a su farmacología. (237) Aunque los informes sugieren que el consumo de bebidas energéticas con alcohol conlleva a reducir la conciencia de la intoxicación por alcohol y un mayor consumo del mismo, no hay evidencia científica confiable para deducir la gravedad hepática de dicho consumo. Por primera vez se muestran cambios estructurales y funcionales hepáticos dados por el consumo combinado de BE – Vodka, en los que histológicamente desarrollan rasgos leves – moderados de esteatohepatitis necrosante.

Claramente, se necesita más investigación acerca de los efectos combinados de las sustancias que figuran en el presente informe y, en concreto, a las dosis realizadas que corresponden al consumo de los mencionados “shots”. Los adolescentes y adultos jóvenes, los atletas y no atletas, están consumiendo este tipo de bebidas solas o combinadas a un ritmo alarmante; por lo tanto, hay que determinar si el uso a largo plazo de los BE por estas poblaciones se traducirá en efectos deletéreos más tarde.

11. CONCLUSIONES

El presente trabajo da evidencias por primera vez del tipo de lesiones hepáticas por el consumo combinado de vodka y Red Bull (bebida tipo “shot”). Además de evidenciar los efectos sobre la actividad motora del consumo de la combinación vodka-bebida energizante de una manera crónica en ratas Wistar. Al evaluar la actividad motora en los animales expuestos a dicho tratamiento presentan un incremento de la actividad motora en comparación al grupo tratado con alcohol, sin embargo, con respecto al grupo únicamente tratado con BE disminuye. Esto demuestra que las BE atenúa la toxicidad que causa el vodka sobre la actividad motora, pero no logra ser abatida por completo. Manifestando el efecto estimulante que inducen las BE por sus componentes.

En cuanto a la evaluación de la actividad enzimática sérica podemos concluir que el consumo de alcohol propicia la elevación de la actividad de AST, ALT y LDH, además de la elevación de los triglicéridos; el análisis de los índices AST/ALT y ALT/LDH confirmaron la probable existencia de lesión hepática. Mientras que el consumo de la BE produjo alteraciones similares al consumo de alcohol. La combinación de la bebida tipo “shot”, mostró el mayor grado de agresión ya que en conjunto a los índices indicados también existió elevación de la actividad enzimática de γ GT y CHE.

Mientras que en el tejido hepático los resultados confirmaron la actividad elevada de las transaminasas, LDH, γ GT y ALP, esta última con resultados significativos estadísticamente, pero bioclínicamente no severos. En el tejido la BE se comportó de manera diferente ya LDH y ALP mostraron actividades diferentes al consumo alcohólico, por lo que se pudo concluir que los mecanismos de inducción al daño o lesión son por vías diferentes, pero bioclínicamente similares. Mientras que el consumo combinado elevó la actividad de todas las enzimas analizadas, inclusive de CHE una enzima relacionada como biomarcador para el desarrollo de

esteatohepatitis, concluyendo que el tipo de agresión farmacocinética entre bebidas es sinérgico, más que aditivo.

Mientras que del estudio histológico se pudo implementar exitosamente el índice Ishak, concluyendo que el grado lesión desarrollado por el consumo crónico de bebidas alcohólicas y energizantes, solas o combinadas genera una lesión leve moderada de esteatohepatitis necrosante hacia la zona 3 (periportal).

12. BIBLIOGRAFIA

1. **Geneser, F., & cols.** Digestive sistem. *Histology*. Madrid : Panamericana., 2000, pág. 518 a 531.
2. **Fawcett, D.W.** Hígado y Vesicula Biliar. *Tratado de histología*. Madrid : Mc Graw- Hill Interamericana, 1995, págs. 713-714.
3. **Marieb, E. N.** Hígado. *Anatomía y Fisiología Humana*. España : Pearson Educación S.A., 2008.
4. **Lesmes Moltó, L. y cols.** Aumento aislado de transaminasas: aproximación diagnóstica. 2013, Vol. 6, págs. 35-42.
5. **Branda, N. y cols.** Enzimas. 2008, págs. 1-5.
6. **Barba, E.** Esteatosis hepática, esteatohepatitis y marcadores de lesión hepática. 2008, Vol. 55, págs. 216-232.
7. **Varas, SM y cols.** Enzimas. *Enzimología clínica*. 2013, pág. 14.
8. **Portillo, y cols.** Enzimología Clínica. *Aspectos basicos de Bioquímica Clínica*. Madrid, España : Diaz de Santos, 1997, págs. 103-111.
9. **Córdoba, G. y cols.** Abuso de alcohol. *Grupos de expertos del PAPPs*. 2001, Vol. 18, págs. 27-29.
10. **Gaw y cols.** Examen bioquímico de la función hepática. [aut. libro] Allam Gaw. *Bioquímica clínica*. s.l. : Harcourt, 2009, págs. 50-54.
11. **Biel, M., Francisco y cols.** Interpretación de exámenes de laboratorio hepático y aproximación diagnóstica en pacientes con pruebas alteradas. [En línea] 2008.
http://www.academia.edu/18112366/Unidad_de_Gastroenterologia.
12. **OMS.** Centro de Prensa. *Alcohol*. [En línea] Mayo de 2015. [Citado el: 10 de Abril de 2015.]
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs349/es/>.
13. **Estruch, R.** Efectos del alcohol en la fisiología humana. 2002, Vol. 14, págs. 43-61.
14. **Bataller, Sifre R.** Intoxicaciones por alcoholes y glicoles. *Toxicología clínica*. s.l. : Romeu, 2004, págs. 52-56.
15. **Hernández, S. y cols.** Estrés oxidativo y nitrosativo como mecanismo de daño al hepatocito producido por el metabolismo del etanol. 2014, Vol. 30, págs. 295-308.

16. **Bastidas, B y cols.** Predisposición genética a daño hepático por alcohol. 2005, Vol. 7, págs. 55-60.
17. **SSEV, Secretaria de Salud del Estado de Veracruz.** *Guía de diagnóstico y tratamiento de intoxicación por Alcohol Etílico.* s.l. : Centro de Información Toxicologica de Veracruz.
18. **Porter, L.** El alcohol y el hígado. 2012, Vol. 4, págs. 1-4.
19. **Cofepris.** Bebidas con Taurina, Cafeína y Glucoronolactona. 2005.
20. **Cote, M y cols.** Energy drinks: rehydrating agents or stimunlants? 2011, Vol. 59, págs. 255-266.
21. **Roussos, A. y cols.** Bebidas energizantes y su consumo en adolescentes. 2009, Vol. 10, págs. 124-129.
22. **Salvador, R y cols.** Consumo de bebidas energéticas en una población de estudiantes universitarios del estado de Tabasco, México. 2013, Vol. 19, págs. 10-14.
23. **Valenzuela, A.** Coffe, caffeine, and its effects on cardiovascular health and maternal health. 2010, Vol. 37, págs. 514-523.
24. **Crews, HM. y cols.** Urinary biomarkers for assessing dietary exposure to caffeine. 2001, Vol. 18, págs. 1075-1087.
25. **Castellanos, R. y cols.** Efectos fisiológicos de las bebidas energizantes. 2006, págs. 43-49.
26. **Solórzano, H.** La taurina: ese aminoácido desconocido. *Terapia Bioquímica Nutricional, Dr. Héctor Solórzano.* [En línea] 2003. [Citado el: 15 de marzo de 2015.] <http://hector.solorzano.com.mx/017.html>.
27. **Iglesias y cols.** Intoxicación por drogas de abuso. 2009, págs. 101-102.
28. **Bernal, L.** Las vitaminas. [aut. libro] Lourdes Bernal. *Los Micronutrientes: Las Vitaminas.* s.l. : Concejalía de Sanidad del Ayuntamiento de Valencia, 2010, págs. 17-42.
29. **Melgarejo, M.** El verdadero poder de las bebidas energéticas. 2004, Vol. 6, págs. 1-6.
30. **Cequera, A. y cols.** Biomarcadores para fibrosis hepática, avances,. 2014.
31. **Ishak, K y cols.** Histologic grading and staging of chronic hepatitis. 1995, págs. 696-699.
32. **Mendoza, N.** *Farmacología médica.* México : Panamericana, 2008.
33. **Dusek, G.** Drogas: Un Estudio Basado en Hechos. s.l. : Fondo Educativo Interamericano, 1983.

34. **Bahena, R. y cols.** Dopamina: síntesis, liberación y receptores del Sistema Nervioso Central. 2000, págs. 39- 60.
35. **DeLucia R, Oliveira Filho-RM.** Farmacología Integrada. 2004.
36. **Liguori A, Robinson JH.** Caffeine antagonism of alcohol-induced driving impairment. 2001, págs. 123-29.
37. **Fudin R, Nicastro R.** Can caffeine antagonize alcohol-induced performance decrements in humans? 1988, págs. 375-91.
38. **Jain AC, Mehta MC, Billie M.** Combined effects of caffeine and alcohol on hemodynamics and coronary artery blood flow in dogs. 1999, págs. 49-55.
39. **López-Cruz, L & cols.** Efecto ansiogénico y supresión motora inducidos por dosis altas de cafeína: Estudio en modelos animales. 2009, págs. 1-14.
40. **Olive, MF.** Interactions between taurine and ethanol in the central nervous system. 2002, págs. 345-357.
41. **McArdle WD, Katch FI, Katch VL.** *Exercise Physiology: Energy, Nutrition and Human Performance.* Baltimore : 4th ed. Williams and Wilkins, 1996.
42. **Ferreira, S E y al, et.** Effects of Energy Drink Ingestion on Alcohol Intoxication. 2006, págs. 598 - 605.
43. **Burkitt HG, Young B, Heath JW.** *Wheater's functional histology: a text and colour atlas. 3rd ed.* Edinburgh : Churchill Livingstone, 1993.
44. **Wroblewski, F.** The clinical significance of alterations in transaminase activities of serum and other body fluids. 1958, págs. 313-51.
45. **Kamimoto, Y y cols.** Plasma clearance of intravenously injected aspartate aminotransferase isozymes: evidence for preferential uptake by sinusoidal liver cells. 1985, págs. 367-75.
46. **Dufour, DR y cols.** Diagnosis and monitoring of hepatic injury. I. Performance characteristics of laboratory tests. 2000, págs. 2027-49.
47. **Alarcon, C y cols.** Los mapas enzimáticos tisulares y séricos y la utilidad diagnóstica de los coeficientes enzimáticos. Mérida, Venezuela : s.n., 1998, págs. 1-4.
48. **Green, RM y S., Flamm.** AGA technical review on the evaluation of liver chemistry tests. 2002, págs. 1367-84.

49. **Pratt y cols.** Evaluation of abnormal liver-enzyme results in asymptomatic patients. 2000, págs. 1266-1271.
50. **Gopal, DV y Rosen, HR.** Abnormal findings on liver function tests. Interpreting results to narrow the diagnosis and establish a prognosis. 2000, págs. 100-2, 105-9, 113-4.
51. **Alatalo, PI y Koivisto HM, Hietala JP, Puukka KS, Bloigu R, Niemelä OJ.** Effect of moderate alcohol consumption on liver enzymes increases with increasing body mass index. 2008, pág. 103.
52. **Daepfen, JB. Smith, TL. Schuckit, MA.** Influence of age and body mass index on gamma-glutamyltransferase activity: a 15-year follow-up evaluation in a community sample. 1998, págs. 941-4.
53. **Lawlor, DA. Sattar, N. Smith, GD. Ebrahim, S.** The associations of physical activity and adiposity with alanine aminotransferase and gamma-glutamyltransferase. 2005, págs. 1081-8.
54. **Rohrer, J. Rohland, BM. Denison, A. Way, A.** Frequency of alcohol use and obesity in community medicine patients. 2005, págs. 6-17.
55. **Stranges, S. Dorn JM, Muti P, et al..** Body fat distribution, relative weight, and liver enzyme levels: a population-based study. 2004, págs. 754-63.
56. **Puukka, K y Hietala J, Koivisto H, Anttila P, Bloigu R, Niemelä O.** Additive effects of moderate drinking and obesity on serum gamma-glutamyl transferase activity. 2006, págs. 1351-4.
57. **Ruhl, CE y Everhart, JE.** Joint effects of body weight and alcohol on elevated serum alanine aminotransferase in the United States population. 2005, págs. 1260-8.
58. **De Ritis, F y cols.** An enzyme test for the diagnosis of viral hepatitis: The transaminase serum activities. 1957.
59. **Gonzalez, H.** Estudio bioquímico de la función e integridad hepáticas. [aut. libro] Hernandez Alvaro Gonzalez. *Principios de Bioquímica Clínica y Patología Molecular*. España : Elsevier, 2010, págs. 226-7.
60. **Henry, J.B.** Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods. Philadelphia : s.n., 1996, págs. 280-282.
61. **Mao J, DeMayo FJ, Li H, Abu-Elheiga L, Gu Z, Shaikenov TE, Kordari P, Chirala SS, Heird WC, Wakil SJ.** Liver-specific deletion of acetyl-CoA carboxylase 1 reduces hepatic triglyceride accumulation without affecting glucose homeostasis. *Proc Natl Acad Sci . U S A .* : s.n., 2006, Vol. 103(22), págs. 8552-7.

62. **Harada N, Oda Z, Hara Y, Fujinami K, Okawa M, Ohbuchi K, Yonemoto M, Ikeda Y, Ohwaki K, Aragane K, Tamai Y, Kusunoki J.** Hepatic de novo lipogenesis is present in liver-specific ACC1-deficient mice. *Mol Cell Biol.* 2007, Vols. 27(5):1881-8.
63. **Chakravarthy MV, Pan Z, Zhu Y, Tordjman K, Schneider JG, Coleman T, Turk J, Semenkovich CF.** "New" hepatic fat activates PPARalpha to maintain glucose, lipid, and cholesterol homeostasis. 2005 May., Vol. 1(5), págs. 309-22.
64. **Francis Ka-Ming Chan, Kenta Moriwaki, and María José De Rosa.** Detection of Necrosis by Release of Lactate Dehydrogenase (LDH) Activity. 2013, Vol. 979, págs. 65-70.
65. **Kono H, Rock KL.** How dying cells alert the immune system to danger. *s.l.* : 8, 2008, págs. 279-289.
66. **Burd JF, Usategui-Gomez M.** A colorimetric assay for serum lactate dehydrogenase. Vol. 46, págs. 223-227.
67. **Korzeniewski C, Callewaert DM.** An enzyme-release assay for natural cytotoxicity. Vol. 64, págs. 313-320.
68. **Decker T, Lohmann-Matthes ML.** A quick and simple method for the quantitation of lactate dehydrogenase release in measurements of cellular cytotoxicity and tumor necrosis factor (TNF) activity. 1988, Vol. 115, págs. 61-69.
69. **Flanna K. Soliday, Yvette P. Conley, Richard Henker.** Pseudocholinesterase Deficiency: A Comprehensive Review of Genetic, Acquired, and Drug Influences. Vol. 78.
70. **Novacek G, Vogelsang H, Schmidt B, Lochs H, Wien Klin Wochenschr.** Are single measurements of pseudocholinesterase and albumin markers for inflammatory activity or nutritional status in Crohn's disease? 1993, Vol. 105, págs. 111-5.
71. **Whitfield JB1, Heath AC, Madden PA, Pergadia ML, Montgomery GW, Martin NG.** Metabolic and biochemical effects of low-to-moderate alcohol consumption. 2013, Vol. 37, págs. 575_86.
72. **Calderon R, Adler B, Abramson J, Gofin J, Kark J.** Butyrylcholinesterase Activity, Cardiovascular Risk Factors, and Mortality in Middle-Aged and Elderly Men and Women in Jerusalem. 2006, Vol. 52, págs. 845-852.
73. **Ballard SL, Wellborn-Kim JJ, Clauson KA.** Effects of commercial energy drink consumption on athletic performance and body composition. 2010, Vol. 38, págs. 107-17.
74. **Usman A, Jawaid A.** Hypertension in a young boy: an energy drink effect. 2012, Vol. 5, págs. 591.
75. **AX, Bigard.** Risks of energy drinks in youths. 2010, Vol. 17, págs. 1625-31.

76. **Battelli MG1, Musiani S, Valgimigli M, Gramantieri L, Tomassoni F, Bolondi L, Stirpe F.** Serum xanthine oxidase in human liver disease. 2001, Vol. 96, págs. 1194-9.
77. **RJ, Huxtable.** Physiological actions of taurine. Vol. 72, págs. 101–163.
78. **Kerial MDJ, Waterfield CJ, Kenyon SH, Asker DS, Timbrell JA.** Taurine: Protective properties against ethanol-induced hepatic steatosis and lipid peroxidation during chronic ethanol consumption in rats. 1998, Vol. 15, págs. 53-76.
79. **Trachtman H, Futterwert C, Robert B.** Taurine prevents glucose-induced lipid peroxidation and increased collagen production in cultured rat mesangial cells. 1993, Vol. 191, pág. 759.
80. **Wang CH, Zhang XK, Miu YM.** Protective effects of taurine on hepatic mitochondria in the process of ischemia reperfusion in rats. 2002, Vol. 2, págs. 351-354 and 357.
81. **Wei X, Liang J, Mao DW.** Influence of taurine on the formation of hepatic fibrosis in rats. Vol. 12, págs. 6-7.
82. **Stipanuk MH, Coloso RM, Garcia RA, Banks MF.** Cysteine concentration regulates cysteine metabolism to glutathione sulfate and taurine in rat hepatocytes. 1992, Vol. 122, págs. 429-427.
83. **Hisamitsu Hayashi a, Tappei Takada b , Hiroshi Suzuki b , Reiko Onuki a , Alan F. Hofmann c , Yuichi Sugiyama.** Transport by vesicles of glycine and taurine conjugated bile salts and taurilithocholate 3- sulfate: A comparison of human BSEP with rat Bsep. 2005, Vol. 1738, págs. 54-62.
84. **Guicciardi M. E., Harmeet Malhi, Justin L. Mott, and Gregory J. Gores.** Apoptosis and Necrosis in the Liver. 2013, Vol. 10.
85. *Recent advances in alcoholic liver disease III. Role of the innate immune response in alcoholic hepatitis.* **Hines IN1, Wheeler MD.** Aug de 2004, Am J Physiol Gastrointest liver Physiol , Vol. 287, págs. 310-4.
86. **AR, Henderson.** Isoenzymes of lactate dehydrogenase. USA and Canada : s.n., 1986, Vol. III.
87. **Rodrigue F, Boyer O, Feillet F, Lemonnier A.** Lactate dehydrogenase LD5 : LD2 ratio as an indicator of early graft function and complications following pediatric orthotopic liver transplantation. 1995, Vol. 27.
88. **Laila Faddah, Nabil Abdel-Hamid , Yaser Abul-Naga , Sanaa Ibrahim , Ahmed Mahmoud. J.** Lactate dehydrogenase isoenzyme pattern in the liver tissue of chemically-injured rats treated by combinations of diphenyl dimethyl bicarboxylate. 2007, Vol. 5.

89. **Itoh N, Yokota H, Yuasa A.** Serum enzyme activity evaluated in budgerigars (*Melopsittacus undulatus*) inflicted with muscle injury. 1993, Vol. 55, págs. 275-280.
90. **AT, Blei.** Selection for acute liver failure: have we got it right? 2005, Vol. 11, págs. 30-34.
91. **J, Neuberger.** Prediction of survival for patients with fulminant hepatic failure. 2005, Vol. 41, págs. 19-22.
92. **Ferreira SE, Mello MT, Souza-Formigoni MLO.** Can energy drinks affect the effects of alcoholic beverages? A study with users. 2004, Vol. 50, págs. 48-51.
93. **Ferreira SE, Mello MT, Rossi MV, Souza-Formigoni MLO.** Does an energy drink modify the effects of alcohol in a maximal effort test? 2004, Vol. 28, págs. 1408-1412.
94. **Ferreira SE, Quadros IMH, Trindade AA, Takahashi S, Koyama RG, Souza-Formigoni MLO.** Can energy drinks reduce the depressor effect of ethanol? An experimental study in mice. 2004, Vol. 82, págs. 841-847.
95. **Díaz A, Treviño S, Guevara J, Muñoz-Arenas G, Brambila E, Peña-Rosas, Espinosa B, Flores G, Venegas B, Moreno-Rodríguez A, Handal-Silva A, and Aguilar-Alonso P, Lopez-Lopez G, Morán-Perales JL.** Energy Drink Administration in Combination with Alcohol Causes an Inflammatory Response and Oxidative Stress in the Hippocampus and Temporal Cortex of Rats. Vol. ID 274879.
96. **Li G, Scull C, Ozcan L, Tabas I.** NADPH oxidase links endoplasmic reticulum stress, oxidative stress, and PKR activation to induce apoptosis. 2010, Vol. 191, págs. 1113-1125.
97. **Santos CX, Tanaka LY, Wosniak J, Laurindo FR.** Mechanisms and implications of reactive oxygen species generation during the unfolded protein response: roles of endoplasmic reticulum oxidoreductases, mitochondrial electron transport and NADPH oxidase. 2009, Vol. 11, págs. 2409-2427.
98. **Ron., Ira Tabas and David.** Integrating the mechanisms of apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress. 2011, Vol. 13, págs. 184-190.
99. **Kutty KM, Prabhakaran V, Cooper AR.** Non-cholinergic function of cholinesterase in enzymes in the cholinergic family. 1995, págs. 423-6.
100. **Alcantara VM, Chautard-Friere-Maia EA, Scartezini M, et al.** Butyrylcholinesterase activity and risk factors for coronary artery disease. 2002, Vol. 62, págs. 399-404.
101. **Edward W. Randell, Maria S. Mathews, Hongwei Zhang, Jim S. Seraj, Guang Sun.** Relationship between serum butyrylcholinesterase and the metabolic síndrome. 2005, Vol. 38, págs. 799-805.

102. **Kutty KM, Payne RH.** Serum pseudocholinesterase and verylow-density lipoprotein metabolism. 1994, Vol. 8, págs. 247-50.
103. **Bullock., Clive.** The biochemistry of alcohol metabolism- a brief review. 2010, Vol. 18.
104. **CS., Lieber.** Alcohol and the liver: metabolism of alcohol and its role in hepatic and extrahepatic diseases. New York : s.n., 2000, Vol. 67, págs. 84-94.
105. **Lieber., Charles S.** Ethanol metabolism, cirrhosis and alcoholism. 1997, Vol. 257, págs. 59-84.
106. **Mark A. Barnes, Sanjoy Roychowdhury, and Laura E. Nagy.** Innate immunity and cell death in alcoholic liver disease: Role of cytochrome P4502E1. 2014, Vol. 2, págs. 929-935.
107. **Worm D1, Naver LS, Hansen DL.** Hypoglycaemia and hypocalcaemia in a gastric bypass-operated patient with high alcohol consumption and colectomia. 2015, Vol. 177.
108. **K., Takase.** Physical diseases in alcoholism. 2015, Vol. 73, págs. 1546-51.
109. **Chandrasekara H1, Fernando P, Danjuma M, Jayawarna C.** Ketoacidosis is not always due to diabetes. 2014.
110. **Shull PD, Rapoport J.** Life-threatening reversible acidosis caused by alcohol abuse. 2010, Vol. 6, págs. 555-9.
111. **K1., Heltø.** Alcoholic ketoacidosis and lactic acidosis. 2009, Vol. 171, págs. 318-9.
112. **Bataller., Bin Gao and Ramon.** Alcoholic Liver Disease: Pathogenesis and New Therapeutic Targets. 2011, Vol. 141, págs. 1572-1585.
113. **McClain., Juliane I. Beier and Craig J.** Mechanisms and cell signaling in alcoholic liver disease. 2010, Vol. 391, págs. 1249-1264.
114. **Adam-Vizi., Laszlo Tretter and Vera.** Alpha-ketoglutarate dehydrogenase: a target and generator of oxidative stress. 2005, Vol. 360, págs. 2335-2345.
115. **Vanderlinde, RE.** Review of pyridoxal phosphate and the transaminases in liver disease. 1986, págs. 79-93.
116. **Cascales C, Cascales M, Santos-Ruiz A.** Effect of chronic ethanol or acetaldehyde on hepatic alcohol and aldehyde dehydrogenases, aminotransferases and glutamate dehydrogenase. 1985, Vol. 41, págs. 19-27.

117. **Fahien LA1, Teller JK.** Glutamate-malate metabolism in liver mitochondria. A model constructed on the basis of mitochondrial levels of enzymes, specificity, dissociation constants, and stoichiometry of hetero-enzyme complexes. 1992, Vol. 267, págs. 10411-22.
118. **Geerts WJ, Jonker A, Boon L, et al.** In situ measurement of glutamate concentrations in the periportal, intermediate, and pericentral zones of rat liver. 1997, Vol. 45, págs. 1217-29.
119. **G., Dieter H and Wolfgang.** Hepatocyte heterogeneity in glutamate uptake by isolated perfused rat liver. 1983, Vol. 136, págs. 421-425.
120. **Stanislas Pol, Bertrand Nalpas, Anne Vassault, Bernadette Bousquet-Lemerrier, Dominique Franco, Bernard Lacour, Pierre Berthelot, Jacques Hanoune, Robert Barouki.** Hepatic activity and mRNA expression of aspartate aminotransferase isoenzymes in alcoholic and nonalcoholic liver disease. 1991, Vol. 14, págs. 620-625.
121. **Cordoba J, O’Riordan K, Dupuis J, Borensztajn J, Blei A.** Diurnal variation of serum alanine transaminase activity in chronic liver disease. 1999, Vol. 28, págs. 1724-1725.
122. **Powers, Robert H y Dean, Dorothy E.** Evaluation of Potential Lactate/Lactate Dehydrogenase Interference with an Enzymatic Alcohol Analysis. 2009, págs. 561-63.
123. **Allen, J.P., y otros.** *Carbohydrate-deficient transferrin as a measure of immoderate drinking: Remaining issues.* 1994. págs. 799-812. Vol. 18.
124. **Allen, J.P., Sillanaukee, P. y and Anton, R.** Contribution of carbohydrate deficient transferrin to gamma glutamyl transpeptidase in evaluating progress of patients in treatment for alcoholism. 1999, Vol. 23, págs. 115-120.
125. **Allen, J.P., y otros.** The role of biomarkers in alcoholism medication trials. 2001, Vol. 25, págs. 1119- 1125.
126. **Allen, J.P., and Litten, R.Z.** The role of laboratory tests in alcoholism treatment. 2001, Vol. 20, págs. 81-85.
127. **Gjerde, H., y otros.** A comparison of serum carbohydrate-deficient transferrin with other biological markers of excessive drinking. 1988, Vol. 48, págs. 1-6.
128. **Goldberg, D.M., and Kapur, B.M.** Enzymes and circulating proteins as markers of alcohol abuse. 1994, Vol. 226, págs. 191-209.
129. **Meregalli, M., y otros.** Carbohydrate-deficient transferrin in alcohol and non-alcohol abusers with liver disease. 1995, Vol. 19, págs. 1525-1527.
130. **Sillanaukee, P.** Laboratory markers of alcohol abuse. 1996, Vol. 31, págs. 613-616.

131. **Brenner, H., y otros.** Distribution, determinants, and prognostic value of γ -glutamyltransferase for all-cause mortality in a cohort of construction workers from southern Germany. 1997, Vol. 26, págs. 305- 310.
132. **Israili., David H. Vroon and Zafar.** Chapter 100 Alkaline Phosphatase and Gamma Glutamyltransferase. 1990.
133. **Wolf PL.** Clinical significance of an increased or decreased serum alkaline phosphatase level. 1978, Vol. 102, págs. 497-501.
134. **Subir Kumar Das, Dhanya L, Sowmya Varadhan, Sukhes Mukherjee and D M Vasudevan.** Effects of chronic ethanol consumption in blood: a time dependent study on rat. 2009, Vol. 24, págs. 301-306.
135. **Ponsioen CI, Tytgat GN Am J.** Primary sclerosing cholangitis: a clinical review. Gastroenterol. 1998, Vol. 93, págs. 515-23.
136. **J, Heathcote J Can.** Update on primary biliary cirrhosis. 2000, Vol. 14, págs. 43-8.
137. **Poupon R.** Autoimmune overlapping syndromes. 2003, Vol. 7, págs. 865-78.
138. **Bonnand AM, Heathcote EJ, Lindor KD, Poupon RE.** Clinical significance of serum bilirubin levels under ursodeoxycholic acid therapy in patients with primary biliary cirrhosis. 1999, Vol. 29, págs. 39-43.
139. **Kim WR, Therneau TM, Wiesner RH, Poterucha JJ, Benson JT, Malinchoc M, LaRusso NF, Lindor KD, Dickson ER.** A revised natural history model for primary sclerosing cholangitis. 2000, Vol. 75, págs. 688-94.
140. **Cumhur Bilgi, Serhat Tokgöz, Ahmet Aydin, Turgay Celik and Tayfun Uzbay.** The effects of chronic ethanol consumption and ethanol withdrawal on serum cholinesterase activity in rats. 2003, Vol. 38, págs. 316-320.
141. **Mc Isaac, R. J.** Cholinomimetic drugs — cholinesterase inhibitors. 1992, págs. 96-107.
142. **Eldar-Finkelman H., Yarkoni M.,.** Insulin Resistance and Glycogen Synthesis: Roles in Liver, Muscle and Adipose Tissue, in: Insulin resistance and insulin resistance syndrome. 2002, págs. 3-20.
143. **Levinthal G.N, Tavill A. S.,.** Liver Disease and Diabetes Mellitus. 1999, Vol. 17, pág. 72.
144. **Clore J., Post E., Bailey, D., Nestler J., Blackard W.,.** Evidence for increased liver glycogen in patients with noninsul independent diabetes mellitus after a 3-day fast. 1992, Vol. 74, págs. 660-666.

145. **Khayyat L., Rawi M.L., Essawy A.,** Histological, Ultrastructural and Physiological Studies on the Effect of Different Kinds of Energy Drinks on the Liver of Wistar albino Rat,. 2012, Vol. 8, págs. 688-697.
146. **Akande I.S., Banjoko O.A.,** Assessment of Biochemical Effect of “Power Horse” Energy Drink on Hepatic, Renal and Histological Functions in Sprague Dawley Rats. 2011, Vol. 1, pág. 4556.
147. **Verster JC, Aufricht C, Alford C.** Energy drinks mixed with alcohol: misconceptions, myths, and facts. 2012, Vol. 5, págs. 187-98.
148. **Ebuehi OA, Ajayi OE, Onyeulor AL, Awelimobor D.** Effects of oral administration of energy drinkson blood chemistry, tissue histology and brain acetylcholine in rabbits. 2011, Vol. 21, págs. 29-34.
149. **Higgins JP, Tuttle TD, Higgins CL.** Energy beverages: content and safety. 2010, Vol. 85, págs. 1033-41.
150. **Fitness., Committee on Nutrition and the Council on Sports Medicine and.** Sports drinks and energy drinks for children and adolescents: are they appropriate? 2011, Vol. 127, págs. 1182-9.
151. **Rossouw JE, Labadarios D, Davis M, Williams R..** Vitamin B6 and aspartate aminotransferase activity in chronic liver disease. 1978, Vol. 25, págs. 436-8.
152. **Baldi E, Burra P , Plebani M , Salvagnini M.** Serum malondialdehyde and mitochondrial aspartate aminotransferase activity as markers of chronic alcohol intake and alcoholic liver disease. 1993, Vol. 25, págs. 429-432.
153. **Nyblom H, Berggren U, Balldin J and Olsson R.** High ast/alt ratio may indicate advanced alcoholic liver disease rather than heavy drinking. 2004, Vol. 39, págs. 336-339.
154. **Jan Lerut.** Energy Drinks: Another Red Flag for the Liver Allograft. 2001, Vol. 17, págs. 1117-1118.
155. **Firth JD, Ebert BL, Pugh CW, Ratcliffe PJ.** Oxygen-regulated control elements in the phosphoglycerate kinase 1 and lactate dehydrogenase A genes: similarities with the erythropoietin 3' enhancer. USA : s.n., 1994, Vol. 91, págs. 6496-500.
156. **Kazuhiro K, Masaki K, Motoyuki K, Masatake T, Masayuki M, Kazuhiko M, Munechika E, Makoto N, and Ryoichi T.** Lactate dehydrogenase production in hepatocytes is increased at an early stage of acute liver failure. 2011, Vol. 2, págs. 195-199.
157. **LD, DeLeve.** Hepatic microvasculature in liver injury. 2007, Vol. 27, págs. 390-400.

158. **Chaparro M, Sanz- Cameno P, Trapero-MAruga M, Garcia- Buey L, Moreno-Otero R.** Mechanisms of angiogenesis in chronic inflammatory liver disease. 2007, Vol. 6, págs. 208-13.
159. **Gonzalez-Flecha B, Cutrin JC, Boveris A.** Time course and mechanism of oxidative stress and tissue damage in rat liver subjected to in vivo ischemia-reperfusion. 1993, Vol. 91, págs. 45-49.
160. **Albert Z, Rzucidlo Z, Starzyk H.** Biochemical and histochemical investigations of the gamma-glutamyl transpeptidase in embryonal and adult organs of man. 1970, Vol. 37, págs. 74-79.
161. **Albert Z, Rzucidlo Z, Starzyk H. Comparative biochemical and histochemical studies on the activity of gamma-glutamyl transpeptidase in the organs of fetuse, newborns and adult rats.** Comparative biochemical and histochemical studies on the activity of gamma-glutamyl transpeptidase in the organs of fetuse, newborns and adult rats. 1970, págs. 34-39.
162. **Kawamoto T, Matsuno K, Kayama F, Arashidani K, Yoshikawa M, Kodama Y.** The effect of ethylene glycol monomethyl ether and diethylene glycol monomethyl ether on hepatic gamma-glutamyl transpeptidase. 1992, Vol. 76, págs. 49-57.
163. **Lança AJ, Israel Y.** Histochemical demonstration of sinusoidal gamma-glutamyltransferase activity by substrate protection fixation: comparative studies in rat and guinea pig liver. 1991, Vol. 14, págs. 857-63.
164. **M., Tanaka.** Histochemical study on the activity of gamma-glutamyl transpeptidase in liver disease. 1978, págs. 651- 665.
165. **Iannaccone PM, Koizumi J.** Pattern and rate of disappearance of gamma-glutamyl transpeptidase activity in fetal and neonatal liver. 1983, Vol. 11, págs. 1312-1316.
166. **Lindros KO, Penttila KE, Janzen J-WG, Moorman AF'M, Speisky H, Israel Y.** The gamma-glutamyltransferase:glutamine synthetase activity ratio: a powerful marker for the acinar origin of hepatocytes. 1989, Vol. 8, págs. 338-343.
167. **Smith G, Peters T.** Analytical subcellular fractionation of rat liver with special reference to the localization of putative plasma membrane. 1980, Vol. 104, págs. 305-311.
168. **Szewczuk A, Milnerowicz H. Polosatov MV, Sobiech KA.** Immunofluorescent localization of gamma-glutamyl transferase in rat and bovine tissues. 1980, Vol. 66, págs. 152-159.
169. **Nishimura M, Stein H, Berges W. Teschke R.** Gamma-glutamyl transferase activity of liver plasma membrane: induction following chronic alcohol consumption. 1981, Vol. 99, págs. 142-148.
170. **Speisky H, Israel Y.** Gamma-glutamyl transferase ectoactivity in the intact rat liver: effect of chronic alcohol consumption. 1990, Vol. 7, págs. 339-347.

171. **Jaroslav Pejchal, Jan Osterreicher, Kamil Kuca, Daniel Jun, Jiri Bajgar, Jiri Kassa.** The Influence of Acetylcholinesterase Reactivators on Selected Hepatic Functions in Rats. 2008, Vol. 103, págs. 119-123.
172. **Kutty KM, Payne RH.** Serum pseudocholinesterase and verylow-density lipoprotein metabolism. 1994, Vol. 8, págs. 247-50.
173. **Kutty KM, Jacob JC, Hutton CJ, Davis PJ, Peterson SC.** Serum betalipoproteins: studies in a patient and in guinea pigs after the ingestion of organophosphorus compounds. 1975, Vol. 8, págs. 379-83.
174. **Rantala AO, Lilja M, Kauma H, Savolainen MJ, Reunanen A, Kesaniemi YA.** Gamma-glutamyl transpeptidase and the metabolic syndrome. 2000, Vol. 248, pág. 230.
175. *Morphologic and etiologic diagnosis from hepatic biopsies without clinical data.* **Baggentoss, AH.** 1966, Medicine, págs. 435-443.
176. *Formulation and application of a numeral scoring system for assessing histological activity in asymptomatic chronic active hepatitis.* **Knodell RG, Ishak KG, Black WC, Chen TS, Craig R, Kaplowitz N, et al.** 1981, Hepatology , págs. 431-5.
177. *The Metavir comparative study group. An algorithm for the grading of active chronic hepatitis C.* **Bedossa P, Poynard T.** 1996, Hepatology, págs. 289-293.
178. **K., Ley.** Molecular mechanisms of leukocyte recruitment in the inflammatory process. 1996, Vol. 32, págs. 733-42.
179. **Gressner AM, Bachem MG.** Cellular communications and cellmatrix interactions in the pathogenesis of fibroproliferative diseases: liver fibrosis as a paradigm. Paris : s.n., 1994, Vol. 52, págs. 205-26.
180. **AM., Gressner y 22:28–36.** Cytokines and cellular crosstalk involved in the activation of fat-storing cells. 1995, Vol. 22, págs. 28-36.
181. **Bernuau D, Rogier E, Feldmann G.** A quantitative ultrastructural analysis of the leukocytes in contact with hepatocytes in chronic active hepatitis, with a cytochemical detection of mononuclear phagocytes. 1982, Vol. 109, págs. 310-20.
182. —. In situ ultrastructural detection and quantitation of liver mononuclear phagocytes in contact with hepatocytes in chronic type B hepatitis. 1984, Vol. 51, págs. 667-74.
183. **French SW, Nash J, Shitabata P, et al.** Pathology of alcoholic liver disease. 1993, Vol. 13, págs. 154-69.

184. **Zakhari S, Li T-K.** Determinants of alcohol use and abuse: impact of quality and frequency patterns on liver disease. 2007, Vol. 46, págs. 2032-9.
185. **Zima T, Kalousova M.** Oxidative stress and signal transduction pathways in alcoholic liver disease. 2005, Vol. 29, págs. 110-5.
186. **Mezey E, Potter JJ, Rannie-Tankersely L, Caballera J, Pares A.** A randomized placebo controlled trial of vitam E for alcoholic hepatitis. 2004, Vol. 40, págs. 40-6.
187. —. A randomized placebo controlled trial of vitam E for alcoholic hepatitis. 2004, Vol. 40, págs. 40-6.
188. **Hirtz I, Mandrekar P, Velyudham A, et al.** The critical role of toll like receptor (TLR) 4 in alcoholic liver disease is independent of the common TLR adapter MyD88. 2008, Vol. 48, págs. 1224-31.
189. **Seth D, Gorrell MD, Cordoba S, et al.** Intrahepatic gene expression in human alcoholic hepatitis. 2006, Vol. 45, págs. 306-20.
190. **Banerjee A, Lee J-H, Ramaiah SK.** Interaction of osteopontin with neutrophil a4B1 and AqB1 integrins in a rodent model of alcoholic liver disease. 2008, Vol. 233, págs. 238-46.
191. **Ramaian SK, Jaeschke H.** Hepatic neutrophil infiltration in the pathogenesis of alcohol-induced liver injury. 2007, Vol. 17, págs. 431-40.
192. **Prichard MT, Nagy LE..** Ethanol-induced liver injury: potential roles for Egr-1. 2005, Vol. 29, págs. 146-50.
193. **Tsuji Y, Kumashiro R, Ishii K, et al.** Severe alcoholic hepatitis successfully treated by leukocytapheresis: a case report. 2003, Vol. 27, págs. 26-31.
194. **Wang MX, Morgan T, Lungo W, et al.** "Piecemeal" necrosis: renamed troxis necrosis. 2001, Vol. 71, págs. 137-46.
195. **Fernandez-Checa JC, Colell A, Mari M, et al.** Ceramide, tumor necrosis factor and alcohol-induced liver disease. 2005, Vol. 29, págs. 1515-75.
196. **Kaplowitz A (ALPHA), Ji C.** Unfolding new mechanisms of alcoholic liver disease in the endoplasmic reticulum. 2006, Vol. 21, págs. 57-9.
197. **Bleich S, Lenz B, Ziegenbein M, et al.** Epigenetic DNA hypermethylation of the HERP gene promoter induces down regulation of its mRNA expression in patients with alcohol dependance. 2006, Vol. 30, págs. 587-91.

198. **Oliva J, Dedes J, Li J, et al.** Epigenetics of proteasome inhibition in the liver of rats fed ethanol chronically. 2009, Vol. 15, págs. 705-12.
199. **Simpson, KJ.** Pathogenesis of alcoholic hepatic steatosis. 1996, págs. 363-370.
200. **Zatloukal K, French SW, Stumpter C, et al.** From Mallory Denk inclusion bodies: what, how and why?. 2007, Vol. 313, págs. 2033-40.
201. **Riley NE, Li J, Worrall S, et al.** 2002 y 72:17–23. The Mallory body as an aggresome: In vitro studies. 2002, Vol. 72, págs. 17-23.
202. *Microtubules are required for cytokeratin aggresome formation in hepatocytes (Mallory bodies) an in vitro study.* . **Riley NE, Bardag-Gorce F, Montgomery RO, et al.** 2003, Exp Molec Pathol., Vol. 74, págs. 173-9.
203. **Riley NE, Li J, McPhaul L, et al.** Heat shock proteins are present in Mallory bodies (cytokeratin aggresomes) in human liver biopsies. 2003, Vol. 74, págs. 168-74.
204. **Ohta M, Marceau N, Perry G, et al.** Ubiquitin is present on the cytokeratin intermediate filaments and Mallory bodies of hepatocytes. 1988, Vol. 58, págs. 848-56.
205. **McPhaul LW, Wang J, Hol EM, et al.** Molecular misreading of the ubiquitin B gene and hepatic Mallory body formation. 2002, Vol. 122, págs. 1878-85.
206. **Nan L, Wu Y, Bardag-Gorce F, et al.** p62 is involved in the mechanism of Mallory body formation. 2004, Vol. 77, págs. 168-75.
207. —. RNA interference of valosincontaining protein (VCP/p97) increases Mallory body formation. 2005, Vol. 78, págs. 1-9.
208. **Cadrin M, McFarlane-Anderson N, Aasheim N, et al.** Differential phosphorylation of CK8 and CK18 by TPA in primary cultures of mouse hepatocytes. 1992, Vol. 4, págs. 715-22.
209. **Kawahara H, Marceau N, French SW.** The excretory function in cultured hepatocytes containing Mallory bodies. 1989, Vol. 61, págs. 609-22.
210. **Kachi K, Wong P, French SW.** Molecular structural changes in Mallory body protein in human and mouse livers: an infrared spectroscopy study. 1993, Vol. 59, págs. 197-210.
211. **Depeint F, Bruce WR, Shangari N, Mehta R, O'Brien PJ.** Mitochondrial function and toxicity: role of the B vitamin family on mitochondrial energy metabolism. 2006, Vol. 163, págs. 94-112.
212. **John P. Higgins, MD, MPhil, Troy D. Tuttle, MS y and Christopher L. Higgins, BHMS.** Energy Beverages: Content and Safety. 2010, Vol. 85, págs. 1033-1041.

213. **A., Ba.** Metabolic and structural role of thiamine in nervous tissues. 2008, Vol. 28, págs. 923-931.
214. **Res., Lakshmi AV.** Riboflavin metabolism—relevance to human nutrition. 1998, Vol. 108, págs. 182-190.
215. **AA., Sauve.** NAD⁺ and vitamin B3: from metabolism to therapies. 2008, Vol. 324, págs. 883-893.
216. **Spinneker A, Sola R, Lemmen V, Castillo MJ, Pietrzik K, Gonzalez-Gross M.** Vitamin B6 status, deficiency and its consequences—an overview. 2007, Vol. 22, págs. 7-24.
217. **G.Elango, D.D.Venkataraman, S. Venkata Rao and V.S. Ravi Kiran.** Hypervitaminosis. 2015, Vol. 6, págs. 151-154.
218. **Steinke L, Lanfear DE, Dhanapal V, Kalus JS.** Effect of “energy drink” consumption on hemodynamic and electrocardiographic parameters in healthy young adults. 2009, Vol. 43, págs. 596-602.
219. **Baum M, Weiss M.** The influence of a taurine containing drink on cardiac parameters before and after exercise measured by echocardiography. 2001, Vol. 20, págs. 75-82.
220. **Ragsdale FR, Gronli TD, Batool N, et al.** Effect of Red Bull energy drink on cardiovascular and renal function. 2010, Vol. 38, págs. 1193-1200.
221. **Bosch J, Abrales J, Groszmann R.** Current management of portal hypertension. 2003, Vol. 1, págs. 54-68.
222. **Vargas V, Rimola A, Casanovas T, et al.** Applicability of liver transplantation in Catalonia at the end of the millennium. A prospective study of adult patient selection for liver transplantation. 2003, Vol. 16, págs. 270-5.
223. **2003, Friedman SL.** Liver fibrosis – from bench to bedside. Vol. 1, págs. 38-53.
224. **Bhathal P, Grossman H.** Reduction of the increased portal vascular resistance of the isolated perfused cirrhotic rat liver by vasodilators. 1985, Vol. 1, págs. 325-7.
225. **Morales-Ruiz M, Cejudo-Martin P, Fernandez-Varo G, et al.** Transduction of the liver with activated Akt normalizes portal pressure in cirrhotic rats. 2003, Vol. 125, págs. 522-31.
226. **Browning JD, Szczepaniak LS, Dobbins R, et al.** Prevalence of hepatic steatosis in an urban population in the United States: impact of ethnicity. 2004, Vol. 40, págs. 1387-95.

227. **Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M, et al.** Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. 2005, Vol. 41, págs. 1313-21.
228. **Puri P, Baillie RA, Wiest MM, et al.** A lipidomic analysis of nonalcoholic fatty liver disease. 2007, Vol. 46, págs. 1081-90.
229. **Donnelly KL, Smith CI, Schwarzenberg SJ, Jessurun J, Boldt MD, Parks EJ.** Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. 2005, Vol. 115, págs. 343-51.
230. **Reddy JK, Hashimoto T.** Peroxisomal beta-oxidation and peroxisome proliferator-activated receptor alpha: an adaptive metabolic system. 2001, Vol. 21, págs. 193-230.
231. **Ekstrom G, Ingelman-Sundberg M.** Rat liver microsomal NADPHsupported oxidase activity and lipid peroxidation dependent on ethanol-inducible cytochrome P-450 (P-450IIE1). 1989, Vol. 38.
232. **Hotamisligil GS, Peraldi P, Budavari A, Ellis R, White MF, Spiegelman BM.** IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF-alpha- and obesity-induced insulin resistance. 1996, Vol. 271, págs. 665-8.
233. **Balaban, R.S., Nemoto,S.F. and Finkel,T.** Mitochondria, oxidants and aging. 2005, Vol. 120, págs. 483-495.
234. **Berger, A.J. and Alford,K.** Cardiac arrest in a young man following excess consumption of caffeinated "energy drinks". 2009, Vol. 190, págs. 41-43.
235. **Huxtable, R.J.** Physiological actions of taurine. 1992, Vol. 72, págs. 101-163.
236. **O'Brien., Sergi Ferre´ and Mary Claire.** Alcohol and Caffeine: The Perfect Storm. 2011, Vol. 1.
237. **Attwood., Angela S.** Alcohol and caffeine: Caffeinated Alcohol Beverages: A Public Health Concern. 2012, Vol. 47, págs. 370-371.