



UNIVERSIDAD DE CUENCA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
CARRERA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA



“DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE AMONIO COMO MARCADOR BIOLÓGICO DE DAÑO HEPÁTICO EN PACIENTES ALCOHÓLICOS CRÓNICOS. CASOS Y CONTROLES”.

Trabajo de Titulación previo a la obtención del Título de Bioquímico Farmacéutico

AUTORES:

María Belén Calderón Rivera
C.I. 0104641931

Juan José Matute Pañora
C.I. 0106551872

DIRECTORA:

Dra. Ruth Eugenia Rosas Castro, Mgt.
C.I. 0101598753

ASESORA:

BQF. Diana Alexandra Barrera Parra
C.I. 0104132279

CUENCA – ECUADOR
2018



RESUMEN

El consumo excesivo de ETOH en la sociedad principalmente en el adulto joven, se considera un problema de salud pública, porque tiene un elevado impacto en la salud debido a sus consecuencias negativas, principalmente alteraciones metabólicas a nivel hepático; así como por los cambios en la personalidad que provoca, conllevando a problemas tanto familiares como en el entorno social.

En este estudio no experimental, de casos y controles, descriptivo; se determinó los niveles de NH_4^+ en sangre como marcador biológico de daño hepático en 30 pacientes alcohólicos crónicos del “CRA” de la ciudad de Cuenca, con respecto a un grupo control correspondiente a 30 estudiantes abstemios de ETOH de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad de Cuenca, mediante el método de microdifusión de Gilardoni y la técnica colorimétrica de uremia.

El análisis estadístico se trabajó con un nivel de confianza de 95% y α de 0.05. Se encontró una variación significativa entre las concentraciones de NH_4^+ en sangre de la población de estudio con respecto al grupo control con un valor de $p < 0.001$, así como también entre las concentraciones al inicio y al final del tratamiento de desintoxicación de la población de estudio con un valor de $p < 0.001$ y la asociación significativa entre la variable cantidad de ingesta con la concentración elevada de NH_4^+ . Por tanto, el estudio confirmó que el NH_4^+ actúa como un marcador biológico de daño hepático debido al consumo de ETOH en un tiempo mayor a 6 meses.

Palabras clave: Alcoholismo crónico, alcohol etílico, hígado, metabolismo hepático, amonio en sangre, enfermedades hepáticas.



ABSTRACT

The excessive consumption of ETOH in society mainly in the young adult, is considered a public health problem, because it has a high impact on health due to their negative consequences, mainly metabolic alterations at the level of the liver; as well as by changes in the personality that causes, leading to problems with both family members as in the social environment.

In this not experimental study, of cases and controls, descriptive; was determined levels of NH_4^+ in blood as a biological marker of liver damage in 30 chronic alcoholic patients of "CRA" of the city of Cuenca, with respect to a control group corresponding to 30 students abstemious of ETOH of the Faculty of Chemical Sciences of the University of Cuenca, through the microdiffusion method of Gilardoni and technique colorimetric of uremia.

The statistical analysis was worked with a confidence level of 95% and α of 0.05. It was found a significant variation between the concentrations of NH_4^+ in blood of the study population with respect to the control group with a value of $P < 0.001$, as well as between the concentrations at the beginning and at the end of the detoxification treatment of the study population with a value of $p < 0.001$ and a significant association between the variable amount of intake with the high concentration of NH_4^+ .

Key words: chronic alcoholism, ethyl alcohol, liver, hepatic metabolism, ammonium in blood, liver diseases.



ÍNDICE GENERAL

RESUMEN.....	2
ABSTRACT.....	3
ÍNDICE GENERAL.....	4
LISTA DE FIGURAS.....	7
LISTA DE TABLAS.....	9
LISTA DE ABREVIATURAS.....	10
LISTA DE ACRÓNIMOS.....	11
DEDICATORIA.....	16
DEDICATORIA.....	17
AGRADECIMIENTO.....	18
INTRODUCCIÓN.....	19
OBJETIVOS DEL ESTUDIO.....	21
Objetivo General:.....	21
Objetivos Específicos:.....	21
MARCO TEÓRICO.....	22
1. Hígado.....	22
1.1 Distribución zonal hepática.....	22
1.2 Función hepática.....	22
2. Alcohol etílico (ETOH).....	23
2.1 Metabolismo del ETOH.....	23
2.2 Efectos tóxicos causados por el ETOH.....	25
3. Alcoholismo.....	27
3.1 Factores asociados al alcoholismo.....	27
3.2 Clasificación del alcoholismo de acuerdo a los mililitros consumidos de ETOH por semana.....	28
3.3 Alcoholismo crónico.....	28
4. Amonio (NH_4^+), generalidades y metabolismo:.....	29



4.1 Metabolismo de aminoácidos.	29
4.2 Detoxificación del NH_4^+ mediante el ciclo de la urea.....	31
4.3. Relación del NH_4^+ con enfermedades hepáticas como marcador biológico de daño hepático y con relación al ETOH.	33
5. Enfermedades a causa del alcoholismo crónico:	34
5.1 Hepatopatía alcohólica.....	34
5.2 Factores de riesgo para el desarrollo de hepatopatías alcohólicas.....	35
5.3 Tratamiento general para la hepatopatía alcohólica.....	35
5.3.1 Abstinencia alcohólica.	35
MATERIALES Y MÉTODOS.....	36
1. Tipo de estudio:.....	36
2. Variables de estudio:.....	36
3. Muestreo:.....	39
4. Estandarización de la técnica para la determinación cuantitativa de NH_4^+ en sangre:	40
5. Identificación de las muestras y recolección de datos:	43
6. Condiciones que debe cumplir el paciente para la toma de muestra:.....	43
7. Condiciones para la toma y transporte de la muestra:	44
8. Métodos y técnicas de análisis:	44
8.1. Determinación de NH_4^+ en sangre-Método de microdifusión de Gilardoni: .	44
8.2. Determinación cuantitativa de amonio-Técnica colorimétrica de uremia: ...	45
9. Análisis estadístico:	46
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	47
1. Características generales de los grupos de estudio:.....	47
2. Resultados de las concentraciones de NH_4^+ ($\mu\text{g}/\text{dl}$) de la población de estudio al inicio y final de su tratamiento de desintoxicación, relación entre éstas y datos de las variables de estudio obtenidas de encuesta personal:.....	49
3. Asociación de las variables de estudio edad, cantidad y frecuencia de ingesta de ETOH con respecto a las concentraciones de NH_4^+ iniciales de la población de estudio:	53



4. Resultados de la determinación de la concentración de NH_4^+ ($\mu\text{g/dl}$) para grupo control:	54
5. Comparación de las concentraciones de NH_4^+ en sangre en la población de estudio, en dos periodos de tiempo (inicio y final del tratamiento de desintoxicación):	55
6. Comparación de las concentraciones de NH_4^+ en sangre entre la población de estudio al ingreso al “CRA” y al finalizar el tratamiento de desintoxicación y el grupo control:	56
7. DISCUSIÓN:	58
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	61
Conclusiones:	61
Recomendaciones:	62
REFERENCIAS	63
ANEXOS	66
Anexo 1:	66
Anexo 2:	78
Anexo 3:	82
Determinación cuantitativa de NH_4^+ en sangre-Método de Gilardoni, empleando los reactivos A y B del kit de uremia	82
4. Materiales, Equipos y Reactivos:	82
5. Cálculos para los resultados de NH_4^+ en sangre:	88
Anexo 4:	95
Equipos empleados en la Técnica para la Determinación de NH_4^+ en sangre.....	95
Complejo colorimétrico anaranjado correspondiente al precipitado de yoduro mercúrico formado en el proceso de microdifusión.	96
Resultados colorimétricos de muestras de pacientes de población de estudio al ingreso al “CRA” y al finalizar el tratamiento de desintoxicación.	97



LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Metabolismo del ETOH, Vía ADH, MEOS y catalasa. Fuente: Hígado y alcohol, Pérez & Castellano, 2012.	25
Figura 2. Metabolismo de Aminoácidos. Fuente: Principios de la Bioquímica Clínica y Patología Molecular, Hernández, 2014.	29
Figura 3. Transporte de nitrógeno al hígado tras el metabolismo de los aminoácidos en el músculo. Fuente: Fisiopatología de la enfermedad, MacPhee, 2015.	31
Figura 4. Esquema ciclo de la urea, se indica el número de nitrógenos que se elimina en cada compuesto. Fuente: Principios de la Bioquímica Clínica y Patología Molecular, Hernández, 2014.	33
Figura 5. Curva de calibración de las absorbancias de los estándares de NH_4^+ expresados en sangre para obtención de factor promedio. Fuente: Autores de trabajo de titulación.	42
Figura 6. Microdifusión de NH_4^+ en cámara de Conway. Fuente: Autores de trabajo de titulación.	45
Figura 7. Centrifuga (EBA 20) para la obtención del filtrado de la muestra desproteinizada.	95
Figura 8. Baño María (PRECISION) Thermo Fisher: empleado en el proceso de valoración de la muestra.	95
Figura 9. Espectrofotómetro Thermo Spectronic (GENESYS 20) empleado en la lectura de las absorbancias de las muestras.	96
Figura 10. Complejo colorimétrico anaranjado formado en el proceso de microdifusión.	96
Figura 11. Resultados colorimétricos de muestras de pacientes de la población de estudio al ingreso al “CRA”, con niveles de NH_4^+ dentro de los valores de referencia (muestra 1) y con niveles elevados (muestra 13 y 30).	97



Figura 12. Resultados colorimétricos de muestras de pacientes de población de estudio al finalizar el tratamiento de desintoxicación, con niveles de NH_4^+ dentro de los valores de referencia (muestra 1) y con niveles elevados (muestra 13 y 30). 97



LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación del alcoholismo.....	28
Tabla 2. Categorización de las variables.....	37
Tabla 3. Criterios de inclusión y exclusión de población de estudio y grupo control.	39
Tabla 4. Absorbancias de los estándares de NH_4^+	41
Tabla 5. Absorbancias de los estándares de NH_4^+ expresados en sangre.	41
Tabla 6. Características generales de la población de estudio y grupo control.	47
Tabla 7. Variables de estudio, concentraciones de NH_4^+ ($\mu\text{g/dl}$) de la población de estudio al inicio y final de su tratamiento de desintoxicación, relación CF/CI.....	49
Tabla 8. Asociación de las variables de estudio con la concentración de NH_4^+ inicial.	53
Tabla 9. Resultados de la determinación de la concentración de NH_4^+ ($\mu\text{g/dl}$) para grupo control.	54
<i>Tabla 10. Concentraciones de NH_4^+ inicio y final del tratamiento de desintoxicación de la población de estudio.</i>	56
Tabla 11. Concentraciones de NH_4^+ iniciales y finales de la población de estudio y grupo control.	57
Tabla 12. Materiales y Equipos empleados.....	82
Tabla 13. Procedimiento para obtención de absorbancias de estándar y muestra frente a un blanco de reactivos.	88
Tabla 14. Factores y Factor promedio de los estándares expresados en sangre.....	90
Tabla 15. Datos obtenidos en la encuesta personal de las características generales (variables) de la población de estudio.	91
Tabla 16. Datos obtenidos en la encuesta personal de grupo control.....	93



LISTA DE ABREVIATURAS

- Acetil-CoA= Acetilcoenzima A.
- AcH= Acetaldehído.
- ADH= Alcohol-deshidrogenasa.
- Ala= Alanina.
- ALDH= Enzima Aldehído-deshidrogenasa.
- ALDH-1= Enzima Aldehído-deshidrogenasa 1.
- ALDH-2= Enzima Aldehído-deshidrogenasa 2.
- ALT= Enzima Alanina aminotransferasa.
- ASL= Enzima Argininosuccinato-liasa.
- ASS= Enzima Argininosuccinato-sintetasa citoplasmática.
- AST= Aspartato-aminotransferasa.
- CHA= Cirrosis hepática alcohólica.
- CH= Cirrosis hepática.
- CoA= Coenzima A.
- CP= Enzima Carbamoil-fosfato.
- CPS- I= Enzima Carbamoil-fosfato-sintetasa I.
- CRA= Centro de Reposo y Adicciones.
- CYP2E1= citocromo P-2E1.
- EHA= Esteatosis hepática alcohólica.
- GDH= Glutamato-deshidrogenasa.
- GGT= Gamma-glutamil-transpeptidasa.
- GS= Glutamina-sintetasa.
- δ -GT= δ -Glutamiltransferasa.
- HA= Hepatitis alcohólica.
- 4-HNE= 4-hidroxinonal.



- H_2O_2 = Peróxido de hidrógeno.
- H_2SO_4 = Ácido sulfúrico.
- IK= Yoduro de Potasio.
- K_2CO_3 = Carbonato de Potasio.
- LDH= Lactato-deshidrogenasa.
- L-GDH= L-glutamato deshidrogenasa.
- MDA= Malonildialdehído.
- MEOS= Sistema microsomal oxidativo.
- NAD= Nicotinamida adenina dinucleótido.
- NADH= Nicotinamida adenina dinucleótido de hidrógeno.
- OH^- = Radical hidroxilo.
- OTC= Enzima Ornitina-transcarbamoilasa.
- O_2^- = Anión superóxido.
- Phe= Fenilalanina.
- pK_a = Constante de acidez.
- SAM-e= S-adenosilmetionina.
- Trp= Triptófano.
- Tyr= Tirosina.

LISTA DE ACRÓNIMOS

- ADN= Ácido desoxirribonucleico.
- ATP= Adenosin trifosfato.
- ETOH= Etanol.
- ml= mililitros.
- NH_4^+ = Ion amonio.
- OMS= Organización mundial de la salud.



CLAÚSULAS DE PROPIEDAD INTELECTUAL

María Belén Calderón Rivera, autora de la Tesis: " DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE AMONIO COMO MARCADOR BIOLÓGICO DE DAÑO HEPÁTICO EN PACIENTES ALCOHÓLICOS CRÓNICOS. CASOS Y CONTROLES", certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autora.

Cuenca, 28 de febrero de 2018.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'MBCR', written over a horizontal line.

María Belén Calderón Rivera

C.I: 0104641931



CLAÚSULAS DE PROPIEDAD INTELECTUAL

Juan José Matute Pañora, autor de la Tesis: " DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE AMONIO COMO MARCADOR BIOLÓGICO DE DAÑO HEPÁTICO EN PACIENTES ALCOHÓLICOS CRÓNICOS. CASOS Y CONTROLES", certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autor.

Cuenca, 28 de febrero de 2018.

Juan José Matute Pañora

C.I: 0106551872



CLÁUSULA DE LICENCIA Y AUTORIZACIÓN PARA PUBLICACIÓN EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL

María Belén Calderón Rivera en calidad de autora y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de "DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE AMONIO COMO MARCADOR BIOLÓGICO DE DAÑO HEPÁTICO EN PACIENTES ALCOHÓLICOS CRÓNICOS. CASOS Y CONTROLES", de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN reconozco a favor de la Universidad de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Asimismo, autorizo a la Universidad de Cuenca para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el repositorio institucional, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca, 28 de febrero de 2018.

María Belén Calderón Rivera

C.I: 0104641931



CLÁUSULA DE LICENCIA Y AUTORIZACIÓN PARA PUBLICACIÓN EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL

Juan José Matute Pañora en calidad de autor y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de "DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE AMONIO COMO MARCADOR BIOLÓGICO DE DAÑO HEPÁTICO EN PACIENTES ALCOHÓLICOS CRÓNICOS. CASOS Y CONTROLES", de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN reconozco a favor de la Universidad de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Asimismo, autorizo a la Universidad de Cuenca para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el repositorio institucional, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca, 28 de febrero de 2018.

Juan José Matute Pañora

C.I: 0106551872



DEDICATORIA

“No hay distancia que no se pueda recorrer, ni meta que no se pueda alcanzar”.

Este gran logro alcanzado en mi vida es primeramente para ese ser divino Dios, pues el sacrificio fue grande, pero él me ha dado la fortaleza y sabiduría para superar todos los obstáculos y lograr hoy mi meta profesional.

A mis padres y hermano, Joaquín, Lupe y Joaquín, les entrego hoy este logro porque son quienes han sido el pilar fundamental y el apoyo incondicional en todos los momentos importantes y difíciles de mi vida, me han enseñado todas los valores y la entrega, que me han permitido poder alcanzar mis metas y ser una persona de bien, por esto les doy las gracias.

MARÍA BELÉN CALDERÓN RIVERA



DEDICATORIA

El logro profesional que hoy he alcanzado es primero para Dios, quien me ha dado la fortaleza, paciencia y sabiduría para poder alcanzar mi meta.

A mis padres, Narcisa y José y a mis hermanos les entrego este logro porque han sido los que me han apoyado toda la etapa universitaria, me han inculcado valores como la responsabilidad y honestidad, con los que he podido cumplir lo que me he propuesto profesionalmente. Les doy las gracias por todo esto.

“La carrera no siempre la ganan los más veloces, sino los que siguen corriendo”.

JUAN JOSÉ MATUTE PAÑORA



AGRADECIMIENTO

El tiempo ha pasado, el camino para alcanzar nuestra meta ha sido largo, tortuoso y lleno de obstáculos, pero no lo hemos recorrido solos, más bien hemos estado acompañados de personas que han sido nuestra guía, que nos han brindado sus conocimientos, para poder lograr hoy este triunfo. Por esta razón, con una inmensa gratitud queremos agradecerle a la Dra. Rut Rosas castro, Mgt. y a la BQF. Diana Barrera, tutora y asesora de tesis, respectivamente, por el apoyo constante y habernos permitido conseguir nuestro propósito.

Así mismo queremos dar las gracias a la Psic. Martha Balladares, a la Dra. Fanny Sarmiento y a la Dra. Irene Sinchi, por la ayuda brindada, la entrega, la disposición, en toda la realización práctica de este estudio.

Eternamente agradecidos a tantas personas solidarias y generosas porque sin la ayuda de estos, el estudio no hubiese podido llegar a su fin y lograrse el objetivo planteado, por eso le agradecemos a la Dra. Zulma Zamora, encargada del laboratorio de atención al público de la Universidad de Cuenca y a todo el personal de dicho laboratorio y al Dr. Saúl Pacurucu Sarmiento, Director del Centro de Repos y Adicciones “CRA” y a todo el personal de dicho centro por la facilidad y apertura para la realización del estudio y poder hoy haber alcanzado nuestra meta profesional tan anhelada.

“Cuando la gratitud es tan absoluta las palabras sobran”.



INTRODUCCIÓN

El alcoholismo es un trastorno crónico de la conducta en el que una persona consume ETOH de forma excesiva, se considera un problema de salud pública, porque tiene un elevado impacto en la salud debido a sus consecuencias negativas, afectando principalmente al hígado. El hígado es el encargado de funciones tales como; detoxificación-excreción y metabólicas del organismo entre las que está el metabolismo nitrogenado. El NH_4^+ es un producto de dicho metabolismo específicamente de los aminoácidos. Los valores séricos de NH_4^+ elevados se presentan en casos de enfermedades hepáticas. Por lo tanto, se considera un marcador biológico de efecto de daño hepático tras el consumo excesivo de ETOH (Urdaneta, 2012).

Aumentos significativos de los niveles de NH_4^+ en sangre indican que el organismo no es capaz de metabolizar y eliminarlo correctamente. Por lo que, su determinación en pacientes alcohólicos crónicos contribuiría a la detección oportuna de una afección, patología o enfermedad hepática grave (Chawla, 2016).

Según estadísticas del año 2008 a nivel mundial la enfermedad hepática por ETOH es la octava causa de muerte. En Ecuador el número de casos notificados y tasa de incidencia anual de alcoholismo según regiones en la Sierra corresponde a 2309 casos que representa el 37,38%, observándose que mayor prevalencia se observa en la provincia del Azuay y particularmente la ciudad de Cuenca se encuentra entre las zonas de mayor consumo de ETOH en el país (Aguirre, 2011).

La causalidad entre el consumo excesivo de ETOH y el desarrollo de lesiones hepáticas es conocida desde hace siglos. El ETOH es considerado, actualmente una de las causas más frecuentes de cirrosis hepática y la segunda de trasplante hepático (TH) en el mundo (Lazarte, 2014).



Un estudio realizado en Perú, en 475 pacientes con diagnóstico de cirrosis hepática, reveló que en el 28% de los pacientes la causa fue la ingesta de ETOH, si tenía como antecedente una ingesta promedio mayor de 30 g/día. Así mismo en un estudio en Mexico, en pacientes con diagnóstico de cirrosis hepática, los resultados arrojaron que en el 95% de la población de estudio la principal causa de la cirrosis fue el alcoholismo. Es así; que en la enfermedad hepática cirrosis se observa con gran frecuencia la encefalopatía hepática como una complicación, las mismas que se encuentran relacionadas con concentraciones elevadas de NH_4^+ sérico (Bustíos, Dávalos & Román, 2014; Campollo, 2013).

Por tal razón, la presente investigación tuvo como propósito determinar y comparar en pacientes con alcoholismo crónico del Centro de Reposo y Adicciones “CRA” de la ciudad de Cuenca, los niveles de NH_4^+ como un marcador biológico de efecto de daño hepático con respecto a un grupo control, y con esto contribuir al diagnóstico para la detección oportuna y control de afecciones y complicaciones hepáticas graves.



OBJETIVOS DEL ESTUDIO

Objetivo General:

Establecer los niveles de NH_4^+ sérico como un marcador biológico de daño hepático causado por la excesiva ingesta de ETOH, en pacientes alcohólicos crónicos del “CRA” y comparar con grupo control.

Objetivos Específicos:

- Determinar los niveles de NH_4^+ en sangre, mediante el método de microdifusión de Gilardoni y la técnica colorimétrica de uremia, para su liberación y cuantificación, en la población de estudio al inicio y final del tratamiento de desintoxicación y en un grupo control.
- Caracterizar la población de estudio y control, con los datos obtenidos mediante encuesta personal.
- Asociar las variables obtenidas en encuesta personal con los valores de NH_4^+ de la población de estudio.
- Analizar los valores de NH_4^+ como marcador biológico de daño hepático, en pacientes alcohólicos del “CRA”, al comparar los valores inicio y final de tratamiento de desintoxicación.
- Comparar los niveles de NH_4^+ de la población de estudio y control, mediante análisis estadístico.



MARCO TEÓRICO

1. Hígado.

El hígado es un órgano situado en la cavidad abdominal, debajo del diafragma. Microscópicamente, el hígado está constituido por lobulillos con forma de prismas poliédricos limitados por tejido conjuntivo, vasos y conductos biliares.

Los principales tipos celulares del hígado son los hepatocitos responsables de sus funciones metabólicas, y las células de Kupffer, que forman el mayor sistema fagocítico fijo del organismo (Hernández, 2014; MacPhee, 2015; Mohan, 2012).

1.1 Distribución zonal hepática.

El flujo de sangre en los lobulillos hepáticos es centrípeto, de forma que la sangre más oxigenada de la arteria hepática y los nutrientes absorbidos por la vena porta circula hacia la vénula situada en el centro del lobulillo. Gracias a esto existe un gradiente de oxigenación y de concentración de hormonas y de metabolitos tóxicos, como el NH_4^+ . Así, la zona periportal está más oxigenada que la zona perivenosa. Los hepatocitos que rodean la arteria hepática tienen un metabolismo más oxidativo, con muchas mitocondrias, y más enzimas relacionadas con la gluconeogénesis, la eliminación de radicales libres y la ureagénesis. Esta zona, es rica en aminotransferasas, enzimas del ciclo de la urea, LDH y δ -GT. La zona perivenosa es menos oxigenada y sus hepatocitos tienen mucho retículo endoplásmico liso y abundantes enzimas relacionadas con la glucólisis, lipogénesis o la biotransformación de xenobióticos, pues se trata de una zona rica en enzimas, como la glutamina-sintetasa (GS) o la glutamato-deshidrogenasa (GDH) (Hernández, 2014; MacPhee, 2015; Mohan, 2012).

1.2 Función hepática.

El hígado es un órgano central del metabolismo que realiza numerosas funciones esenciales para la vida. A él llegan los aminoácidos, proteínas circulantes, sustancias



exógenas como el ETOH, hidratos de carbono, lípidos, vitaminas y minerales absorbidos en el intestino, para metabolizarlos, almacenarlos o distribuirlos al resto del organismo (Baynes, 2015; Hernández, 2014).

2. Alcohol etílico (ETOH).

El ETOH es un líquido incoloro y volátil de olor agradable, es la sustancia psicoactiva de mayor consumo en el mundo; constituye un producto extraño para el organismo humano, capaz de generar toxicidad, efectos adversos agudos y crónicos en la salud humana y muerte cuando es ingerido en cantidades excesivas. Existen evidencias que relacionan el abuso crónico del ETOH con enfermedades como: la esteatosis, cirrosis hepática (CH) con o sin encefalopatía y el síndrome de dependencia alcohólica (Menéndez & Mosquera, 2012 ; Pérez & Castellano, 2012 ; Téllez, 2013).

La vía de administración es la oral. El proceso de absorción gastrointestinal se inicia después de su ingestión en un período de dos a seis horas. Una vez absorbido, los tejidos donde se concentra en mayor proporción son: cerebro, sangre, ojo y líquido cefalorraquídeo (Menéndez & Mosquera, 2012 ; Téllez, 2013).

El 92-95% del ETOH absorbido realiza su proceso de biotransformación en el hígado, con una velocidad de 10 ml/hora. La velocidad de eliminación de este es aproximadamente 100 mg/kg/hora en un adulto de 70 kilos. (Menéndez & Mosquera, 2012 ; Téllez, 2013).

2.1 Metabolismo del ETOH.

El ETOH es rápidamente absorbido por el estómago y el intestino delgado, desde donde se distribuye por el agua corporal, alcanzando un pico de concentración a los 20-60 min. El 5% del ETOH es eliminado por los riñones, la piel y los pulmones y el resto es



metabolizado en el hígado, donde sufre dos procesos oxidativos que lo transforman primero en AcH y después en acetato. En el interior del hepatocito existen tres sistemas enzimáticos capaces de oxidar el ETOH a AcH (Caballería & Paés, 2010 ; Pérez & Castellano, 2012).

1. Sistema de la vía alcohol-deshidrogenasa (ADH): Es la principal vía de oxidación del ETOH y se localiza en el citosol. La ADH utiliza la NAD como cofactor y el hígado es su principal localización. Su actividad en la mucosa gástrica se encuentra disminuida en los gastrectomizados, por lo que en estas situaciones la ingesta de ETOH puede aumentar el riesgo de toxicidad hepática (Figura 1.) (Caballería & Paés, 2010 ; Pérez & Castellano, 2012).

2. Sistema microsomal oxidativo (MEOS): Localizado en el retículo endoplásmico del hepatocito, es el mecanismo principal cuando se encuentra saturada la capacidad de la ADH. El CYP2E1 es la fracción de este complejo inducible por el ETOH y su hipertrofia produce un exceso de radicales libres como: anión superóxido (O_2^-), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), radical hidroxilo (OH^\cdot) y un subsiguiente estrés oxidativo con daño al hepatocito (Figura 1.) (Caballería & Paés, 2010 ; Pérez & Castellano, 2012).

3. Vía de la catalasa: Se localiza en los peroxisomas y mitocondrias de los hepatocitos y la oxidación del etanol es mínimo, limitado por la cantidad de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) que genera esta reacción. El AcH presenta una segunda oxidación hepática dando acetato, el cual se incorpora al ciclo de Krebs en forma de Acetil-CoA. Dicha reacción es catalizada por la ALDH, con dos isoenzimas: una se localiza en el citosol y se activa cuando la concentración de AcH es elevada (ALDH-1); la otra en las mitocondrias y actúa en condiciones fisiológicas (ALDH-2) (Figura 1.) (Caballería & Paés, 2010 ; Pérez & Castellano, 2012).

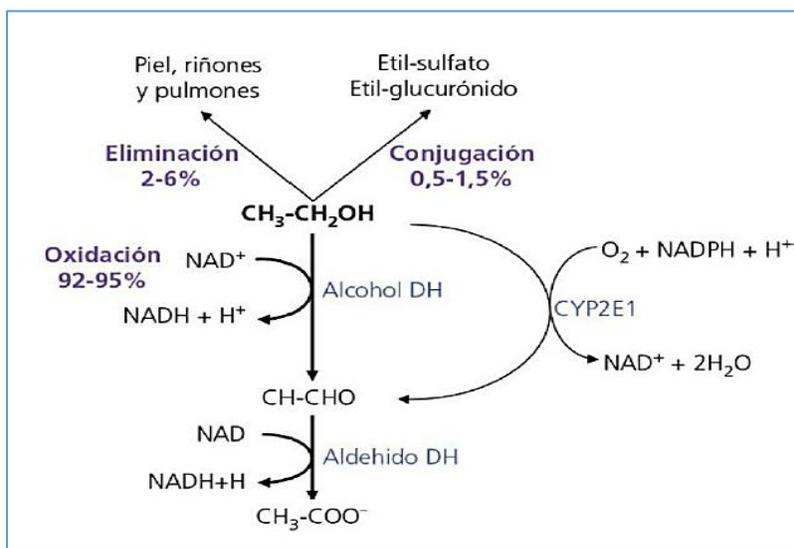


Figura 1. Metabolismo del ETOH, Vía ADH, MEOS y catalasa. Fuente: Hígado y alcohol, Pérez & Castellano, 2012.

2.2 Efectos tóxicos causados por el ETOH.

El principal efecto agudo del ETOH es la depresión del sistema nervioso central. Una concentración sanguínea de 0.3 g/L afecta la capacidad de conducción, concentraciones superiores a 3 g/L causan coma y superiores a 4 g/L son mortales. La concentración depende de diversos factores, como la cantidad y la velocidad a la cual se ingiere, o la tolerancia individual. El hígado es uno de los principales órganos afectados por el consumo crónico de ETOH, donde causa una lesión inicialmente reversible, pero que puede evolucionar a cirrosis hepática (Hernández, 2014).

Las alteraciones funcionales y morfológicas que provoca el ETOH en los hepatocitos se explican por las consecuencias de su metabolismo:

1. Formación de Ach: El Ach es el principal responsable de los efectos nocivos del ETOH en el hígado, estómago y cerebro. Entre los mecanismos tóxicos atribuidos al Ach se encuentran sus efectos sobre la permeabilidad intestinal y la translocación bacteriana,



así como su capacidad para formar aductos con proteínas intracelulares, como AcH-tubulina o AcH-actina. La unión del AcH a la tubulina altera el sistema de secreción celular de proteínas, reteniendo agua en el citosol, dando lugar al balonamiento y degeneración hídrica de la célula hepática, característicos de la hepatopatía alcohólica. El AcH también es tóxico para las mitocondrias, alterando la fosforilación oxidativa y la β -oxidación de los ácidos grasos. Por último, se ha demostrado que el AcH es capaz de estimular la fibrogénesis y la carcinogénesis (Caballería & Paés, 2010 ; Pérez & Castellano, 2012).

2. Desequilibrio redox: NAD/NADH: La oxidación del ETOH libera un H^+ , que es captado por la NAD, la cual se transforma en NADH. Cuando existe una sobrecarga de ETOH, se produce un exceso de NADH y un déficit de NAD. Este desequilibrio altera procesos metabólicos entre el más importante está la disminución de la β -oxidación de los ácidos grasos, aumentando su síntesis y la de α -glicerofosfato. Como consecuencia de ello, se sintetizan triglicéridos en exceso y se produce un hígado graso (Caballería & Paés, 2010 ; Pérez & Castellano, 2012).

3. Estrés oxidativo y lipoperoxidación lipídica: Durante el metabolismo del ETOH se produce un exceso de radicales libres de oxígeno y una disminución de los agentes antioxidantes fisiológicos. Estos radicales libres dañan el ADN y las proteínas esenciales para las células. Además, inician una reacción en cadena de peroxidación de los lípidos, que lleva al daño mitocondrial y a la muerte celular. Durante el proceso de lipoperoxidación se forman aldehídos como el MDA y el 4-HNE que activan al sistema inmunitario y estimulan la producción de citoquinas proinflamatorias que inducen la apoptosis y necrosis celular. Por otro lado, el ETOH disminuye el metabolismo de la metionina cuyo producto final es el glutatión, el cual actúa como agente antioxidante (Caballería & Paés, 2010 ; Pérez & Castellano, 2012).



3. Alcoholismo.

La OMS define que alcoholismo es la ingesta diaria de ETOH >70 gramos en hombres. Se considera una persona alcohólica aquella que consume más de dos tragos al día. Un trago se define como 12 onzas (350 ml) de cerveza, 5 onzas (150 ml) de vino o 1.5 onzas= 42.53 g. (45 ml) de licor fuerte (Organización Mundial de la Salud, 2012).

El alcoholismo se refiere a trastornos relacionados con el consumo inadecuado del ETOH. La Sociedad Americana de Medicina de las adicciones lo define como una “Enfermedad crónica principal con los factores de riesgos psicosociales genéticos y medioambientales, con frecuencia progresiva y mortal, caracterizada por un deterioro en el control de la bebida” (Fernández, 2016).

No existe una causa común conocida para la adicción, pero factores pueden desempeñar el papel importante para su desarrollo y existencias evidencias que una persona con padre o madre con alcoholismo tiene mayor probabilidad de adquirir esta enfermedad, por la presencia de genes que podrían aumentar el riesgo de alcoholismo (Aguirre, 2011).

3.1 Factores asociados al alcoholismo.

La ingesta exagerada de ETOH tiene factores condicionantes complejos (genéticos, psicológicos, sociales y económicos) y también efectos nocivos individuales y sociales, algunos son consecuencia de la ingesta aguda (accidentes, agresiones, inasistencia) y otros son por ingesta crónica donde se afectan varios órganos principalmente el hígado como consecuencia final es la cirrosis (Aguirre, 2011).



3.2 Clasificación del alcoholismo de acuerdo a los mililitros consumidos de ETOH por semana.

Tabla 1. Clasificación del alcoholismo.

Clasificación del alcoholismo según la OMS	
Tipo de consumidor	Consumo de ETOH por semana (ml)
Bebedor ligero	De 1 a 125 ml de alcohol puro a la semana.
Bebedor moderado	Hasta 500 ml de alcohol puro a la semana.
Bebedor de Alto riesgo	Hasta 700 ml de alcohol puro a la semana.
Bebedor excesivo (Alcoholismo)	A partir de 700 ml de alcohol puro a la semana.

Fuente: Alcohol y atención primaria de la salud, Organización Mundial de la Salud, 2012.

3.3 Alcoholismo crónico.

Se caracteriza por una dificultad psicológica habitual y repetida para controlar el consumo de bebidas alcohólicas. Una persona con esta adicción es altamente dependiente del ETOH y lo consume cada día a niveles altos; una persona se considera alcohólica crónica cuando el tiempo de consumo ha sido mayor a 6 meses. El Instituto Nacional del Abuso Alcohólico y Alcoholismo lo define como: "Trastorno de conducta crónico manifestado en una preocupación indebida por el ETOH y su uso, que deprime la salud física y mental,



por pérdida de control cuando se bebe y por una actitud autodestructiva en las relaciones con las personas y en el manejo de las situaciones vitales” (Naveillan, 2012).

4. Amonio (NH_4^+), generalidades y metabolismo:

El NH_4^+ es uno de los principales productos del metabolismo hepático, es el producto final del metabolismo nitrogenado (proteínas) y se forma por acción de las bacterias sobre las proteínas intestinales y por la hidrólisis renal de la glutamina. La mayor concentración se encuentra en la vena porta y normalmente se elimina el 80% durante su primer paso por el hígado. Se acumula en sangre si no se consigue eliminar del organismo de una manera adecuada.

Existen dos fuentes de NH_4^+ :

- 1) Metabolismo por la ureasa bacteriana de proteínas y aminoácidos que llegan al colon.
- 2) Actividad glutaminasa del epitelio duodenal (Baynes, 2015; Blanco, 2010).

4.1 Metabolismo de aminoácidos.

Los aminoácidos son los eslabones necesarios para la síntesis de proteínas. Además, desempeñan funciones esenciales en el organismo como precursores de neurotransmisores la fenilalanina o triptófano (Phe o Trp), formando parte del pigmento melanina como la tirosina (Tyr). De los 20 aminoácidos principales, ocho son esenciales y el resto pueden sintetizarse en el organismo.

El metabolismo de los aminoácidos comienza por la pérdida del grupo amino y la formación del cetoácido correspondiente por la acción de una enzima aminotransferasa, que emplea piridoxal-P como cofactor (Hernández, 2014).

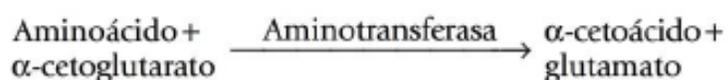


Figura 2. Metabolismo de Aminoácidos. Fuente: Principios de la Bioquímica Clínica y Patología Molecular, Hernández, 2014.



Como resultado de esta transaminación se forma el α -cetoácido correspondiente y una molécula de glutamato. Según el destino final del cetoácido, los aminoácidos pueden ser cetogénicos si producen cuerpos cetónicos, glucogénicos si producen intermediarios de la gluconeogénesis, o bien glucogénicos y cetogénicos si pueden producir ambos. Todos estos productos pueden emplearse como fuente de energía cuando entran en el ciclo de Krebs. En esta transaminación, el grupo amino del aminoácido pasa a formar parte de la molécula de glutamato, desde donde puede emplearse para la síntesis de nuevos aminoácidos u otros productos nitrogenados, o bien son transformados en urea para su excreción. Para ello, el glutamato es introducido en la mitocondria, donde sufrirá una desaminación oxidativa catalizada por la L-GDH, que vuelve a producir una molécula de α -cetoglutarato y libera una molécula de NH_4^+ . En el caso de los hepatocitos, este último entrará en el ciclo de la urea para producir urea, un compuesto nitrogenado mucho menos tóxico y que constituye la principal forma de excreción renal de los grupos aminos procedentes del catabolismo de los aminoácidos.

En los tejidos extrahepáticos no puede realizarse el ciclo de la urea, porque en ellos no se expresan todas las enzimas necesarias para completarlo. Por ello, el NH_4^+ producido en estos tejidos debe transportarse al hígado para ser detoxificado por los hepatocitos en el ciclo de la urea. Dada su elevada toxicidad, el NH_4^+ no puede viajar libremente en la sangre, por lo que lo hace formando parte del aminoácido glutamina. Para ello, una molécula de NH_4^+ se incorpora a una de glutamato, para dar lugar a glutamina. Esta reacción está catalizada por la enzima glutamina sintetasa (GS). La glutamina formada, al ser una molécula neutra, puede atravesar las membranas celulares mejor que el glutamato cargado negativamente. Una vez que la glutamina alcanza las mitocondrias de los hepatocitos, la enzima glutaminasa actúa sobre la glutamina, para dar lugar a una molécula de glutamato y otra de NH_4^+ . Aunque la glutamina es la principal forma de transporte de NH_4^+ desde los tejidos extrahepáticos al hígado, en el caso del músculo dicho transporte implica al aminoácido Ala, en el llamado ciclo glucosa-alanina. En este caso, el glutamato proveniente de la transaminación de los aminoácidos, sufre una nueva transaminación catalizada por la enzima ALT. (Hernández, 2014)

En este caso, el grupo amino se incorpora al piruvato procedente de la glucólisis para formar alanina y liberar α -cetoglutarato. Esta alanina se transportará al hígado, donde se produce la reacción inversa: la alanina cede el grupo amino al α -cetoglutarato, formándose de nuevo glutamato y piruvato. El glutamato sufrirá la desaminación oxidativa, el NH_4^+ liberado entrará en el ciclo de la urea y el piruvato actuará como precursor de la gluconeogénesis. (Hernández, 2014; MacPhee, 2015; Mohan, 2012)

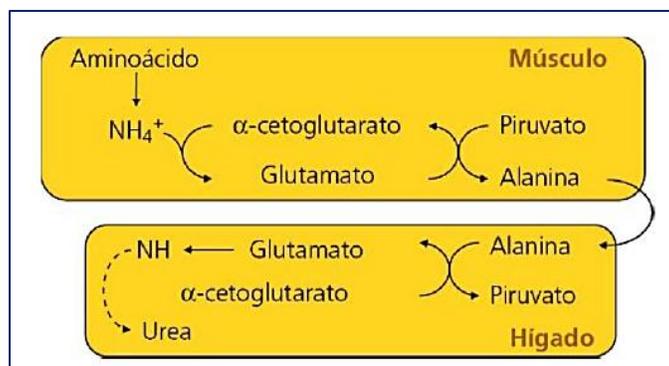


Figura 3. Transporte de nitrógeno al hígado tras el metabolismo de los aminoácidos en el músculo. Fuente: Fisiopatología de la enfermedad, MacPhee, 2015.

4.2 Detoxificación del NH_4^+ mediante el ciclo de la urea.

El ciclo de la urea es el único mecanismo eficaz para eliminar el NH_4^+ procedente del metabolismo de las proteínas, de la degradación de purinas y el producido en el intestino. La pK_a del NH_4^+ es de 9.5, por lo que, a un pH fisiológico, casi todo permanecerá como ion NH_4^+ . El ciclo de la urea completo se produce en el interior de los hepatocitos mediante cinco reacciones. Las dos iniciales son mitocondriales y las tres siguientes, citosólicas:

1. Dentro de las mitocondrias, la CPS- I cataliza la condensación dependiente de ATP entre el NH_4^+ y el bicarbonato, para producir CP.
2. Posteriormente, la OTC transfiere el grupo carbamoilo del carbamoil-fosfato a la ornitina, para formar citrulina, y libera fosfato.



3. La citrulina se libera al citoplasma, donde se condensa con el aspartato para formar argininosuccinato por la ASS, con consumo de ATP.
4. El argininosuccinato se hidroliza por la argininosuccinasa ASL, para formar arginina y fumarato, que puede entrar en el ciclo de Krebs.
5. Finalmente, la arginasa I hidroliza la arginina para formar urea y ornitina. Así pues, de los dos nitrógenos de la urea, uno proviene del NH_4^+ mitocondrial y otro, del aspartato.

La ornitina entra de nuevo a la mitocondria para iniciar otra vuelta del ciclo de la urea, a través de un transportador, del cual hay dos isoformas en el hígado, y que también transporta lisina, arginina y citrulina. La citrulina también puede difundir pasivamente hacia el citosol.

El ciclo de la urea afecta al equilibrio ácido-base por el consumo de bicarbonato y de NH_4^+ . El hígado es el único órgano en que se lleva a cabo el ciclo completo. Sin embargo, existe otra combinación funcional entre el intestino y el riñón, ya que en el intestino se expresan las enzimas mitocondriales NAGS, CPS- I y OTC, y en el riñón se expresan las enzimas citosólicas ASS, ASL y arginasa I. De esta forma, en el intestino se puede sintetizar hasta citrulina y en el riñón se completa el ciclo hasta la urea (Baynes, 2015; Hernández, 2014).

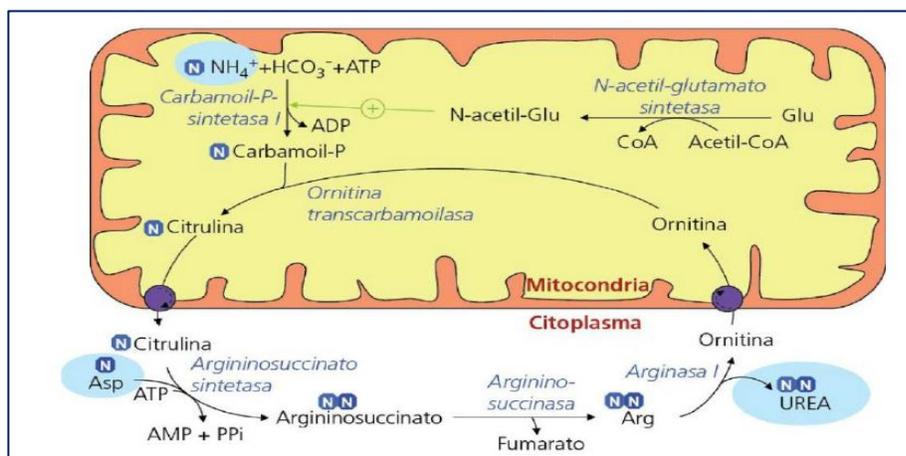


Figura 4. Esquema ciclo de la urea, se indica el número de nitrógenos que se elimina en cada compuesto. Fuente: Principios de la Bioquímica Clínica y Patología Molecular, Hernández, 2014.

4.3. Relación del NH_4^+ con enfermedades hepáticas como marcador biológico de daño hepático y con relación al ETOH.

El ETOH es metabolizado en el hígado, donde sufre dos procesos oxidativos que lo transforman primero en AcH, y después en acetato, que posteriormente mediante la CoA pasara a Acetil-CoA, que ingresara al ciclo de Krebs para dar lugar a sustancias inactivas como CO_2 y H_2O , cuando se encuentra saturada la capacidad de la ADH por ingesta excesiva de ETOH. El citocromo CYP2E1 es la fracción de este complejo inducible por el ETOH y su hipertrofia produce un exceso de radicales libres (O_2^- , H_2O_2 , OH^-), los radicales libres de oxígeno en exceso dañan el ADN y las proteínas esenciales para las células. Además, inician una reacción en cadena de peroxidación de los lípidos, que lleva al daño mitocondrial y a la muerte celular.

Por otro lado, el ETOH produce una disminución de sustancias antioxidantes, como el glutatión, consecuentemente con la oxidación de este se libera un H^+ , que es captado por la NAD, la cual se transforma en NADH. Cuando existe una sobrecarga de ETOH, se



produce un exceso de NADH y un déficit de NAD produciendo el desequilibrio metabólico y daño mitocondrial, provocando que el NH_4^+ no pueda seguir el ciclo de la urea y consecuentemente su acumulación en sangre (Hernández, 2014; Pérez & Castellano, 2012).

5. Enfermedades a causa del alcoholismo crónico:

5.1 Hepatopatía alcohólica.

La Hepatopatía alcohólica hace referencia desde una inflamación hasta una cirrosis hepática severa, en la edad adulta es causada por el consumo excesivo de ETOH (Aguirre, 2011; Llanque & Gutierrez, 2015).

La hepatopatía alcohólica se produce porque un 90% del ETOH ingerido es metabolizado en el hígado. Cuando este órgano ve superada su capacidad depuradora por una cantidad excesiva de ETOH y esta situación se prolonga en el tiempo, se producen lesiones hepáticas. Estas se deben básicamente a la acumulación de tóxicos y aumento de la oxidación en las células hepáticas (Fernández, 2015 ; Lazarte, 2014; Ruiz, 2012).

En la hepatopatía alcohólica se incluyen tres síndromes evolutivos: la EHA, HA y CHA, que se evidencian con elevaciones séricas de marcadores como el NH_4^+ . Se trata de tres entidades anatomoclínicas de las que la EHA representa la fase inicial, mientras que la HA y la CHA constituyen etapas más graves de la misma enfermedad con la presencia de complicaciones como la encefalopatía. En estas las alteraciones histológicas predominan en la zona 3 del lobulillo donde existe una mayor concentración de las enzimas que intervienen en el metabolismo hepático del ETOH (Llanque & Gutierrez, 2015; Pérez & Castellano, 2012 ; Ruiz, 2012).

Actualmente se sabe que la EHA aparece en el 90% de los individuos que abusan del ETOH, que un 10-35% de alcohólicos desarrollan HA y que solo el 8-20% llegan a desarrollar una CHA (Fernández, 2015 ; Lazarte, 2014).



5.2 Factores de riesgo para el desarrollo de hepatopatías alcohólicas.

La probabilidad de desarrollar enfermedad hepática progresiva inducida por ETOH no es completamente dosis-dependiente. Existen algunos factores de riesgo identificados que influyen en el desarrollo y la progresión de la enfermedad hepática (Caballería & Paés, 2010 ; Meléndez & González, 2012 ; Pérez & Castellano, 2012).

--Edad: La edad típica de presentación se encuentra alrededor de los 30 años de edad o incluso hasta los 40 años (Pérez & Castellano, 2012).

--La cantidad y tiempo de alcohol ingerido son los más importantes factores para el desarrollo de hepatopatía. El riesgo de progresar a cirrosis se incrementa con la ingestión de 70-80 gramos al día de alcohol por varios años en hombres (Lazarte, 2014).

--Tabaquismo: El consumo de cigarrillos también acelera la progresión de la fibrosis en sujetos con Hepatopatía alcohólica (Pérez & Castellano, 2012).

5.3 Tratamiento general para la hepatopatía alcohólica.

El tratamiento principal para la Hepatopatía alcohólica es la abstinencia alcohólica, además unas medidas generales y otras específicas como los suplementos nutricionales (Pérez & Castellano, 2012).

5.3.1 Abstinencia alcohólica.

Debe ser la primera medida terapéutica en todos los casos. Los largos periodos de abstinencia mejoran la evolución del daño hepático, disminuyen la presión portal, evitan la progresión a cirrosis y aumentar la supervivencia en cualquiera de los estadios de la hepatopatía alcohólica. Esta mejoría ocurre en la mayoría de casos después de tres meses de abstinencia (Heron & Murphy, 2014 ; Lazarte, 2014; Pérez & Castellano, 2012). Para prevenir debe administrarse tiamina (100 mg/día) y ácido fólico (1 mg/día), además de una benzodiacepina (diazepam o lorazepam) (Heron & Murphy, 2014 ; Lazarte, 2014).



MATERIALES Y MÉTODOS

1. Tipo de estudio:

El tipo de investigación fue no experimental, de casos y controles, descriptivo; se determinó los niveles de NH_4^+ en sangre como marcador biológico de daño hepático en pacientes varones alcohólicos crónicos del “CRA” de la ciudad de Cuenca, con respecto a un grupo control.

Las muestras fueron tomadas de 30 pacientes alcohólicos crónicos del “CRA”, tomando en cuenta los criterios de inclusión y exclusión (Tabla 3.).

Además, se trabajó con un grupo control de 30 estudiantes varones de la facultad de Ciencias Químicas de la Universidad de Cuenca, abstemios de ETOH y sin asociación a otras sustancias de hábito, considerando los criterios de inclusión y exclusión (Tabla 3.).

2. Variables de estudio:

En el estudio se trabajó con variables dependientes e independientes para la población de estudio, obtenidas mediante encuesta personal, y se encuentran categorizadas en la Tabla 2.

Tabla 2. Categorización de las variables.

VARIABLE DEPENDIENTE.				
Variable	Definición	Dimensión	Tipo	Categoría
Concentración de NH₄⁺.	Es el producto final del metabolismo proteico, será cuantificada en muestras de sangre tomadas de los pacientes del centro "CRA".	µg/dl	Cuantitativa (continua)	Valor de referencia: 20-75µg/dl
VARIABLES INDEPENDIENTES.				
Edad	Años vividos de la persona desde su fecha de nacimiento indicada en su cédula de identidad	Años	Cuantitativa (continua) Cualitativa (nominal)	Adulto joven: 18-30 años Adulto: 30-64 años
Lugar de procedencia.	Lugar de domicilio de la persona.	Parroquias de Cuenca.	Cualitativa (nominal)	Urbana Rural
Frecuencia de ingesta de ETOH.	Cuántos días a la semana una persona ingiere ETOH.	Días	Cuantitativa (continua)	1-7 días
Tiempo de tratamiento de desintoxicación	Tiempo que ha transcurrido desde la primera toma de muestra de sangre al	Meses	Cuantitativa (continua)	Meses: 1-3meses



		ingreso, hasta la segunda toma al finalizar el tratamiento de desintoxicación.			
Tiempo de ingesta ETOH.	de de	Tiempo que lleva una persona ingiriendo ETOH.	Meses	Cuantitativa (continua)	Meses Persona alcohólica aguda 1-6 meses. Persona alcohólica crónica > 6 meses.
Cantidad ingesta ETOH.	de de	Cantidad de ETOH que ha ingerido una persona.	Mililitros (ml)	Cuantitativa (continua) Cualitativa (nominal)	Bebedores ligeros: De 1 a 125 ml de alcohol puro a la semana. Bebedores moderados: Hasta 500 ml de alcohol puro a la semana. Bebedores altos (Alto riesgo): Hasta 700 ml de alcohol puro a la semana. Bebedores excesivos (Alcoholismo): A partir de 700 ml



				de alcohol puro a la semana.
Fuente: Autores de trabajo de titulación.				

3. Muestreo:

Las muestras tanto de la población de estudio como del grupo control se tomaron considerando los criterios de inclusión y exclusión (Tabla 3.).

Tabla 3. Criterios de inclusión y exclusión de población de estudio y grupo control.

Criterios de inclusión y exclusión para población de estudio.	
Criterio de inclusión	Criterios de exclusión
Pacientes con problemas de alcoholismo crónico, de edades entre 20-30 años, internados en el "CRA" de la ciudad de Cuenca por un período establecido de tres meses, sexo masculino, sin afecciones hepáticas como antecedente patológico y con previa aceptación de consentimiento informado.	Pacientes asociados a otras sustancias de hábito (tabaco, marihuana, cocaína, etc.)
	Pacientes que padezcan de enfermedades de los glóbulos rojos como, por ejemplo: procesos hemolíticos, como la anemia hemolítica.
	Pacientes que padezcan a más del alcoholismo crónico, una enfermedad coronaria como la hipertensión arterial esencial.
	Pacientes que padezcan una alteración a nivel renal.
	Pacientes con esfuerzo muscular intenso por actividad física.
	Pacientes con tratamiento farmacológico considerado como hepatotóxico.
Criterios de inclusión y exclusión para grupo control.	



Criterio de inclusión	Criterios de exclusión
Estudiantes de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad de Cuenca, sexo masculino, de edades entre 20-30 años, abstemios de ETOH y sin asociación a otras sustancias de hábito, sin afecciones hepáticas como antecedente patológico, con previa aceptación de consentimiento informado.	Pacientes asociados a otras sustancias de hábito (tabaco, marihuana, cocaína, etc.)
	Pacientes que padezcan de enfermedades de los glóbulos rojos como, por ejemplo: procesos hemolíticos, como la anemia hemolítica.
	Pacientes que padezcan a más del alcoholismo crónico, una enfermedad coronaria como la hipertensión arterial esencial.
	Pacientes que padezcan una alteración a nivel renal.
	Pacientes con esfuerzo muscular intenso por actividad física.
	Pacientes con tratamiento farmacológico considerado como hepatotóxico.
Fuente: Autores de trabajo de titulación.	

4. Estandarización de la técnica para la determinación cuantitativa de NH_4^+ en sangre:

La estandarización de la técnica para la determinación cuantitativa de NH_4^+ en sangre, se basó:

- a) Preparación estándares de NH_4^+ : Se preparó por duplicado estándares de concentraciones conocidas de 10, 20, 30, 40 y 60 $\mu\text{g/ml}$ de NH_4^+ según el Anexo 3 (punto 4.2. literales 6 y 7). Posteriormente se empleó el proceso de la técnica para estándar indicada en el Anexo 3 (punto 4.3.3. para Estándar (E)) y realizándose



las lecturas en el equipo espectrofotómetro a una longitud de onda de 640 nm, con las que se obtuvieron sus respectivas absorbancias indicadas en la (Tabla 4.)

Tabla 4. Absorbancias de los estándares de NH_4^+ .

Estándar de NH_4^+ ($\mu\text{g/ml}$)	Absorbancia (λ 640 nm.)		Promedio de las Absorbancias
10	0.024	0.023	0.024
20	0.048	0.052	0.050
30	0.072	0.073	0.073
40	0.092	0.094	0.093
60	0.131	0.128	0.129
Fuente: Autores de trabajo de titulación.			

- b) Determinación de la concentración del estándar óptimo expresado en sangre para obtención del factor, para el cálculo posterior de la concentración de NH_4^+ en sangre: Con las absorbancias obtenidas en el literal a, se calculó la concentración de los estándares expresados en sangre, indicado en el Anexo 3 (punto 5.1.). La (Tabla 5.) corresponde a las absorbancias de los estándares de NH_4^+ expresados en sangre.

Tabla 5. Absorbancias de los estándares de NH_4^+ expresados en sangre.

Estándar de NH_4^+ ($\mu\text{g/ml}$)	Absorbancia (λ 640 nm.)		Promedio de las Absorbancias
20	0.024	0.023	0.024
40	0.048	0.052	0.050



60	0.072	0.073	0.073
80	0.092	0.094	0.093
120	0.131	0.128	0.129

Fuente: Autores de trabajo de titulación.

- c) Se realizó la curva de calibración respecto a las absorbancias indicadas en la (Tabla 5.) y con esto se pudo estandarizar la técnica empleada, obteniéndose de esta un factor promedio, para la determinación de la concentración de NH_4^+ en la población de estudio y grupo control.

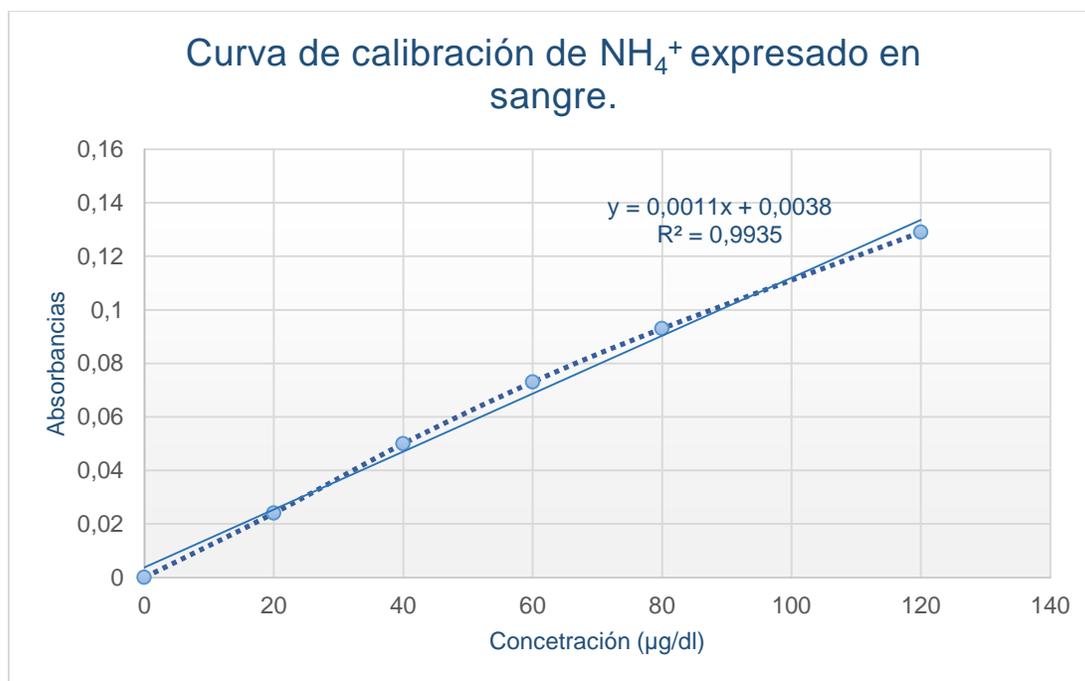


Figura 5. Curva de calibración de las absorbancias de los estándares de NH_4^+ expresados en sangre para obtención de factor promedio. Fuente: Autores de trabajo de titulación.

- d) El factor promedio se obtuvo considerando la media de los factores obtenidos de cada estándar de NH_4^+ expresado en sangre, que se encuentran detallados en el Anexo 3 (punto 5.2.).



- e) Se verificó que el factor promedio fue óptimo, mediante el análisis de 4 muestras; 3 muestras correspondientes a individuos sin antecedentes patológicos hepáticos y abstemios de ETOH y una muestra correspondiente a un individuo con diagnóstico de enfermedad hepática; para constatar si los individuos presentaban o no antecedentes patológicos se comprobó con previos exámenes médicos y de laboratorio. Obteniéndose 3 resultados entre los valores de referencia y uno por encima de estos, correspondiente a un paciente con enfermedad hepática mencionada anteriormente. Por tanto, el factor obtenido fue idóneo para la determinación de NH_4^+ en la población de estudio y grupo control.

5. Identificación de las muestras y recolección de datos:

Cada muestra fue identificada con un código numérico de acuerdo al orden de la toma de muestra, se trabajó por duplicado con la mitad de las muestras tomadas. Tanto para la población de estudio como para el grupo control se procedió a informar a cada paciente sobre dicho estudio, solicitar su colaboración y compromiso a través de una hoja de consentimiento informado (Anexo 1) y se realizó una encuesta (Anexo 2) para la recolección de datos importantes que correspondían a las características generales o variables en estudio (Tabla 2.).

6. Condiciones que debe cumplir el paciente para la toma de muestra:

- No realizar ninguna actividad física (trotar, ejercicios) antes de la toma de muestra.
- El paciente debe estar en ayuno de 8-12 horas.
- Si está tomando algún medicamento, debe informar en la toma de la muestra el nombre y la dosis que está tomando.



7. Condiciones para la toma y transporte de la muestra:

-La muestra de sangre fue tomada en un tubo con desproteinizante, exenta de anticoagulante, y transportada a temperatura de refrigeración (2 a 8°C), hasta su posterior análisis en el laboratorio de la Facultad de Ciencias Químicas y el de atención al público de la Universidad de Cuenca. Cabe recalcar además que el NH_4^+ es estable por 24 horas a -18°C.

-En el momento de la toma de muestra el torniquete se colocó el menor tiempo posible para evitar que haya contracción muscular que provoque una liberación mayor de NH_4^+ en sangre, y generen elevaciones falsas de los resultados.

-La muestra de sangre fue tomada de tal manera que se evite hemólisis. (Pontificia Universidad Javeriana Bogotá, 2015)

8. Métodos y técnicas de análisis:

8.1. Determinación de NH_4^+ en sangre-Método de microdifusión de Gilardoni:

Fundamento:

Se basó en la desproteinización inmediata de la sangre extraída en una solución bufferada de cloruro de mercurio y acetato de plomo, deteniéndose así el proceso de formación de amoníaco in vitro. De este modo se obtuvo un centrifugado libre de compuestos nitrogenados capaces de originar NH_4^+ por acción del álcali en la difusión y el sobrenadante límpido de la centrifugación. Se empleó la microdifusión en cámara de Conway que es un recipiente cerrado que dispone en su interior de dos compartimentos, un exterior para la muestra problema (centrifugado libre de compuestos nitrogenados) y agentes liberantes (K_2CO_3 y IK) y un interno para el reactivo absorbente o fijante (H_2SO_4 0.005 N). Se basó que al hacer hermética la cámara se estableció una corriente del producto volátil (NH_4^+) desde el área de su liberación hacia la de su fijación; producida por las diferencias de tensión del producto volátil en ambas superficies (Figura 6.). El producto

fijado (NH_4^+) se valoró mediante una técnica colorimétrica de uremia (Lóvine y Selva, 2000).

Los reactivos empleados, el procedimiento y cálculos se detallan en la sección de anexos. (Anexo 3., punto 4. y 5.).

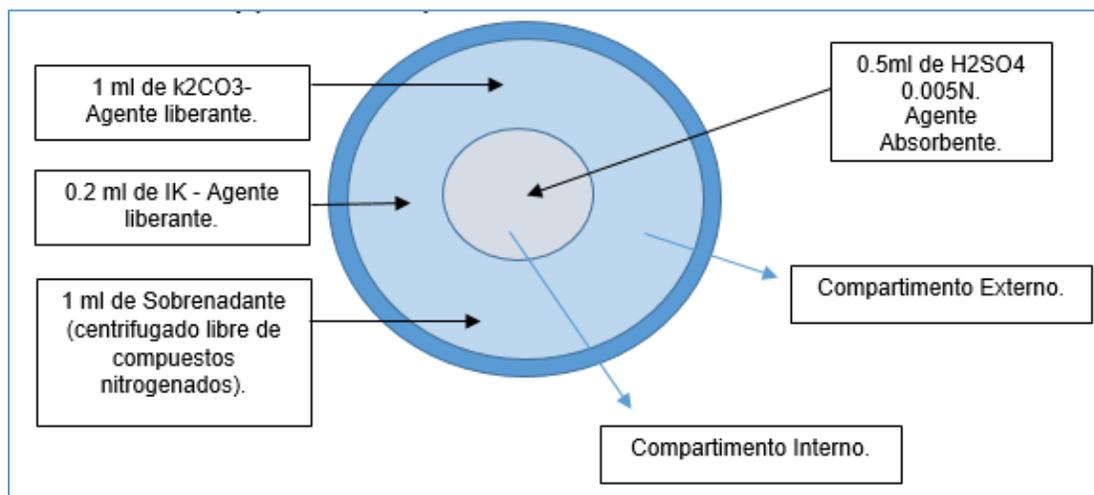


Figura 6. Microdifusión de NH_4^+ en cámara de Conway. Fuente: Autores de trabajo de titulación.

8.2. Determinación cuantitativa de amonio-Técnica colorimétrica de uremia:

Técnica:

El NH_4^+ liberado por microdifusión de la técnica especificada anteriormente, reaccionó con fenol (Reactivo A) e hipoclorito de sodio (Reactivo B) en medio alcalino produciéndose azul de indofenol que se determinó colorimétricamente, que fue leído en espectrofotómetro a una longitud de onda de 640 nm (Wiener Lab, 2016).

Una vez obtenida la absorbancia a 640 nm, se realizaron los cálculos correspondientes para obtención de las concentraciones de NH_4^+ en sangre ($\mu\text{g}/\text{dl}$) para la población de estudio al inicio y al final del tratamiento de desintoxicación como para el grupo control (Anexo 3., punto 5.2. y 5.3.).



Los reactivos empleados, el procedimiento y cálculos se detallan en la sección de anexos. (Anexo 3., punto 4. y 5.).

9. Análisis estadístico:

Los datos obtenidos tanto de la población de estudio como del grupo control fueron procesados y almacenados con la confidencialidad que corresponda en el margen de la ética.

El análisis estadístico del estudio constó de diferentes puntos, se trabajó con un nivel de confianza del 95% con un valor de probabilidad $p < 0.05$.

El análisis estadístico se desarrolló en el programa estadístico SPSS v23. Se realizó un análisis descriptivo con las variables correspondientes a la población de estudio y del grupo control; estableciendo frecuencias y porcentajes.

Se realizó una asociación entre las características generales de la población de estudio y las concentraciones de NH_4^+ inicial, mediante una regresión lineal múltiple.

Para la comparación de las concentraciones de NH_4^+ en sangre entre la población de estudio y el grupo control se empleó la prueba estadística T de student para muestras independientes o no pareadas.

Para la comparación de las concentraciones de NH_4^+ en sangre de la población de estudio al ingreso y al final del tratamiento de desintoxicación se empleó la prueba estadística T de student para muestras relacionadas o pareadas, en un tamaño de muestra ($n=30$).



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Características generales de los grupos de estudio:

Se trabajó con 30 pacientes masculinos, alcohólicos crónicos, internados en el “CRA”, y 30 estudiantes masculinos abstemios de ETOH de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad de Cuenca como grupo control; las características generales se detallan a continuación en la Tabla 6.

Tabla 6. Características generales de la población de estudio y grupo control.

VARIABLES		POBLACIÓN DE ESTUDIO		GRUPO CONTROL	
		n = Número de pacientes (30)	Porcentaje (%)	n = Número de pacientes (30)	Porcentaje (%)
Procedencia	Urbana	12	40	10	33.3
	Rural	18	60	20	66.7
Edad	18-30 Adulto joven	17	56.7	21	70
	31-64 Adulto	13	43.3	9	30
Cantidad de ingesta de ETOH (ml).	1-2 vasos (1 vaso= 200ml)	4	13.3		
	3-4 vasos (1 vaso= 200ml)	9	30		
	1 botella (750ml)	9	30		
	2 botellas (1 botella)	8	26.7		



	=750ml)			
Frecuencia de ingesta de ETOH.	2 días a la semana	14	46.7	
	3 días a la semana	6	20	
	4 días a la semana	8	26.7	
	Todos los días	2	6.7	
Fuente: Datos obtenidos del programa estadístico SPSS V23.				

De acuerdo a la apreciación de la Tabla 6, se pudo observar que, en las características de la población de estudio, en la variable procedencia el 40% pertenecían a las parroquias urbanas y el 60 % a las parroquias rurales de la ciudad de Cuenca, y con respecto a la edad, el 56.7 % fueron pacientes entre 18-30 años de edad considerados como adultos jóvenes mientras que el 43.3% entre 31-64 años de edad considerados como adultos y en cuanto al grupo control el 33.3% de los pacientes eran procedentes de las parroquias urbanas, mientras que el 66.7% de las parroquias rurales y un 70 % correspondía a edades entre 18-30 años de edad (adulto joven) y el 30 % correspondía a pacientes entre 31-64 años de edad (adultos). El tiempo de ingesta de ETOH del total de la población de estudio era mayor a 6 meses considerándose según la OMS como bebedores excesivos (alcohólicos crónicos); con respecto a la variable cantidad de ingesta, un 30 % consumían 3-4 vasos de ETOH y un porcentaje similar a lo anterior (30%) consumían 1 botella, así mismo se valoró la frecuencia de ingesta evidenciándose que el 46.7 % de pacientes ingerían 2 veces a la semana.



2. Resultados de las concentraciones de NH_4^+ ($\mu\text{g}/\text{dl}$) de la población de estudio al inicio y final de su tratamiento de desintoxicación, relación entre éstas y datos de las variables de estudio obtenidas de encuesta personal:

Tabla 7. Variables de estudio, concentraciones de NH_4^+ ($\mu\text{g}/\text{dl}$) de la población de estudio al inicio y final de su tratamiento de desintoxicación, relación CF/CI.

CÓDIGO DEL PACIENTE	EDAD	PROCEDENCIA	CANTIDAD DE INGESTA DE ETOH. (ml)	FRECUENCIA DE INGESTA DE ETOH.	CONCENTRACIONES DE AMONIO ($\mu\text{g NH}_4^+/\text{dl}$ sangre) INICIO	CONCENTRACIONES DE AMONIO ($\mu\text{g NH}_4^+/\text{dl}$ sangre) FINAL	Relación CF/CI
01	37	Rural	3-4 vasos (1 vaso=200ml)	3 días a la semana	70.90	66.23	0.93
02	35	Rural	1-2 vasos (1 vaso=200ml)	2 días a la semana	45.00	38.21	0.85
03	24	Urbana	2 botellas (1 botella =750ml)	2 días a la semana	86.61*	79.39*	0.92
04	29	Rural	1-2 vasos (1 vaso=200ml)	2 días a la semana	47.55	46.70	0.98
05	37	Urbana	1 botella (750ml)	2 días a la semana	76.00*	71.32	0.94



06	32	Rural	3-4 vasos (1 vaso= 200ml)	2 días a la semana	76.42*	73.87	0.97
07	28	Rural	3-4 vasos (1 vaso= 200ml)	2 días a la semana	53.07	48.39	0.91
08	36	Rural	3-4 vasos (1 vaso= 200ml)	2 días a la semana	55.19	50.09	0.91
09	30	Rural	2 botellas (1 botella =750ml)	2 días a la semana	80.67*	77.26*	0.96
10	31	Rural	3-4 vasos (1 vaso= 200ml)	2 días a la semana	71.33	67.93	0.95
11	25	Rural	1-2 vasos (1 vaso= 200ml)	2 días a la semana	62.41	60.71	0.97
12	34	Urbana	1 botella (750ml)	3 días a la semana	83.21*	79.81*	0.96
13	33	Urbana	2 botellas (1 botella =750ml)	4 días a la semana	112.93*	110.81*	0.98
14	37	Urbana	1 botella (750ml)	todos los días	113.78*	110.38*	0.97
15	27	Rural	1 botella (750ml)	4 días a la semana	93.40*	87.89*	0.94
16	20	Urbana	1 botella (750ml)	3 días a la semana	82.37*	79.82*	0.97



17	35	Urbana	3-4 vasos (1 vaso= 200ml)	3 días a la semana	73.45	73.02	0.99
18	32	Urbana	2 botellas (1 botella =750ml)	4 días a la semana	131.62*	116.36*	0.88
19	34	Rural	3-4 vasos (1 vaso= 200ml)	3 días a la semana	71.33	69.20	0.97
20	37	Rural	2 botellas (1 botella =750ml)	4 días a la semana	116.33*	111.23*	0.96
21	23	Rural	1 botella (750ml)	todos los días	110.39*	102.32*	0.93
22	21	Urbana	2 botellas (1 botella =750ml)	2 días a la semana	84.91*	82.36*	0.97
23	27	Urbana	1 botella (750ml)	4 días a la semana	75.15*	73.87	0.98
24	21	Urbana	3-4 vasos (1 vaso= 200ml)	2 días a la semana	67.08	52.65	0.78
25	20	Rural	2 botellas (1 botella =750ml)	4 días a la semana	126.94*	118.45*	0.93
26	28	Rural	1-2 vasos (1 vaso= 200ml)	2 días a la semana	47.55	40.76	0.86
27	26	Rural	1 botella (750ml)	3 días a la semana	84.06*	75.15*	0.89



28	20	Rural	3-4 vasos (1 vaso= 200ml)	2 días a la semana	69.63	64.53	0.93
29	21	Rural	2 botellas (1 botella =750ml)	4 días a la semana	105.29*	101.89*	0.97
30	30	Urbana	1 botella (750ml)	4 días a la semana	80.67*	73.67	0.91
							Promedio= ±0.94
*Paciente que presenta un valor de NH₄⁺ superior a los de referencia.							
Fuente: Autores de trabajo de titulación.							

De acuerdo a la Tabla 7, se observa las variables, las concentraciones de NH₄⁺ iniciales y finales de la población de estudio y la relación entre éstas, indicándonos que existió una disminución de un valor promedio de ± 0.94 entre la concentración inicial con la final de cada paciente.



3. Asociación de las variables de estudio edad, cantidad y frecuencia de ingesta de ETOH con respecto a las concentraciones de NH_4^+ iniciales de la población de estudio:

Se aplicó la prueba estadística de regresión lineal múltiple para establecer cuál de las variables obtenidas por encuesta personal se asociaban directamente con la concentración de NH_4^+ inicial en la población de estudio.

Tabla 8. Asociación de las variables de estudio con la concentración de NH_4^+ inicial.

Variable de estudio	Coficiente	Valor de p	Intervalo de confianza
EDAD	-0.185	0.496	-0.734; 0.365
CANTIDAD DE INGESTA DE ETOH (ml).	0.012	< 0.001	0.009; 0.015
FRECUENCIA DE INGESTA DE ETOH.	0.843	0.754	-4.637; 6.322
R= 0.872			

De acuerdo a la Tabla 8, la variable cantidad de ingesta de ETOH (ml) estuvo directamente relacionada con la concentración de NH_4^+ y esta asociación fue estadísticamente significativa ($p < 0.001$), de acuerdo al coeficiente obtenido, por cada unidad de ingesta (ml) se incrementó en 0.012 unidades la concentración de NH_4^+ , además de un valor de $R = 0.872$ indicando que existió una buena correlación entre la cantidad de ingesta de ETOH y la concentración inicial de NH_4^+ .



4. Resultados de la determinación de la concentración de NH_4^+ ($\mu\text{g/dl}$) para grupo control:

Tabla 9. Resultados de la determinación de la concentración de NH_4^+ ($\mu\text{g/dl}$) para grupo control.

Código del paciente	Concentraciones de ($\mu\text{g NH}_4^+$ /dl sangre)
01	50.53
02	49.25
03	64.96
04	36.51
05	50.53
06	67.08
07	32.27
08	28.02
09	42.04
10	47.55
11	40.34
12	30.57
13	50.95
14	52.65
15	22.51
16	48.40
17	53.92
18	22.93



19	51.38
20	47.55
21	33.12
22	27.17
23	64.96
24	67.93
25	51.38
26	33.97
27	53.92
28	45.85
29	39.06
30	51.80
Fuente: Autores de trabajo de titulación.	

5. Comparación de las concentraciones de NH_4^+ en sangre en la población de estudio, en dos periodos de tiempo (inicio y final del tratamiento de desintoxicación):

Para la comparación de las concentraciones de NH_4^+ en sangre en los alcohólicos crónicos del "CRA" al inicio y final de su tratamiento de desintoxicación, se aplicó la prueba T de student para muestras relacionadas, se trabajó con un nivel (α) del 5% que en decimal es 0.05 y por tanto con un intervalo de confianza para la media del 95%.



Tabla 10. Concentraciones de NH_4^+ inicio y final del tratamiento de desintoxicación de la población de estudio.

Variables	Media	Desviación estándar	Mínimo Máximo
Concentración de NH_4^+ inicial en sangre ($\mu\text{g}/\text{dl}$) n=30	81.84	23.3	45.0 131.62
Concentración de NH_4^+ final en sangre ($\mu\text{g}/\text{dl}$) n=30	76.84	22.5	38.21 118.45
<u>p-valor < 0.001</u>			
Fuente: Datos obtenidos del programa estadístico SPSS V23.			

De acuerdo a la apreciación de la Tabla 9, se pudo observar que los valores de las medias de las concentraciones de NH_4^+ iniciales y finales, mostraron una disminución significativa de acuerdo al valor de p obtenido ($p < 0.001$). Por lo que, al existir diferencia entre las concentraciones se evidenció que el tratamiento de desintoxicación influyó de cierta manera a mejorar la función hepática evidenciándose en la disminución de NH_4^+ en sangre, sin embargo, estos valores no se acercaban a los valores de referencia.

6. Comparación de las concentraciones de NH_4^+ en sangre entre la población de estudio al ingreso al “CRA” y al finalizar el tratamiento de desintoxicación y el grupo control:

Para la comparación de las concentraciones de NH_4^+ en sangre entre los alcohólicos crónicos del “CRA” y el grupo control se aplicó la prueba T de student para muestras



independientes, se trabajó con un nivel (α) del 5% que en decimal es 0.05. Por tanto, con un intervalo de confianza para la media del 95%.

Tabla 11. Concentraciones de NH_4^+ iniciales y finales de la población de estudio y grupo control.

Variables	Media	Desviación estándar	Mínimo Máximo
Concentración de NH_4^+ en grupo control ($\mu\text{g/dl}$) n=30	44.97	12.6	22.51 67.93
Concentración de NH_4^+ inicial en población de estudio ($\mu\text{g/dl}$) n=30	81.84	23.3	45.0 131.62
Concentración de NH_4^+ final en población de estudio ($\mu\text{g/dl}$) n=30	76.84	22.5	38.21 118.45
<u>p-valor < 0.001</u>			
Fuente: Datos obtenidos del programa estadístico SPSS V23.			

De acuerdo a la apreciación de la Tabla 10, se pudo observar que los valores de las medias de las concentraciones de NH_4^+ iniciales y finales de la población de estudio con respecto a las del grupo control, mostraron una diferencia significativa por el valor de p obtenido ($p < 0.001$); observándose que las concentraciones del grupo control estaban dentro de los valores de referencia mientras que las concentraciones de los pacientes alcohólicos crónicos, independientemente iniciales o finales se encontraban superiores a los valores de referencia.



7. DISCUSIÓN:

El ETOH al ser consumido de manera continua produce efectos adversos sobre todo la toxicidad hepática, cuando sobrepasan los valores permitidos por la OMS.

En el alcoholismo crónico a nivel del metabolismo hepático se produce una disminución del NAD, esto conlleva a un exceso de NADH que provoca un desequilibrio en reacciones metabólicas dando como lugar hiperuricemia y la disminución de la β -oxidación de los ácidos grasos produciéndose un hígado graso.

Por otro lado, el ETOH produce una disminución de sustancias antioxidantes, como el glutatión, que es importante para la neutralización de radicales libres que provocan daño al ADN y a la mitocondria; además el AcH producto de la oxidación es tóxico para las mitocondrias, y capaz de estimular la fibrogénesis y carcinogénesis.

El NH_4^+ sigue el ciclo de la urea, como mecanismo de detoxificación, que se encuentra alterado en el alcoholismo crónico, afectándose las reacciones mitocondriales y citosólicas a nivel del hepatocito, por tal razón el NH_4^+ no puede ser eliminado y puede verse reflejado con concentraciones elevadas en sangre.

En este estudio se obtuvo que, de las características generales de la población de estudio obtenidas mediante encuesta personal, el mayor porcentaje de pacientes fueron de procedencia rural, entre las edades de mayor predominio se encontró que fueron pacientes entre 18-30 años de edad considerados como adultos jóvenes, con respecto a la cantidad de ingesta, un mayor predominio de pacientes consumían 800 ml. De acuerdo a estos resultados se pudo establecer que la zona rural de la ciudad de Cuenca, así mismo que los adultos jóvenes tienen elevado índice de consumo de ETOH, por último, según la OMS cuando la cantidad de ingesta es mayor a 700ml se considera que la persona es un bebedor excesivo considerándose un alcohólico crónico; como el total de la población de estudio ingerían esta cantidad o más, se confirmó que eran alcohólicos crónicos. Dentro de las características generales del grupo control para poder realizar un estudio de casos controles este grupo cumplió con características similares a la población de estudio.



Por otra parte, existen factores de riesgo descritos por la OMS como la cantidad de ETOH mayor a los 700 ml por semana y el tiempo de consumo mayor a los 6 meses que influyen en el desarrollo y la progresión de la enfermedad hepática. De acuerdo a la literatura las personas con una edad comprendida entre los 30 o 40 años, son propensos a presentar en mayor prevalencia hepatopatías a causa de consumo de ETOH (OMS, 2012). Evidenciándose que, de estos factores mencionados únicamente en el estudio realizado, la cantidad de ingesta (ml) estaba asociada de manera significativa y directamente al incremento de las concentraciones de NH_4^+ .

Existen evidencias de estudios realizados en distintos países, como uno en Venezuela por Urdaneta, 2012, con el título: “Relación del NH_4^+ sérico con la severidad de la encefalopatía hepática” en pacientes con cirrosis hepática alcohólica con y sin encefalopatía. El promedio de NH_4^+ sérico fue más alto en 27 pacientes con encefalopatía en comparación con los pacientes sin encefalopatía y los sujetos del grupo control. Así mismo en México por Sánchez, 2014, con el título: “METABOLITOS SÉRICOS ASOCIADOS A LA SEVERIDAD DE LA ENCEFALOPATÍA HEPÁTICA”. En 41 pacientes con encefalopatía hepática (EH) por enfermedad hepática crónica, siendo la principal causa (80.4%) el alcoholismo, se observaron niveles séricos de NH_4^+ elevados (Urdaneta, 2012; Sánchez, 2014).

Además, existe un estudio donde se relaciona las enfermedades hepáticas con el consumo excesivo de ETOH, como en Perú, en un realizado por: Bustíos y colaboradores, 2014, con el título: “Características Epidemiológicas y Clínicas de la Cirrosis Hepática en la Unidad de Hígado del HNERM Es-Salud”, en 475 pacientes con diagnóstico de cirrosis hepática, se definió que el 28% fue a causa de la ingesta de ETOH.

A pesar de que, si existen estudios en otros países, que relacionan niveles elevados de NH_4^+ en sangre en pacientes con enfermedades hepáticas a causa del ETOH, en Ecuador no hay estudios que relacionen directamente las concentraciones de NH_4^+ elevadas en sangre en pacientes alcohólicos crónicos, pero de acuerdo a los estudios indicados anteriormente se pudo avalar los resultados obtenidos en el estudio de investigación realizado. Por tal motivo, al comparar los resultados de las concentraciones de NH_4^+ de la población de estudio al ingreso al “CRA” como al finalizar el tratamiento de desintoxicación con las del grupo control que eran abstemios de ETOH, mostraron una variación estadísticamente significativa, y esto nos indicó que el ETOH sí tiene un efecto



tóxico para el organismo principalmente en el hígado, porque al ser ingerido en cantidades excesivas, se produce una alteración metabólica hepática, como la alteración del ciclo de la urea mencionado anteriormente, considerándose así el NH_4^+ como un marcador biológico de daño hepático, evidenciado también en los estudios descritos anteriormente.

Las concentraciones de NH_4^+ iniciales y finales, mostraron una variación estadísticamente significativa, por lo que el tratamiento de desintoxicación llevado a cabo en el “CRA” dio efectos favorables reflejados en la disminución de las concentraciones de NH_4^+ finales. Sin embargo, esta disminución no se acerca a los valores de referencia, debido a una posible afección hepática irreversible debida al consumo excesivo de ETOH, sin poder recuperar la función normal del hígado, con el desarrollo de complicaciones encefálicas por daño hepático descrito en Urdaneta, 2012 y Sánchez, 2014.

Finalmente, se estableció que los niveles de NH_4^+ séricos elevados sí actúan como un marcador biológico de daño hepático ante una posible alteración metabólica causada por el consumo excesivo de ETOH, al haber una diferencia significativa con el grupo control considerados como abstemios de ingesta de ETOH; y esta elevación de NH_4^+ pudo estar asociada a una enfermedad hepática.



CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Conclusiones:

- ❖ En el estudio realizado, los pacientes de la zona rural de la ciudad de Cuenca, y de edades entre 18-30 años de edad tenían elevado índice de consumo de ETOH y entre las variables, la que más se asoció a elevaciones séricas de NH_4^+ , fue la cantidad de ingesta de ETOH, debido a que superó los 700 ml por semana, lo que pudo desencadenar un desequilibrio metabólico conllevando al desarrollo de enfermedades hepáticas.
- ❖ Se evidenció una diferencia entre las concentraciones de NH_4^+ iniciales y finales de la población de estudio con respecto al grupo control, a causa del efecto tóxico que tiene el ETOH y la alteración metabólica a nivel del ciclo de la urea que se lleva a cabo en el hígado.
- ❖ Se evidenció una disminución significativa entre las concentraciones de NH_4^+ al ingreso al “CRA” y las concentraciones al finalizar el tratamiento de desintoxicación, evidenciándose la efectividad del esquema de tratamiento establecido en el “CRA”.
- ❖ En este estudio se confirmó que el NH_4^+ en pacientes alcohólicos crónicos, actúa como un marcador biológico de daño hepático a causa del consumo excesivo de ETOH, siendo importante la valoración subsiguiente de la función hepática en general en este tipo de pacientes. Por tanto, este estudio puede ser utilizado como una base para la realización de otros estudios y además se puede implementar la técnica de determinación de NH_4^+ en sangre en los laboratorios de análisis clínico.



Recomendaciones:

- ❖ Se recomienda que para confirmar una enfermedad hepática en relación con las concentraciones elevadas de NH_4^+ en sangre se deben realizar otras pruebas clínicas hepáticas como las enzimas hepáticas (AST, ALT, γ -GT; fosfatasa alcalina) así como rayos X, campos magnéticos u ondas sonoras para confirmar que tipo de enfermedad específica está presente en el paciente.
- ❖ Deberían realizarse en Ecuador estudios similares a la relación de NH_4^+ como marcador biológico hepático en alcohólicos crónicos pues el NH_4^+ también se eleva generalmente en enfermedades cardíacas o renales; para así poder tener más fuentes estadísticas de referencia debido a que se disponía de estudios referente a otros países.
- ❖ Para que no existan resultados falsos positivos de concentraciones de NH_4^+ en sangre es importante seguir las condiciones para la toma y el transporte de la muestra, además tomar en consideración los criterios de inclusión y exclusión especificados.



REFERENCIAS

- Aguirre, M. (2011). "ENFERMEDAD HEPÁTICA POR ALCOHOL EN PACIENTES DE 25 A 65 AÑOS HOSPITAL GENERAL DOCENTE DE RIOBAMBA". Recuperado el 15 de marzo de 2017, de <http://dspace.epoch.edu.ec/bitstream/123456789/1904/1/94T00083.pdf>
- Baynes, J. (2015). *Bioquímica Médica*. Barcelona, España. Elsevier España. Recuperado el 19 de diciembre de 2017, ISBN: 978-84-9022-844-9.
- Blanco, D. (2010). *Determinación de amonio en pacientes con cirrosis*. Recuperado el 15 de marzo de 2017, de <http://hepatologia.org.mx/app/media/pdf/2010/W/02.pdf>
- Bustíos C., Dávalos, M. & Román, R. (2014). *Características Epidemiológicas y Clínicas de la Cirrosis Hepática en la Unidad de Hígado del HNERM Es-Salud*. *Revista de Gastroenterología del Perú*, 27(3), 1022-1060. Recuperado el 20 de diciembre de 2017, de http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1022-51292007000300003
- Caballería, L. & Parés, A. (2010). *ENFERMEDAD HEPÁTICA ALCOHÓLICA*. *Revista Medicine*, 35(10), 435-441. Recuperado el 18 de marzo de 2017, de <http://www.elsevier.es/es-revista-medicina-integral-63-articulo-enfermedad-hepatica-alcoholica-11328>
- Campollo, O. (2013). *Características epidemiológicas de la cirrosis hepática en el Hospital Civil de Guadalajara*. Recuperado el 20 de enero de 2018, de Scielo: de <https://www.scielosp.org/article/spm/v39n3/195-200/>
- Chawla, J. (2016). *Hiperamonemia*. Recuperado el 18 de marzo de 2017, de Medscape Drugs & Diseases: <http://www.labtestsonline.es/tests/Ammonia.html?tab=7>
- Fernández, E. (2015). *Hepatopatía alcohólica*. Recuperado el 17 de marzo de 2017, de http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1130-01082005000700009
- Fernández, F. H. (2016). *Historial Natural de 78 enfermedades*. (J. L. Saavedra, Ed.) Mexico: Editorial Manual Moderno. doi:978-607-518-181-3



- Hernández, A. G. (2014). *Principios de la Bioquímica Clínica y Patología Molecular*. Barcelona, España. Elsevier España. Recuperado el 19 de diciembre de 2017, ISBN: 978-84-9022-431-1
- Heron, M. & Murphy, S. (2014). *Cirrosis*. Recuperado el 8 de noviembre de 2017, de National Digestive Diseases Information Clearinghouse: <https://www.med.unc.edu/gi/specialties/liver/files/brochure-pdfs/NIH%20Cirrhosis%20-spanish.pdf>
- Lazarte, R. (2014). *Enfermedad hepática por alcohol*. Recuperado el 22 de marzo de 2017, de <http://bvs.minsa.gob.pe/local/minsa/2986.pdf>
- Lóvine, E. & Selva, A. (2000). *El laboratorio en la Clínica* (3ra Edición ed.). Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana, 959-962.
- Llanque, M. & Gutiérrez, C. (2015). *HEPATOPATÍA ALCOHÓLICA*. *REVISTA MEDICINA CIENCIA INVESTIGACION Y SALUD* (1), 223-245, de http://www.revistasbolivianas.org.bo/scielo.php?pid=S1818-52232005000100011&script=sci_arttext
- MacPhee, S. J. (2015). *Fisiopatología de la enfermedad*. Editorial Mexicana. Recuperado el 19 de diciembre de 2017. ISBN: 978-607-1 5-0400-5
- Meléndez, A. & González, J. (2012). *Principales causas y factores asociados a cirrosis hepática en los pacientes del Hospital General de Zona 2 de Chiapas, México*. *Revista Biomédica-MEDWAVE*, 12(7), 150-185. doi:10.5867/medwave.2012.07.5454
- Menéndez, M. & Mosquera, J. (2012). *ALCOHOL ETÍLICO: Un tóxico de alto riesgo*. Edición 2010. *Revista Facultad Médica Universal Nacional de Colombia*, 32-47
- Mohan, H. (2012). *Patología*. Buenos Aires. Editorial médica Panamericana. Sexta edición. Recuperado el 19 de diciembre de 2017. ISBN: 978-950-06-0286-0
- Naveillan, P. (2012). *SOBRE EL CONCEPTO DE ALCOHOLISMO*. Recuperado el 19 de abril de 2017, de <http://hist.library.paho.org/Spanish/BOL/v91n4p340.pdf>



- ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD, (2012). *Organización Mundial de la Salud (OMS)*. Recuperado el 5 de abril de 2017, de Comité de Evaluación Ética de la Investigación (CEI): <http://www.puce.edu.ec/documentos/Consentimiento-Clinico.pdf>
- Pérez, M. & Castellano, G. (2012). Hígado y alcohol. Recuperado el 11 de noviembre de 2017, de Servicio de Aparato Digestivo. Hospital Universitario 12 de octubre, Madrid: http://www.aegastro.es/sites/default/files/archivos/ayudas-practicas/55_Higado_y_alcohol.pdf
- Pontificia Universidad Javeriana Bogotá. (2015). *RECOMENDACIONES PARA LA TOMA DE MUESTRA DE AMONIO SANGUÍNEO*. Recuperado el 25 de marzo de 2017, de http://www.javeriana.edu.co/ieim/articulos/Recomendaciones_para_toma_de_Amonio%5B1%5D.pdf
- Ruiz, H. (2012). *Enfermedades médicas y estomatológicas provocadas por el alcoholismo en adultos y adolescentes. Modelos animales*. Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas, 31(1), 864-876.
- Sánchez, J. (2014). *METABOLITOS SÉRICOS ASOCIADOS A LA SEVERIDAD DE LA ENCEFALOPATÍA HEPÁTICA*. Recuperado el 20 de Enero de 2018, de DSPACE: <https://cdigital.uv.mx/bitstream/123456789/41612/2/PenicheMoguelKarla.pdf>
- Téllez, J. (2013). *ALCOHOL ETÍLICO. Un tóxico de alto riesgo para la salud humana socialmente aceptado*. Recuperado el 12 de noviembre de 2017, de <https://revistas.unal.edu.co/index.php/revfacmed/article/viewFile/23096/23864>
- Urdaneta, D. (2012). *Relación del amonio sérico con la severidad de la encefalopatía hepática*. Recuperado el 15 de marzo de 2017, de http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0016-35032008000100012
- Wiener Lab. (2016). *Determinación de urea en suero, plasma y orina*. Recuperado el 27 de marzo de 2017, de http://www.wiener-lab.com.ar/VademecumDocumentos/Vademecum%20espanol/uremia_sp.pdf



ANEXOS

Anexo 1:

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPAR EN UN ESTUDIO DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA PARA PACIENTES ATENDIDOS EN EL “CRA”.

Título de la Investigación: DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE AMONIO COMO MARCADOR BIOLÓGICO DE DAÑO HEPÁTICO EN PACIENTES ALCOHÓLICOS CRÓNICOS. CASOS Y CONTROLES.

**Investigadores Principales: María Belén Calderón Rivera.
Juan José Matute Pañora**

Sede donde se realizará el estudio: Universidad de Cuenca y “CRA”.

PARTE I

Información

Nosotros María Belén Calderón y Juan José Matute, egresados de la carrera de Bioquímica y Farmacia de la Universidad de Cuenca, estamos investigando los niveles de NH_4^+ en sangre como marcador biológico de efecto de daño hepático en pacientes alcohólicos crónicos. A través del presente formulario queremos brindarle información e invitarle a ser parte de la presente investigación. Debemos recalcar que usted es libre de tomar la decisión de participar o no, la misma no debe ser tomada en el momento, puede tomar el tiempo necesario para decidir. En el caso de existir dudas acerca del presente o de haber terminología incomprensible, estaremos prestos a despejar cualquier inquietud.

Propósito



El alcoholismo es un trastorno crónico de la conducta en el que una persona consume ETOH de forma excesiva, que afecta principalmente al hígado. El hígado es el encargado de funciones metabólicas del organismo entre las que está el metabolismo nitrogenado; el NH_4^+ es un producto de dicho metabolismo específicamente de los aminoácidos; además es un marcador biológico de efecto de daño hepático tras un consumo excesivo de ETOH. Por lo que en pacientes con problemas de alcoholismo crónico al existir un daño hepático se asociaría con elevación de los niveles de NH_4^+ .

Por tal razón la presente investigación tiene como propósito determinar y comparar en pacientes con alcoholismo crónico del "CRA" los niveles de NH_4^+ como un marcador biológico de efecto de daño hepático con respecto a un grupo control, y así dar contribución médica para la detección oportuna y control de afecciones y complicaciones hepáticas graves, como consecuencia del consumo excesivo de ETOH para los pacientes que lo requieran y a la sociedad por tratarse de una enfermedad crónica de tipo social.

Tipo de Intervención que se realizará

Para el desarrollo de esta investigación, será necesario la extracción de dos muestras de sangre, la primera al inicio de su tratamiento de desintoxicación y la segunda al finalizar el mismo, en cada muestra se determinará los niveles de NH_4^+ , mediante el método de microdifusión de Gilardoni para liberación de NH_4^+ y su respectiva cuantificación mediante los reactivos del test de uremia.

Es necesario también realizar la encuesta al paciente de donde se recopilará de forma estricta y confidencial la siguiente información:

- Edad
- Lugar de residencia
- Tiempo de ingesta de ETOH
- Cantidad de ingesta de ETOH
- Frecuencia de ingesta de ETOH
- Antecedentes patológicos
- Asociación con otras sustancias de hábito



- **Tiempo de tratamiento de desintoxicación**
- **Historial de rehabilitación**

Sección de Participantes

Estamos invitando a participar en esta investigación a los pacientes que padecen de alcoholismo crónico, que están internados en el “CRA”, para determinar los niveles de NH_4^+ en sangre y que además cumplan con las siguientes características:

- **Pacientes que no padezcan Enfermedad Renal.**
- **Pacientes que no padezcan Enfermedad Cardíaca.**
- **Pacientes que no padezcan Enfermedades hemolíticas.**
- **Pacientes que no tengan hábitos de consumo de tabaco y otras drogas.**
- **Pacientes que no padezcan afecciones hepáticas como antecedente patológico.**

Participación Voluntaria

Usted es completamente libre de decidir si participar o no en nuestra investigación. Si usted elige participar o no, los servicios que recibe en el “CRA” serán siempre los mismos. Si decide participar y en adelante cambia de opinión, puede abandonar la investigación sin ningún tipo de represaría en su contra.

Procedimientos y Protocolos

Una vez que usted haya tomado la decisión y compromiso (Firma del Consentimiento Informado) de participar en la investigación, se procederá a tomar las muestras de sangre en la que se desarrollará el análisis posterior en el laboratorio de la Facultad de Ciencias Químicas y el de atención al público de la Universidad de Cuenca; donde se determinará los niveles de NH_4^+ , mediante el método de microdifusión de Gilardoni para liberación de NH_4^+ y su respectiva cuantificación mediante el test de uremia. A su vez, tras su autorización realizaremos la encuesta de la cual obtendremos los datos anteriormente mencionados.

Duración



El desarrollo completo de la investigación se llevará a cabo en el lapso de 9 meses en los cuales tendremos dos visitas a su persona; la primera, al inicio de su tratamiento de desintoxicación y al mismo tiempo se realizará la encuesta para la obtención de datos de importancia y además se consolidará su compromiso a través del presente documento. La segunda, al finalizar el tratamiento de desintoxicación, y una vez concluida la investigación se procederá a dar a conocer los resultados hallados en nuestra investigación a las autoridades respectivas del centro “CRA”.

Efectos adversos

Ninguno

Riesgos

Ninguno

Molestias

Al participar en la investigación la única molesta que se experimentará es el dolor originado por el pinchazo de la aguja para extraer la muestra de sangre.

Beneficios

Dar contribución médica para la detección oportuna y control de afecciones hepáticas, para los pacientes que lo requieran.

De acuerdo a los resultados obtenidos en esta investigación, la terapia recibida en el centro “CRA” podría ser modificada de acuerdo a las necesidades específicas; por otra parte, el análisis de sangre a realizarse será gratuito.

Confidencialidad

En nuestra investigación bajo ningún concepto se revelará su identidad como participante. Toda la información que se obtenga de la investigación y de usted se mantendrá bajo confidencialidad. La información obtenida de su persona se registrará a través de un código alfa-numérico que únicamente los investigadores conocerán y nadie más que los investigadores tendrán acceso a la información.

Los resultados serán entregados a las autoridades respectivas de “CRA”, quienes procederán a la entrega de manera individual de los resultados obtenidos y en caso



de no querer saber lo resultados está en su derecho de manifestarlo. Los resultados de la investigación que necesiten ser expuestos para obtener la titulación, se expondrán resguardando la identidad e integridad de todos los participantes.

Derecho a Negarse o retirarse

Su participación o no dentro de esta investigación no afectará en ningún aspecto el servicio y la atención que recibe dentro del “CRA”. Es su elección y todos sus derechos serán respetados.

A quien contactarse

Si tiene alguna duda o inquietud en el momento o más adelante, puede comunicarse con las siguientes personas quienes estaremos dispuestos a atenderlo en cualquier momento:

Dra. Ruth Eugenia Rosas Castro, Mgt.

Teléfono Celular: 0999792227

e-mail: ruth.rosas@ucuenca.edu.ec

María Belén Calderón Rivera

Teléfono Celular: 0999032215

e-mail: belen.calderon@ucuenca.ec

Juan José Matute Pañora

Teléfono Celular: 0987485578

e-mail: jose.matutep@ucuenca.ec

PARTE II

Para el participante potencial

Yo,....., con cédula de
 Identidad....., de nacionalidad.....,
 mayor de edad, con domicilio en..... He leído la información



proporcionada y/o me ha sido leída, he tenido la oportunidad de preguntar sobre ella y se me ha contestado satisfactoriamente las preguntas que he realizado. Consiento voluntariamente participar en esta investigación: DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE AMONIO COMO MARCADOR BIOLÓGICO DE DAÑO HEPÁTICO EN PACIENTES ALCOHÓLICOS CRÓNICOS. CASOS Y CONTROLES. Como participante y entiendo que tengo el derecho de retirarme de la investigación en cualquier momento sin que me afecte en ninguna manera mis servicios en el centro “CRA”.

.....

Firma del Participante

Fecha: dd/mm/aa

Para el Investigador

Yo,....., con cédula de Identidad....., de nacionalidad..... He leído con exactitud o he sido testigo de la lectura exacta del documento de consentimiento informado para el potencial participante y el individuo ha tenido la oportunidad de hacer preguntas. Confirmo que el individuo ha dado consentimiento libremente.

.....

María Belén Calderón R.

Fecha: dd/m/aa

Yo,....., con cédula de Identidad....., de nacionalidad..... He leído con exactitud o he sido testigo de la lectura exacta del documento de consentimiento informado para el potencial participante y el individuo ha tenido la oportunidad de hacer preguntas. Confirmo que el individuo ha dado consentimiento



libremente.

.....
Juan José Matute P.

Fecha: dd/m/aa

Formato tomado de: Organización Mundial de la Salud (OMS) Comité de Evaluación Ética de la Investigación: <http://www.puce.edu.ec/documentos/Consentimiento-Clinico.pdf> (Organización mundial de la salud, 2012).

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPAR EN UN ESTUDIO DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA A ESTUDIANTES DE LA FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS DE LA UNIVERSIDAD DE CUENCA COMO GRUPO CONTROL.

Título de la Investigación: DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE AMONIO COMO MARCADOR BIOLÓGICO DE DAÑO HEPÁTICO EN PACIENTES ALCOHÓLICOS CRÓNICOS. CASOS Y CONTROLES.

Investigadores Principales: María Belén Calderón Rivera.

Juan José Matute Pañora

Sede donde se realizará el estudio: Universidad de Cuenca.

PARTE I



Información

Nosotros María Belén Calderón y Juan José Matute, egresados de la carrera de Bioquímica y Farmacia de la Universidad de Cuenca, estamos investigando los niveles de NH_4^+ en sangre, ha estudiantes sin hábitos de consumo de ETOH y sin asociación a otras sustancias de hábito. A través del presente formulario queremos brindarle información e invitarle a ser parte de la presente investigación. Debemos recalcar que usted es libre de tomar la decisión de participar o no, la misma no debe ser tomada en el momento, puede tomar el tiempo necesario para decidir. En el caso de existir dudas acerca del presente o de haber terminología incomprensible, estaremos prestas a despejar cualquier inquietud.

Propósito

El alcoholismo es un trastorno crónico de la conducta en el que una persona consume ETOH de forma excesiva, que afecta principalmente al hígado. El hígado es el encargado de funciones metabólicas del organismo entre las que está el metabolismo nitrogenado; el NH_4^+ es un producto de dicho metabolismo específicamente de los aminoácidos; además es un marcador biológico de efecto de daño hepático tras un consumo excesivo de ETOH. Por lo que en pacientes con problemas de alcoholismo crónico al existir un daño hepático se asociaría con elevación de los niveles de NH_4^+ .

Por tal razón la presente investigación tiene como propósito determinar y comparar en pacientes con alcoholismo crónico del "CRA" los niveles de NH_4^+ como un marcador biológico de efecto de daño hepático con respecto a un grupo control, y así dar contribución médica para la detección oportuna y control de afecciones y complicaciones hepáticas graves, como consecuencia del consumo excesivo de ETOH para los pacientes que lo requieran y a la sociedad por tratarse de una enfermedad crónica de tipo social.

Tipo de Intervención que se realizará

Para el desarrollo de esta investigación, será necesario la extracción de una sola toma de muestra de sangre, en la que se determinará los niveles de NH_4^+ , mediante el método de microdifusión de Gilardoni para liberación de NH_4^+ y su respectiva



cuantificación mediante los reactivos del test de uremia.

Es necesario también realizar la encuesta al estudiante donde se recopilará de forma estricta y confidencial la siguiente información:

- Edad
- Lugar de residencia
- Consumo de ETOH
- Antecedentes patológicos
- Asociación con otras sustancias de hábito

Sección de Participantes

Estamos invitando a participar en esta investigación a estudiantes sin hábitos de consumo de ETOH y sin asociación a otras sustancias de hábito, de la facultad de Ciencias Químicas de la Universidad de Cuenca, para determinar los niveles de NH_4^+ en sangre como marcador biológico de daño hepático y que además cumplan con las siguientes características:

- Pacientes que no padezcan Enfermedad Renal.
- Pacientes que no padezcan Enfermedad Cardíaca.
- Pacientes que no padezcan Enfermedades hemolíticas.
- Pacientes que no padezcan afecciones hepáticas como antecedente patológico.

Participación Voluntaria

Usted es completamente libre de decidir si participar o no en nuestra investigación. Si usted elige participar o no, los servicios que recibe en la Universidad de Cuenca serán siempre los mismos. Si decide participar y en adelante cambia de opinión, puede abandonar la investigación sin ningún tipo de represaría en su contra.

Procedimientos y Protocolos

Una vez que usted haya tomado la decisión y compromiso (Firma del Consentimiento Informado) de participar en la investigación, se procederá a la toma de muestra de



sangre en la que se desarrollará el análisis posterior en el laboratorio de la facultad de Ciencias Químicas y el de atención al público de la Universidad de Cuenca; donde se determinará los niveles de NH_4^+ , mediante el método de microdifusión de Gilardoni para liberación de NH_4^+ y su respectiva cuantificación mediante el test de uremia. A su vez, tras su autorización realizaremos la encuesta de la cual obtendremos los datos anteriormente mencionados.

Duración

El desarrollo completo de la investigación se llevará a cabo en el lapso de 2 meses, en el cual al inicio de la investigación se procederá a una sola toma de muestra de sangre, al mismo tiempo se realizará la encuesta para la obtención de datos de importancia y se consolidará su compromiso a través del presente documento.

Efectos adversos

Ninguno

Riesgos

Ninguno

Molestias

Al participar en la investigación la única molesta que se experimentará es el dolor originado por el pinchazo de la aguja para extraer la muestra de sangre.

Beneficios

Como parte del grupo control, contribuye al desarrollo de la Investigación y, por otra parte, el análisis de sangre a realizarse será gratuito.

Confidencialidad

En nuestra investigación bajo ningún concepto se revelará su identidad como participante. Toda la información que se obtenga de la investigación y de usted se mantendrá bajo confidencialidad. La información obtenida de su persona se registrará a través de un código alfa-numérico que únicamente los investigadores conocerán y nadie más que los investigadores tendrán acceso a la información.



Los resultados de la investigación que necesiten ser expuestos para obtener la titulación, se expondrán resguardando la identidad e integridad de todos los participantes.

Derecho a Negarse o retirarse

Su participación o no dentro de esta investigación no afectará en ningún aspecto el servicio y la atención que recibe dentro de la Universidad de Cuenca. Es su elección y todos sus derechos serán respetados.

A quien contactarse

Si tiene alguna duda o inquietud en el momento o más adelante, puede comunicarse con las siguientes personas quienes estaremos dispuestos a atenderlo en cualquier momento:

Dra. Ruth Eugenia Rosas Castro, Mgt.

Teléfono Celular: 0999792227

e-mail: ruth.rosas@ucuenca.edu.ec

María Belén Calderón Rivera

Teléfono Celular: 0999032215

e-mail: belen.calderon@ucuenca.ec

Juan José Matute Pañora

Teléfono Celular: 0987485578

e-mail: jose.matutep@ucuenca.ec

PARTE II

Para el participante potencial

Yo,....., con cédula de
Identidad....., de nacionalidad.....,



mayor de edad, con domicilio en..... He leído la información proporcionada y/o me ha sido leída, he tenido la oportunidad de preguntar sobre ella y se me ha contestado satisfactoriamente las preguntas que he realizado. Consiento voluntariamente participar en esta investigación: DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE AMONIO COMO MARCADOR BIOLÓGICO DE DAÑO HEPÁTICO EN PACIENTES ALCOHÓLICOS CRÓNICOS. CASOS Y CONTROLES. Como participante y entiendo que tengo el derecho de retirarme de la investigación en cualquier momento sin que me afecte en ninguna manera mis servicios en la Universidad de Cuenca.

.....

Firma del Participante

Fecha: dd/mm/aa

Para el Investigador

Yo,....., con cédula de Identidad....., de nacionalidad..... He leído con exactitud o he sido testigo de la lectura exacta del documento de consentimiento informado para el potencial participante y el individuo ha tenido la oportunidad de hacer preguntas. Confirmando que el individuo ha dado consentimiento libremente.

.....

María Belén Calderón R.

Fecha: dd/m/aa

Yo,....., con cédula de Identidad....., de nacionalidad..... He leído con exactitud o he sido testigo de la lectura exacta del documento de consentimiento informado para el potencial participante y el individuo ha tenido la oportunidad de hacer preguntas. Confirmando que el individuo ha dado consentimiento



libremente.

.....
Juan José Matute P.

Fecha: dd/m/aa

Formato tomado de: Organización Mundial de la Salud (OMS) Comité de Evaluación Ética de la Investigación: <http://www.puce.edu.ec/documentos/Consentimiento-Clinico.pdf> (Organización mundial de la salud, 2012).

Anexo 2:

ENCUESTA DE RECOLECCIÓN DE DATOS PARA POBLACIÓN DE ESTUDIO

**UNIVERSIDAD DE CUENCA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
CARRERA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA**

Trabajo de Titulación: DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE AMONIO COMO MARCADOR BIOLÓGICO DE DAÑO HEPÁTICO EN PACIENTES ALCOHÓLICOS CRÓNICOS. CASOS Y CONTROLES.

**Investigadoras Principales: María Belén Calderón Rivera
Juan José Matute Pañora**



Tutor de Tesis: Dra. Ruth Eugenia Rosas Castro, Mgt.

ENCUESTA DE RECOLECCIÓN DE DATOS

Código del Paciente: En mayúsculas, primera letra del primer apellido, primera letra del segundo apellido, primera letra del primer nombre, primera letra del segundo nombre, seguido de número de mes, seguido del número que se le asignará al paciente al tomarse la muestra.

Ejemplo: MPJJ0301

Parte I – Variables.

Indicación: Por favor conteste el presente cuestionario.

Edad	<input type="text"/>			
Procedencia.	Parroquias de Cuenca en la que vive es:		<input type="checkbox"/> Urbana	<input type="checkbox"/> Rural
Tiempo de ingesta de ETOH	<input type="checkbox"/> Menor a 6 meses		<input type="checkbox"/> Más de 6 meses	
Cantidad de ingesta de ETOH	1-2 vasos	<input type="checkbox"/>	1 botella	<input type="checkbox"/>
	3-4 vasos	<input type="checkbox"/>	2 botellas	<input type="checkbox"/>
	Mas de 4 vasos	<input type="checkbox"/>		
Frecuencia de ingesta de ETOH	1 día a la semana	<input type="checkbox"/>		
	2 días a la semana	<input type="checkbox"/>		
	3 días a la semana	<input type="checkbox"/>		
	4 días a la semana	<input type="checkbox"/>		
	Todos los días.	<input type="checkbox"/>		
Asociación con otras sustancias de hábito	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	Tabaco	Marihuana	Cocaína	Otras
	Anteriormente ha estado en un centro de desintoxicación a causa del consumo de ETOH.			
	<input type="checkbox"/> Sí	<input type="checkbox"/> No		
Si su respuesta es Sí, por cuanto tiempo estuvo en el centro de desintoxicación.				
	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	



	1 mes	2 meses	3 meses
PARTE II - CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN			
Marque con una X.			
Manifiesta alguna patología	Enfermedades Renales	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	Anemia Hemolítica	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	Enfermedades hepáticas (hepatitis, cirrosis, insuficiencia hepática u otras).	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	Enfermedades Cardíacas	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	Otras enfermedades	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
En caso de manifestar de una patología, lleva algún control o tratamiento	<input type="checkbox"/> Sí	<input type="checkbox"/> No	
Si su respuesta fue Sí, indicar el nombre y la dosis del o los medicamentos.	Medicamento:..... Dosis:..... Medicamento:..... Dosis:.....		

ENCUESTA DE RECOLECCIÓN DE DATOS PARA GRUPO CONTROL

UNIVERSIDAD DE CUENCA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
CARRERA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

Trabajo de Titulación: DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE AMONIO COMO MARCADOR BIOLÓGICO DE DAÑO HEPÁTICO EN PACIENTES ALCOHÓLICOS CRÓNICOS. CASOS Y CONTROLES.

Investigadoras Principales: María Belén Calderón Rivera
Juan José Matute Pañora

Director de Tesis: Dra. Ruth Eugenia Rosas Castro, Mgt.

ENCUESTA DE RECOLECCIÓN DE DATOS



Código del Paciente: En mayúsculas, primera letra del primer apellido, primera letra del segundo apellido, primera letra del primer nombre, primera letra del segundo nombre, seguido de número de mes, seguido del número que se le asignará al paciente al tomarse la muestra.

Ejemplo: MPJJ0301

Parte I – Variables.

Indicación: Por favor conteste el presente cuestionario.

Edad	<input type="text"/>
Procedencia.	Parroquias de Cuenca en la que vive es: <input type="checkbox"/> Rural <input type="checkbox"/> Urbana
Consume ETOH.	<input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No
Asociación con otras sustancias de hábito.	<input type="checkbox"/> Tabaco <input type="checkbox"/> Marihuana <input type="checkbox"/> Cocaína <input type="checkbox"/> Otras
PARTE II - CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN	
Marque con una X	
Manifiesta alguna patología	Enfermedades Renales <input type="checkbox"/> Anemia Hemolítica <input type="checkbox"/> Enfermedades hepáticas (hepatitis, cirrosis, insuficiencia hepática u otras). <input type="checkbox"/> Enfermedades Cardiacas <input type="checkbox"/> otras enfermedades <input type="checkbox"/>
En caso de manifestar de una patología, lleva algún control o tratamiento	<input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No
Si su respuesta fue Sí, indicar el nombre y la dosis del o los	Medicamento:..... Dosis:.....



medicamentos.	Medicamento:.....
	Dosis:.....

Anexo 3:

Determinación cuantitativa de NH_4^+ en sangre-Método de Gilardoni, empleando los reactivos A y B del kit de uremia.

4. Materiales, Equipos y Reactivos:

4.1. Materiales y Equipos:

Tabla 12. Materiales y Equipos empleados.

MATERIALES	EQUIPOS
Cámaras de microdifusión (Conway)	Espectrofotómetro Thermo Spectronic (GENESYS 20): longitud de onda 640nm.
Pipeta automática de 1000 μl .	Baño maría (PRECISION) Thermo Fisher: 37°C.
Pipetas serológicas de 1,2,5 y 10 ml.	Cocina eléctrica
Pipetas Pasteur	Estufa 100-110°C.
Material de vidrio (Vasos, varillas, probetas, tubos de ensayo, etc.)	Centrifuga (EBA 20): 2000 rpm. x 10 minutos.
Tubos de centrifuga	
Cubetas para espectrofotómetro	
Fuente: Autores de trabajo de titulación.	



4.2. Reactivos:

1. Agua libre de amoníaco:

El agua libre de amoníaco se utilizó para la preparación de todos los reactivos y lavado de material; se obtuvo por pasaje de agua destilada a través de una resina de intercambio catiónico. (Lóvine y Selva, 2000)

2. Reactivo desproteinizante (Preparación):

- Bicloruro de mercurio p.a. 12.5 g con ETOH absoluto 50 ml.
- Acetato de plomo p.a. 5 g. con agua destilada exenta de amoníaco 20 ml.
- Se transfirió a sobre b, formando un precipitado blanco que se redisolvió añadiendo Ácido Acético 2M gota a gota (aproximadamente 15 ml); posteriormente se aforó a 100 ml con agua destilada, se dejó 12 horas en reposo antes de su uso y su pH final debe estuvo entre 4 a 5.

2.1. Cálculo y preparación de Ácido Acético 2M:

- Concentración: 100%p/p
- Densidad: $d = 1,50 \text{ kg/L}$

$$\%p/v = \%p/p \times d, = 100\% \times 1,50 = 150\%p/v$$

1 mol de Ácido acético pesa	←	60 gramos
2 moles de Ácido acético pesan	↘	X = 120 gramos

150g de Ácido Acético	←	100 ml de solución.
120 g de Ácido Acético	↘	X1 = 80 ml de solución.

80ml → 1000ml → 2M

X2=? → 100ml → 2M

X2= 8 ml

Por tanto, se tomó 8ml de solución de Ácido acético y se aforó a 100ml con H₂O destilada dando una solución 2M.



3. Solución saturada de Carbonato de Potasio (Preparación):

- Carbonato de Potasio p.a. 130 g. con agua destilada exenta de amoniaco 100 ml.
- Se calentó a ebullición la mezcla a, se dejó enfriar y se usó la solución sobrenadante.

4. Solución saturada de Yoduro de Potasio (Preparación):

- Yoduro de Potasio p.a. 100 g. con agua destilada exenta de amoniaco 70 ml.
- Se calentó a ebullición la mezcla a, se dejó enfriar y se usó la solución sobrenadante.

5. Ácido sulfúrico 0,005 N:

5.1. Cálculo y preparación de Acido sulfúrico 0,005 N:

- Densidad: $d = 1,84 \text{ g/cm}^3$
- Riqueza: 96%

$$1\text{N} \rightarrow 49,0 \text{ g} \rightarrow 1000\text{ml}$$

$$0,005\text{N} \rightarrow X=? \rightarrow 1000\text{ml}$$

$$X = 0,245\text{g}$$

$$d = m/V \quad V = m/d \quad V = 0,245\text{g} / 1,84\text{g/cm}^3 \quad V = 0,13\text{ml}$$

$$0,13\text{ml} \xleftrightarrow{100\%}$$

$$X1=? \xrightarrow{96\%}$$

$$X1 = 0,135\text{ml}$$

$$0,135\text{ml} \xleftrightarrow{1000\text{ml}}$$

$$X2=? \xrightarrow{100\text{ml}}$$



$$X2=0,0135\text{ml} \rightarrow 13.5 \mu\text{l}$$

Por tanto, se tomó 13,5 μl de H_2SO_4 químicamente puro y se aforó a 100ml con H_2O destilada dando una solución de H_2SO_4 0,005N.

6. Solución madre de NH_4^+ 200 $\mu\text{g/ml}$ (Preparación):

- Sulfato de NH_4^+ p.a. 94.3 mg previamente desecado (1 hora) con agua destilada exenta de amoníaco 100 ml y se conservó en refrigeración.

7. Soluciones estándar de NH_4^+ a partir de solución madre:

- Estándar de 20 $\mu\text{g/ml}$: Se realizó el cálculo según la formula.

$$V_i \cdot C_i = V_f \cdot C_f$$

Donde,

V_i = Volumen Desconocido

C_i = Concentración de solución madre (200 $\mu\text{g/ml}$)

V_f = Volumen de aforo con agua libre de amoníaco (100ml)

C_f = Concentración estándar de NH_4^+ (10 $\mu\text{g/ml}$)

$$V_i = [(100\text{ml} \times 10 \mu\text{g/ml}) / 200 \mu\text{g/ml}]$$

$V_i = 5 \text{ ml.}$

Se tomó 5 ml de solución madre y se aforó a 100 ml de agua libre de amoníaco.

- Para los cálculos y preparación de los estándares de 20, 30, 40 y 60 $\mu\text{g/ml}$ se empleó lo aplicado en el estándar de 10 $\mu\text{g/ml}$.

8. Reactivos del kit de uremia. empleados para la determinación de NH_4^+ en sangre:

- Reactivo A: Contiene fenol y nitroferriicianuro de sodio.
- Reactivo B: Concentrado de Hipoclorito de Sodio e Hidróxido de Sodio.

4.3. Procedimiento:

4.3.1. Extracción-Desproteinización de la muestra:

1. Se tomó la muestra de sangre en tubo tapa roja.



2. A 2 ml de desproteinizante colocados en tubo cónico graduado, se añadieron 2 ml de sangre extraída.



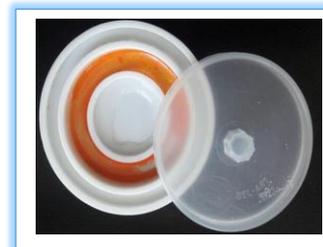
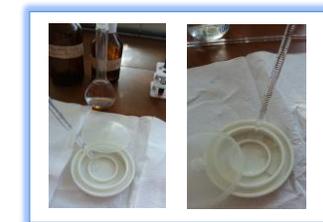
3. Se tapó y agitó enérgicamente.

4. Se centrifugó 10 minutos a 2000 r.p.m. El sobrenadante debía ser limpio o ligeramente opalescente.



4.3.2. Microdifusión:

1. A una cámara de Conway se vaselinó la tapa perfectamente.
2. Se colocó en la sección externa: 1 ml de solución saturada de carbonato de potasio y 0.2 ml de solución saturada de yoduro de potasio.
3. En la sección interna: se colocó 0.5 ml de ácido sulfúrico 0.005 N.
4. Se tapó con la placa vaselinateda, se dejó una pequeña abertura en el lugar diametralmente opuesto al carbonato de potasio-yoduro, y se introdujo 1ml de filtrado en la sección externa de la cámara.
5. Se obturó la cámara por completo y se mezcló rápidamente el contenido por suave rotación, hasta disolución del precipitado de yoduro mercúrico formado (color anaranjado). Se dejó en reposo por 30 minutos.



4.3.3. Valoración de la muestra:

- Se disponen de 3 tubos de ensayo marcados:
 - Tubo Blanco: B
 - Tubo Estándar: E
 - Tubo de muestra: Código del paciente respectivo.

Colocar en cada tubo de acuerdo lo especificado en la siguiente tabla:



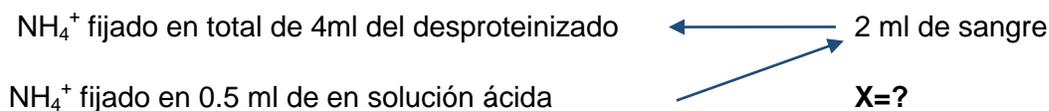
Tabla 13. Procedimiento para obtención de absorbancias de estándar y muestra frente a un blanco de reactivos.

Reactivos	Blanco (B)	Estándar (E)	Muestra (Código)
Contenido de la fase interna + 1ml de H ₂ O destilada.	-----	-----	1.5 ml
H ₂ SO ₄ 0.005N	0.5 ml	0.5 ml	-----
H ₂ O destilada exenta de amoníaco.	1 ml	0.5 ml	-----
Estándar de NH ₄ ⁺ (10,20,30,40 y 60 µg/ml)	-----	0.5 ml	-----
Reactivo A	1 ml	1 ml	1 ml
Reactivo B	1 ml	1 ml	1 ml
Mezclar, colocar en baño maría a 37°C x 10 minutos.			
Leer a 640 nm la muestra y el estándar contra el blanco de reactivos.			
Fuente: Autores de trabajo de titulación.			

5. Cálculos para los resultados de NH₄⁺ en sangre:

5.1. Cálculo para expresar el estándar de NH₄⁺ en sangre:

- Para expresar el estándar de NH₄⁺ en sangre se siguió los siguientes puntos:
 - a. Cantidad de sangre equivalente a NH₄⁺ fijado en 0.5 ml solución ácida:



X= 0.25 ml de sangre equivalente a NH₄⁺ fijado en 0.5 ml solución ácida.



- b. ¿Cuántas X1 veces de X estuvieron contenidos en 100 ml (dl)?:

$$X1 = 100 \text{ ml} / 0.25 \text{ ml de sangre}$$

$$X1 = 400 / \text{dl de sangre}$$

- c. Concentración del estándar expresado en sangre ($\mu\text{g}/\text{dl}$):

Estándar de NH_4^+ de $10 \mu\text{g}/\text{ml}$:

$10 \mu\text{g}$ de NH_4^+ \longleftrightarrow 100 ml (Agua libre de NH_4^+)

$X2 = ?$ \longleftarrow 0.5 ml (Alícuota usada en el estándar (E) del Anexo 3 de la Tabla 13.)

$X2 = 0.05 \mu\text{g}$ de NH_4^+ en 0.5 ml de la alícuota.

- d. Concentración de estándar de NH_4^+ expresado en sangre:

Para este punto se multiplica el literal b con el c, dando la concentración final en $\mu\text{g}/\text{dl}$:

$$\mu\text{g}/\text{dl en sangre} = (400 \times 0.05 \mu\text{g}) = 20 \mu\text{g}/\text{dl}$$

- e. Cálculo del factor para el estándar de $20 \mu\text{g}/\text{dl}$ en sangre:

Factor (F) = Concentración de estándar de NH_4^+ en sangre / Absorbancia del estándar

$$F = 20 \mu\text{g}/\text{dl en sangre} / 0.024$$

$$F = 833.33$$

- f. Para el cálculo de las concentraciones y de los factores expresados en sangre para los estándares de $20, 30, 40$ y $60 \mu\text{g}/\text{ml}$ se empleó lo mismo que para el estándar de $10 \mu\text{g}/\text{ml}$, que se indican a continuación:



Tabla 14. Factores y Factor promedio de los estándares expresados en sangre.

Concentración de Estándar expresado en sangre ($\mu\text{g/dl}$).	Factor	Factor promedio
20	833.33	849.13*
40	800.00	
60	821.92	
80	860.21	
120	930.23	
Fuente: Autores de trabajo de titulación.		

- g. El factor promedio fue 849.13; empleado para la determinación de NH_4^+ en la población de estudio y grupo control.
- h. La concentración de NH_4^+ en sangre se calculó con la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración de } \text{NH}_4^+ (\mu\text{g/dl}) = \text{Absorbancia de la muestra a } 640 \text{ nm. x Factor promedio (849.13)}$$



5.2. Datos obtenidos en la encuesta personal de las características generales (variables) de la población de estudio correspondiente a pacientes masculinos alcohólicos crónicos internados en el “CRA”:

Tabla 15. Datos obtenidos en la encuesta personal de las características generales (variables) de la población de estudio.

CÓDIGO DEL PACIENTE	EDAD	PROCEDENCIA	TIEMPO DE INGESTA DE ETOH	CANTIDAD DE INGESTA DE ETOH (ml)	FRECUENCIA DE INGESTA DE ETOH
01	37	Rural	Mayor a 6 meses (Crónico)	3-4 vasos (1 vaso= 200ml)	3 días a la semana
02	35	Rural	Mayor a 6 meses (Crónico)	1-2 vasos (1 vaso= 200ml)	2 días a la semana
03	24	Urbana	Mayor a 6 meses (Crónico)	2 botellas (1 botella =750ml)	2 días a la semana
04	29	Rural	Mayor a 6 meses (Crónico)	1-2 vasos (1 vaso= 200ml)	2 días a la semana
05	37	Urbana	Mayor a 6 meses (Crónico)	1 botella (750ml)	2 días a la semana
06	32	Rural	Mayor a 6 meses (Crónico)	3-4 vasos (1 vaso= 200ml)	2 días a la semana
07	28	Rural	Mayor a 6 meses (Crónico)	3-4 vasos (1 vaso= 200ml)	2 días a la semana
08	36	Rural	Mayor a 6 meses (Crónico)	3-4 vasos (1 vaso= 200ml)	2 días a la semana
09	30	Rural	Mayor a 6 meses (Crónico)	2 botellas (1 botella =750ml)	2 días a la semana
10	31	Rural	Mayor a 6 meses (Crónico)	3-4 vasos (1 vaso= 200ml)	2 días a la semana



11	25	Rural	Mayor a 6 meses (Crónico)	1-2 vasos (1 vaso= 200ml)	2 días a la semana
12	34	Urbana	Mayor a 6 meses (Crónico)	1 botella (750ml)	3 días a la semana
13	33	Urbana	Mayor a 6 meses (Crónico)	2 botellas (1 botella =750ml)	4 días a la semana
14	37	Urbana	Mayor a 6 meses (Crónico)	1 botella (750ml)	todos los días
15	27	Rural	Mayor a 6 meses (Crónico)	1 botella (750ml)	4 días a la semana
16	20	Urbana	Mayor a 6 meses (Crónico)	1 botella (750ml)	3 días a la semana
17	35	Urbana	Mayor a 6 meses (Crónico)	3-4 vasos (1 vaso= 200ml)	3 días a la semana
18	32	Urbana	Mayor a 6 meses (Crónico)	2 botellas (1 botella =750ml)	4 días a la semana
19	34	Rural	Mayor a 6 meses (Crónico)	3-4 vasos (1 vaso= 200ml)	3 días a la semana
20	37	Rural	Mayor a 6 meses (Crónico)	2 botellas (1 botella =750ml)	4 días a la semana
21	23	Rural	Mayor a 6 meses (Crónico)	1 botella (750ml)	todos los días
22	21	Urbana	Mayor a 6 meses (Crónico)	2 botellas (1 botella =750ml)	2 días a la semana
23	27	Urbana	Mayor a 6 meses (Crónico)	1 botella (750ml)	4 días a la semana
24	21	Urbana	Mayor a 6 meses (Crónico)	3-4 vasos (1 vaso= 200ml)	2 días a la semana
25	20	Rural	Mayor a 6 meses (Crónico)	2 botellas (1 botella =750ml)	4 días a la semana
26	28	Rural	Mayor a 6 meses (Crónico)	1-2 vasos (1 vaso= 200ml)	2 días a la semana



27	26	Rural	Mayor a 6 meses (Crónico)	1 botella (750ml)	3 días a la semana
28	20	Rural	Mayor a 6 meses (Crónico)	3-4 vasos (1 vaso= 200ml)	2 días a la semana
29	21	Rural	Mayor a 6 meses (Crónico)	2 botellas (1 botella =750ml)	4 días a la semana
30	30	Urbana	Mayor a 6 meses (Crónico)	1 botella (750ml)	4 días a la semana

Fuente: Autores de trabajo de titulación.

5.3. Datos obtenidos en la encuesta personal de grupo control correspondiente a estudiantes de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad de Cuenca, masculinos y abstemios de ETOH:

Tabla 16. Datos obtenidos en la encuesta personal de grupo control.

CÓDIGO DEL PACIENTE	EDAD	PROCEDENCIA	CONSUMO DE ETOH
01	31	Rural	NO consume ETOH
02	23	Rural	NO consume ETOH
03	25	Rural	NO consume ETOH
04	31	Rural	NO consume ETOH
05	23	Urbana	NO consume ETOH
06	22	Rural	NO consume ETOH
07	27	Rural	NO consume ETOH
08	24	Urbana	NO consume ETOH
09	26	Rural	NO consume ETOH
10	24	Rural	NO consume ETOH
11	30	Rural	NO consume ETOH
12	23	Rural	NO consume ETOH



13	31	Urbana	NO consume ETOH
14	32	Rural	NO consume ETOH
15	28	Urbana	NO consume ETOH
16	23	Rural	NO consume ETOH
17	21	Rural	NO consume ETOH
18	22	Rural	NO consume ETOH
19	24	Urbana	NO consume ETOH
20	27	Rural	NO consume ETOH
21	31	Urbana	NO consume ETOH
22	23	Rural	NO consume ETOH
23	29	Urbana	NO consume ETOH
24	32	Rural	NO consume ETOH
25	32	Rural	NO consume ETOH
26	20	Urbana	NO consume ETOH
27	25	Rural	NO consume ETOH
28	22	Rural	NO consume ETOH
29	32	Urbana	NO consume ETOH
30	31	Urbana	NO consume ETOH

Fuente: Autores de trabajo de titulación.

Anexo 4:

Equipos empleados en la Técnica para la Determinación de NH_4^+ en sangre.



Figura 7. Centrifuga (EBA 20) para la obtención del filtrado de la muestra desproteinizada.



Figura 8. Baño María (PRECISION) Thermo Fisher: empleado en el proceso de valoración de la muestra.



Figura 9. Espectrofotómetro Thermo Spectronic (GENESYS 20) empleado en la lectura de las absorbancias de las muestras.

Complejo colorimétrico anaranjado correspondiente al precipitado de yoduro mercúrico formado en el proceso de microdifusión.



Figura 10. Complejo colorimétrico anaranjado formado en el proceso de microdifusión.

Resultados colorimétricos de muestras de pacientes de población de estudio al ingreso al “CRA” y al finalizar el tratamiento de desintoxicación.

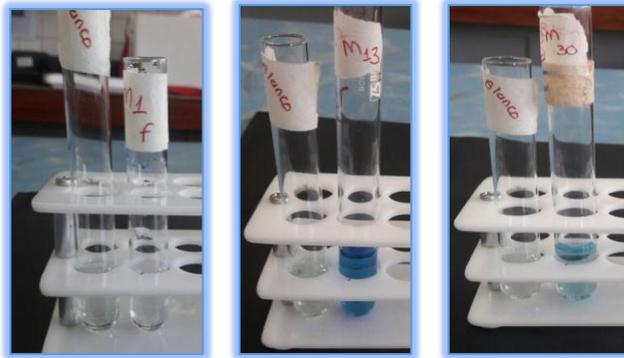


Figura 11. Resultados colorimétricos de muestras de pacientes de la población de estudio al ingreso al “CRA”, con niveles de NH_4^+ dentro de los valores de referencia (muestra 1) y con niveles elevados (muestra 13 y 30).

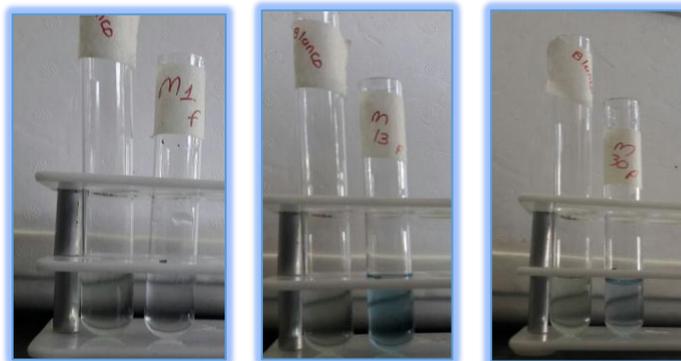


Figura 12. Resultados colorimétricos de muestras de pacientes de población de estudio al finalizar el tratamiento de desintoxicación, con niveles de NH_4^+ dentro de los valores de referencia (muestra 1) y con niveles elevados (muestra 13 y 30).