

77
21



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE



**EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA**

**PULQUE Y ENTEROBACTERIAS COMO FACTORES
PREDISONENTES AL DAÑO HEPATICO CRONICO**



T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO
P R E S E N T A :
EDGAR EDUARDO PACHECO MENDOZA



MEXICO, D. F.

1997

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

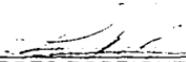
El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Jurado Asignado:

Presidente: Profr. GUADALUPE VELEZ PRATT
Vocal: Profr. LAURA PENICHE VILLALPANDO
Secretario. Profr. LOURDES RODRIGUEZ FRAGOSO
1er. Suplente: Profr. MARCO ANTONIO ORTIZ JIMENEZ
2do. Suplente: Profr. MA. DEL SOCORRO CECILIA REYNA
RODRIGUEZ

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:
Laboratorio de Biología Molecular del Departamento de Gastroenterología
del Instituto Nacional de la Nutrición "Salvador Zubirán"

Asesor de tema:



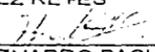
DRA. LOURDES RODRIGUEZ FRAGOSO

Supervisor técnico:



M. en B. E. ESPERANZA GABRIELA
GUTIERREZ REYES

Sustentante:



EDGAR EDUARDO PACHECO MENDOZA

LA CIENCIA ES EL ALMA DE LA
PROSPERIDAD DE LAS
NACIONES Y LA FUENTE DE
VIDA DE TODO PROGRESO

LOUIS PASTEUR

AGRADECIMIENTOS.

A LA DRA. LOURDES RODRÍGUEZ POR HABERME RECIBIDO EN EL LABORATORIO, POR EL TIEMPO QUE ME DIÓ ASÍ COMO A LA AYUDA RECIBIDA PARA QUE ESTE TRABAJO SE LLEVARA A CABO.

A LA M. EN B.E. GABY GUTIERREZ POR HABERME BRINDADO SU ENSEÑANZA Y ASESORÍA SIN LA CUAL EL TRABAJO EXPERIMENTAL NO HUBIERA SIDO POSIBLE DE REALIZAR.

A TODO EL DEPARTAMENTO DE GASTROENTEROLOGÍA DEL INNSZ POR HABERME ABIERTO SUS PUERTAS Y BRINDADO SU CONFIANZA.

A TODOS MIS COMPAÑEROS DE LABORATORIO QUE ME HICIERON PASAR MOMENTOS MUY AMENOS Y NO TAN AMENOS. ADEMÁS DE APRENDER DE SUS EXPERIENCIAS.

A FERNANDO TUZ, FERNANDO ARTEAGA Y MIRIAM ARCINIEGA POR HABERME BRINDADO EL ASESORAMIENTO "EXTRA" DENTRO DEL TRABAJO.

A MIS MAESTRAS GUADALUPE VELEZ Y LAURA PENICHE POR SU APOYO PARA LLEVAR A CABO ESTE TRABAJO Y DIRECCIÓN DE TESIS.

DEDICATORIAS.

ESTA TESIS VA DEDICADA PARA ESAS DOS PERSONAS MARAVILLOSAS QUE SON MIS PADRES, JESÚS Y BEATRÍZ, PORQUE ELLOS ME DIERON SU CARIÑO, AMOR, PACIENCIA Y COMPRESIÓN, ADEMÁS DE ENSEÑARME EL CAMINO A SEGUIR, LOGRANDO CON SU ESFUERZO MI DESARROLLO PROFESIONAL. GRACIAS PAPÁ Y MAMÁ, ES PARA Y POR USTEDES.

A TODA MI FAMILIA POR SER UNA PARTE MUY IMPORTANTE DE MI VIDA, ADEMÁS POR BRINDARME LA MOTIVACIÓN DE MI SUPERACIÓN. (LA DISTANCIA EN ESTE MOMENTO ES LO MENOS IMPORTANTE).

A MI ABUELITA REBECA POR EL INCANSABLE AMOR BRINDADO A LO LARGO DE MI VIDA.

A MIS GRANDES AMIGOS QUE SON PARTE FUNDAMENTAL Y ESLABONES DE MI VIDA: ENRIQUE, MIGUEL, RICARDO, FELIPE Y HECTOR, EN DONDE NO TENGO PALABRAS PARA EXPRESAR LO QUE HAN SIGNIFICADO PARA MI ADEMÁS DE SER UNA FUENTE DE MI SUPERACIÓN. GRACIAS A USTEDES.

A MIS AMIGOS O'FOS, EN ESPECIAL A: RICARDO, CLAUDINE, SANDRA, INGRID, EDUARDO (TOCALLO), MANUEL P., ARTURO Y MIGUEL ANGEL, Y DEMÁS QUE ME SOfORTARON DURANTE LA CARRERA EN MIS BUENOS Y MALOS MOMENTOS DE MI EXISTENCIA. SIN USTEDES TODO HUBIERA SIDO DISTINTO DE COMO FUE Y ME LAMENTARÍA. ESPERANDO QUE ESTA AMISTAD SEA INFINITA.

A MIS AMIGOS (AS) IO'S, O'S, QA'S Y OTROS O'FOS POR BRINDARME SU APOYO Y AMISTAD DURANTE TODOS ESTOS AÑOS Y OJALÁ PUEDAN SER MÁS.

A LAS MUJERES QUE PARTICIPARON EN MI VIDA MÁS INTIMAMENTE. GRACIAS POR ESTAR AHÍ Y COMPARTIR PARTE DE SU VIDA EN LA MÍA.

A VICKY J. POR HABERME BRINDADO CONFIANZA, COMPRENSIÓN,
AMOR, TERNURA Y CARIÑO PERO GRACIAS POR ESOS AÑOS.

A TODOS LOS MAESTROS QUE ME AYUDARON A SALIR ADELANTE
PARA LOGRAR MI OBJETIVO.

Y GRACIAS AL SEÑOR POR BRINDARME SU APOYO Y DARME LA
FUERZA PARA PODER RECOGER EL FRUTO DE AQUELLAS SEMILLAS
QUE FUERON SEMBRADAS AÑOS ATRÁS.

Durante mi primer día de trabajo en un laboratorio de investigaciones químicas, me intrigó ver un complejo aparato que se hallaba al final de la mesa de trabajo. Consistía en varias piezas de fino cristal, conectadas por tubos a una redoma de cinco litros, colocada sobre un hornillo eléctrico. Cada cinco minutos, el experimento recibía la atención de un científico enfundado en bata blanca, quien hacía unos ajustes. A media mañana, ya no pude contenerme, y le pregunté cuál era el producto deseado.

-Café -me respondió, muy serio. Este es nuestro percolador. Quiere una taza ?



ÍNDICE

A. ÍNDICE DE FIGURAS.	4
B. ÍNDICE DE TABLAS.	5
C. ABREVIATURAS.	6
D. RESUMEN.	8
1. INTRODUCCIÓN.	10
1.1 Hígado.	10
1.1.1 Características anatómicas y funcionales.	10
1.2 Cirrosis hepática.	12
1.2.1 Generalidades	12
1.2.2 Patogénesis de la enfermedad	15
1.2.3 Manifestaciones clínicas	17
1.2.4 Datos de laboratorio	19
1.2.5 Diagnóstico	20
1.2.6 Pronóstico	21
1.2.7 Tratamiento	22
1.3 Cofactores del daño hepático por alcohol.	23
1.3.1 Alcohol.	23
1.3.1.1 Pulque	24

1.3.1.1.1	Naturaleza y elaboración	24
1.3.1.1.2	Significado económico	25
1.3.1.1.3	Significado clínico	26
1.3.1.1.4	Pulque como fuente de enterobacterias	28
1.3.1.2	Determinación de los grados de consumo de alcohol	30
1.3.2	Infección por bacterias enteroinvasivas Gram-negativas	33
1.3.2.1	Características de las endotoxinas	34
2.	JUSTIFICACIÓN	37
3.	HIPÓTESIS	39
4.	OBJETIVOS	40
4.1	Objetivo general	40
4.2	Objetivos particulares	40
5.	METODOLOGÍA	41
5.1	Selección de pacientes	41
5.2	Coprocultivo y aislamiento de enterobacterias	43
5.3	Obtención del ADN bacteriano (fenol-cloroformo/alcohol isoamílico)	45
5.4	Cuantificación del ADN bacteriano (espectrofotometría)	46
5.5	Amplificación del ADN bacteriano (reacción en cadena de la polimerasa)	47
5.6	Identificación y análisis del ADN extraído y amplificado (geles de agarosa-bromuro de etidio)	48

5.7 Evaluación del daño hepático (Signos y Pruebas de funcionamiento hepático).	51
5.8 Análisis estadístico	52
6. RESULTADOS	53
6.1 Selección de pacientes.	53
6.2 Coprocultivos y aislamiento de enterobacterias.	55
6.3 Obtención de ADN bacteriano.	57
6.4 Amplificación e identificación del ADN bacteriano.	58
6.5 Evaluación del daño hepático.	60
6.6 Efecto de la ingesta de alcohol e infección por enterobacterias Gram-negativas sobre el daño hepático.	65
7. DISCUSIÓN	71
8. CONCLUSIONES.	80
9. APÉNDICE.	81
9.1 Equipo	82
9.2 Material	83
9.3 Reactivos	84
9.4 Preparación de soluciones	86
10. REFERENCIAS	89

A. ÍNDICE DE FIGURAS

<u>No figura</u>	<u>Nombre</u>	<u>Página</u>
1	Características morfológicas del hígado normal.	11
2	Alteraciones estructurales que sufre el hígado durante la fibrosis.	16
3	Modelo de transición celular de la cél estelar a la cél estelar activada.	18
4	Características estructurales de la membrana, pared celular y del LPS de una bacteria G (-).	36
5	Modelo propuesto de la infección por bacterias enteroinvasivas G (-)/LPS a través de la ingesta de pulque.	38
6	Coproductivo	44
7	Integridad del ADN bacteriano obtenido por el método fenol cloroformo/alcohol isoamílico.	59
8	Amplificación del gen FimA perteneciente a <i>Salmonella</i> utilizando el par de oligonucleótidos FPP1 y FPP2 en pacientes del DF y area conurbada.	61
9	Amplificación del gen IpaH perteneciente a <i>Shigella</i> /ECEI utilizando el par de oligonucleótidos IpaHIII/IpaHIV en pacientes del DF y area conurbada.	62
10	Amplificación del gen FimA perteneciente a <i>Salmonella</i> utilizando el par de oligonucleótidos FPP1 y FPP2 en pacientes de Pachuca, Hgo.	63
11	Amplificación del gen IpaH perteneciente a <i>Shigella</i> /ECEI utilizando el par de oligonucleótidos IpaHIII/IpaHIV en pacientes de Pachuca, Hgo.	64

B. ÍNDICE DE TABLAS

<u>No. de tabla</u>	<u>Nombre</u>	<u>Página</u>
I	Composición química del pulque	30
II	Adiciones durante la fermentación del pulque	31
III	Grados alcohólicos de diferentes bebidas comerciales	32
IV	Condiciones óptimas para realizar la técnica de PCR utilizando los oligonucleótidos (FPP1/FPP2 e IpaH III/ IpaH IV)	49
V	Selección de pacientes por lugar, edad y sexo.	54
VI	Tipo de bebidas ingeridas por los pacientes	54
VII	Consumo de alcohol expresado en g/semana	54
VIII	Incidencia de diarreas en pacientes del D.F. área conurbada y Pachuca, Hgo	56
IX	Número de coprocultivos que presentaron crecimiento a enterobacterias	57
X	Estado funcional del hígado	57
XI	Pacientes del D.F. y área conurbada con PCR (+) para enterobacterias Gram (-) que presentaron datos de hepatopatía y alteraciones en sus PFH	68
XII	Pacientes de Pachuca, Hgo con PCR (+) para enterobacterias Gram (-) que presentaron datos de hepatopatía y alteraciones en sus PFH.	59

C. ABREVIATURAS

A: Adenina

ALB: Albúmina

ALP: Fosfatasa Alcalina

ALT: Alanino Amino Transferasa

ADN: Ácido desoxirribonucleico

As: Ascitis

AST: Aspartato Amino Transferasa

Bd: Bilirrubina Directa

Bret: Bromuro de etidio

Bt: Bilirrubina Total

C: Citocina

Ce: Cerveza

D: Destilados

dNTP: Dinucleótido trifosfato

DO: Densidad Óptica

ECEI: *Escherichia coli* (enteroinvasiva)

EDTA: Ácido etilendiaminotetracético

Esp: Esplenomegalia

EtOH: Etanol

f: Femenino

G: Guanina

GGT: Gamma Glutamil Transpeptidasa

HCl: Ácido clorhídrico

Hep: Hepatomegalia

Ic: Ictericia

IL: Interleucina

INNSZ: Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán

KCl Cloruro de potasio
LPS Lipopolisacárido
m Masculino
M Molar
MgCl₂ · Cloruro de magnesio
NaCl Cloruro de sodio
P Putque
pb Pares de bases
PBS Amortiguador de fosfatos
PCR Reacción en Cadena de la Polimerasa
PFH Prueba de Funcionamiento Hepático
RPM Revoluciones por minuto
SDS Duodecil Sulfato de Sodio
STD Sangrado de Tubo Digestivo
STE Solución de lisis sin Proteinasa K
STEP Solución de lisis con Proteinasa K
T Timina
TBE Amortiguador de boratos para corrida
TGF Factor de Crecimiento Transformante
TNF Factor de Necrosis Tumoral
TP: Proteínas Totales
U Unidad enzimática
UV Ultravioleta
V. vino

D. RESUMEN

Las infecciones gastrointestinales por enterobacterias Gram-negativas son frecuentes en nuestra población. Se asocia la presencia de éstas enterobacterias invasivas durante el proceso de elaboración o almacenamiento del pulque, debido a que éste no sufre procesos de destilación, filtración o pasteurización. De ahí que sea común observar que las personas que ingieren pulque, presenten en algunas ocasiones alteraciones gastrointestinales acompañados de cuadros diarreicos.

Para el estudio se incluyeron un total de 48 pacientes provenientes del D.F. y área conurbada (22 pacientes) y Pachuca, Hgo. (26 pacientes), que presentaron cuadros diarreicos al momento de la entrevista o en los últimos 30 días, además de que consumían pulque de manera considerable. A estos 48 pacientes se les realizaron las PFH y los coprocultivos. En los coprocultivos se obtuvo un crecimiento neto de 91.6% del total de las muestras sembradas en medio Agar MacConkey. A partir del crecimiento se hizo la extracción del ADN, formando un banco de ADN bacteriano de 44 pacientes en total. Este ADN se sometió a una PCR para la identificación de los géneros de interés (*Salmonella*, *Shigella*, ECEI). Se utilizaron los oligonucleótidos específicos para identificar el gen Fim A perteneciente a *Salmonella* y el gen de invasividad IpaH perteneciente a *Shigella*/ECEI (FPP1/FPP2 e IpaH III/IpaHIV respectivamente). De los 26 pacientes de Pachuca, 6 fueron positivos para los géneros de interés:

y para el D F de los 22 pacientes 4 fueron positivos Para Pachuca, Hgo. tres pacientes presentaron infección para *Salmonella spp* y tres para *Shigella spp/ECEI*, mientras que para el D F y área conurbada presentaron dos pacientes infección para *Salmonella spp* y dos pacientes más para *Shigella spp/ECEI* Se observó una baja incidencia de casos positivos

Para evaluar el daño hepático se realizaron las PFH y la exploración clínica de los pacientes, donde se encontró que cerca del 50% de los pacientes tuvieron datos de hepatopatía Se encontró un desarrollo bacteriano en un 91% del total de las muestras Fue interesante notar que de los pacientes a quienes se les detectó las bacterias Gram-negativas por la técnica de PCR, solo un paciente no presentó daño hepático Por el contrario, el resto de los pacientes que fueron positivos mostraron que entre mayor era la ingesta de alcohol, mayor era el daño hepático Asimismo, en algunos casos dependiendo de la severidad de los cuadros diarreicos mayor fue el daño hepático Es importante señalar que la ausencia de positividad para detectar Gram-negativas, no necesariamente significó ausencia de infección Por el contrario, es posible que la infección existente fuera debida a otro género de bacteria Los resultados de este estudio sugieren que la infección por bacterias Gram-negativas es un factor que influye en el desarrollo del daño hepático No obstante estudios posteriores incluyendo un mayor número de pacientes podrán aclarar esta cuestión.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Hígado

1.1.1 Características anatómicas y funcionales

El hígado es la glándula más grande del cuerpo humano, pesa 1,400 g. en promedio en el adulto. Se localiza bajo el diafragma y ocupa la mayor parte del hipocondrio derecho y una parte del epigastrio en el abdomen. Está cubierto casi en su totalidad por peritoneo (cápsula de Glisson, formada principalmente de colágena tipo I y III); Se divide en dos lóbulos principales, derecho e izquierdo, separados por el ligamento falciforme. Los lóbulos cuadrado y caudado, de posiciones inferiores, guardan relación con el derecho (fig. 1)

Los lóbulos del hígado consisten en numerosas unidades funcionales observables al microscopio. Los lobulillos se componen de cordones de células hepáticas (o hepatocitos) dispuestos en forma radial alrededor de una vena central. En éstos se observan espacios revestidos por endotelio, los sinusoides por los cuales circula la sangre. Los sinusoides presentan también un revestimiento parcial de células estrelladas llamadas células de Kupffer de actividad fagocítica¹

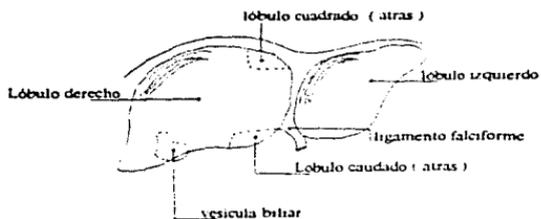


Fig. 1 Características morfológicas del hígado normal.
(tomado de Tortora G., 1987) ¹

El hígado juega un papel importante en la homeostasis. Es el sitio primario de regulación del metabolismo energético, toma y procesa los nutrientes ingeridos por el organismo controlando la distribución a tejidos extrahepáticos. Sintetiza proteínas esenciales, enzimas y cofactores requeridos para la digestión de los nutrientes que permita llevar a cabo una función normal del organismo. Finalmente es crucial para la detoxificación y eliminación de una gran variedad de compuestos endógenos y exógenos ².

1.2 Cirrosis hepática

1.2.1 Generalidades

El término cirrosis tiene su origen en la palabra griega *Kirrhos* que significa color café-naranja, fue por lo tanto el color leonado del hígado más que su consistencia el que dió el nombre a la enfermedad. La lesión fundamental en el desarrollo de la cirrosis fue señalada en 1889 por Ackerman y en 1904 por Kretz, ellos opinaron que 'la pérdida del parénquima hepático era debido a necrosis hepatocelular con desarrollo de tejido conectivo' ³.

La cirrosis es una enfermedad crónica del hígado con destrucción difusa y regeneración de las células del parénquima hepático. Se caracteriza por un incremento del tejido conectivo que tiene como resultado una desorganización de la arquitectura lobular, dando fibrosis y nódulos de regeneración ⁴. Dentro de

las causas de cirrosis las más importantes son el alcoholismo y las hepatitis virales ².

Hasta hace más de veinte años se pensaba que la enfermedad hepática del alcohólico se debía exclusivamente a desnutrición y no a los efectos tóxicos directos del alcohol. característicamente la cirrosis del alcohólico no se denominaba "cirrosis alcohólica" sino "cirrosis grasa nutricional". Durante 1959-1969 se demostró que el etanol tenía un importante efecto sobre el metabolismo intermedio del hígado, principalmente de lípidos ^{4,5}.

El 90% de los alcohólicos tienen hígado graso. esto se puede considerar como un signo pronóstico de la aparición de cirrosis y esto explicaría la hipertensión portal en el hígado graso.

La cirrosis alcohólica es una secuela de la hepatitis alcohólica precedente. la enfermedad se presenta por lo general solo tras años de ingesta excesiva del alcohol.

Se ha sugerido que la Dosis Efectiva 50 (dosis cirrótica media) corresponde a un consumo diario de etanol de 180g durante 25 años ³. En general, cuanto más largo sea el tiempo de consumo diario de alcohol, mayor es la probabilidad de presentar hepatitis alcohólica y cirrosis.

En los años noventas, la enfermedad se sigue conservando entre las diez primeras causas de defunción, es decir, el comportamiento epidemiológico es endémico más que epidémico lo que hace su control más complejo. En México

las condiciones propicias para el consumo de alcohol se dan a veces desde el destete de los lactantes ya que algunos grupos lo hacen con pulque ¹⁰.

Desde hace tiempo se ha estudiado al alcoholismo desde el punto de vista genético. Aunque se sugiere que hay una predisposición familiar, todavía no se ha determinado cual es la participación del factor hereditario. Lo que es claro, es que existen reglas socio-culturales y de aprendizaje que juegan un papel muy importante en el desarrollo del alcoholismo.

Se enfatiza la posible implicación de los factores genéticos y de predisposición constitucional para el desarrollo de cirrosis ³. Por ejemplo, se ha visto que algunos grupos étnicos presentan una eliminación de etanol más lenta y va acompañada con signos vasomotores más severos y prolongados¹¹. Sin embargo, observaciones clínicas y experimentales señalan que los eventos finales en la cirrosis producida por alcohol son similares a otros tipos de cirrosis de etiología no alcohólica.

Como consecuencia del daño en células parenquimatosas por alcohol y por los efectos de desviación de la sangre alrededor del lóbulo, muchas de las funciones biosintéticas se reducen, lo cual se refleja en la poca cantidad de proteínas plasmáticas y factores de coagulación además de la reducida capacidad de manipular sustancias endógenas y exógenas como la bilirrubina, amonio y otras drogas ².

1.2.2 Patogénesis de la enfermedad

La cirrosis hepática es un estado patológico final, inducido por agentes biológicos (infecciones) o químicos (consumo de alcohol) capaces de producir daño crónico generalizado en el hígado. La enfermedad se caracteriza por acumulación de colágena, alteración en la arquitectura del hígado y formación de nódulos regenerativos. En general todas las enfermedades crónicas del hígado presentan una reacción patobioquímica llamada fibrosis, independientemente del agente etiológico que la produzca ¹²⁻¹³.

La fibrosis progresiva del hígado es una causa importante de morbilidad y mortalidad. La fibrosis del hígado, causada por un insulto al órgano, conlleva a un trastorno de arquitectura hepática, regeneración nodular y pérdida funcional ² (fig.2).

La característica sobresaliente de la cirrosis es el depósito de colágena y proteínas de matriz alrededor de los hepatocitos con regeneración nodular. El hígado normal contiene pequeñas cantidades de colágena tipo I y III. Estas se incrementan generalmente en hígado cirrótico, particularmente la colágena tipo I y proteínas de matriz como fibronectina y laminina ¹⁴. Una de las células hepáticas que está estrechamente relacionada con el desarrollo de fibrosis es la célula estelar hepática. Las células estelares, o células de Ito, se encuentran en el espacio de Disse en contacto con las células de Kupffer.

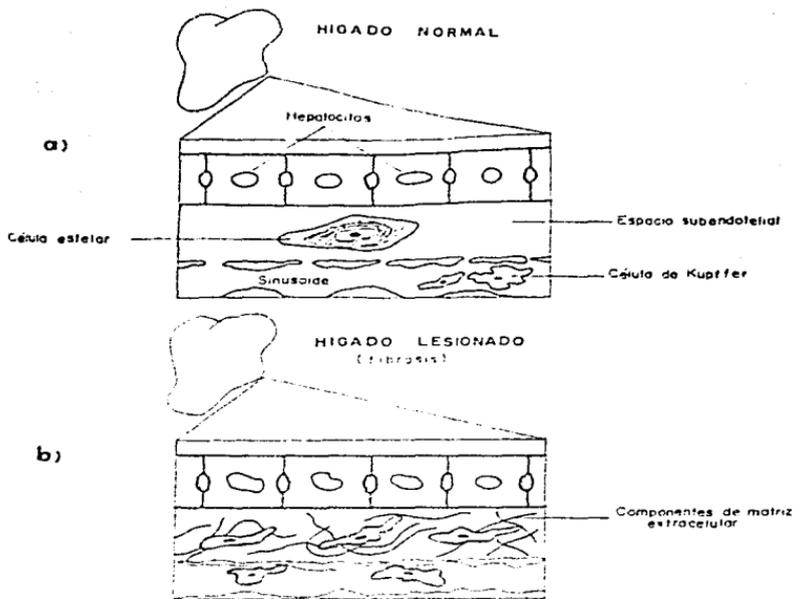


Fig. 2 Alteraciones estructurales que sufre el hígado durante la fibrosis hepática. a) Aspecto normal del espacio subendotelial. b) Activación de las células estelares, caracterizada por la proliferación y fibrogenesis, asociado a un cambio de densidad en la matriz extracelular. (tomado de Flier, J., et al. 1983) ⁵⁶

Se sabe que las células estelares pierden el retinol acumulado en respuesta a varios agentes fibrogénicos y éstas células son transformadas a células semejantes a fibroblastos, células transicionales, éstas tienen una capacidad más alta de sintetizar colágena y componentes de matriz. Las células estelares cambian a células transicionales en el hígado de pacientes alcohólicos que desarrollan fibrosis (fig. 3).

Las funciones de las células estelares van desde el almacenaje de lípidos y vitamina A hasta la síntesis de proteínas (componentes de matriz extracelular) ². Una pregunta importante, aún sin resolver, sobre la enfermedad crónica del hígado es lo que concierne a la señal y estímulo que causa dicha transformación. El TGF- β 1 probablemente juega un papel central en la fibrosis hepática. El TGF- β 1 es un potente estimulador de la síntesis de colágena en las células estelares así como en los hepatocitos ¹⁵. La IL-1, IL-6 y el TNF- α son secretados por las células de Kupffer o células sanguíneas como monocitos, polimorfonucleares ó plaquetas que actúan como moduladores del TGF- β 1 y de las células estelares ².

1.2.3 Manifestaciones clínicas

La cirrosis alcohólica puede ser asintomática en un 10% a 20% de los pacientes, pero comúnmente presentan complicaciones propias de la

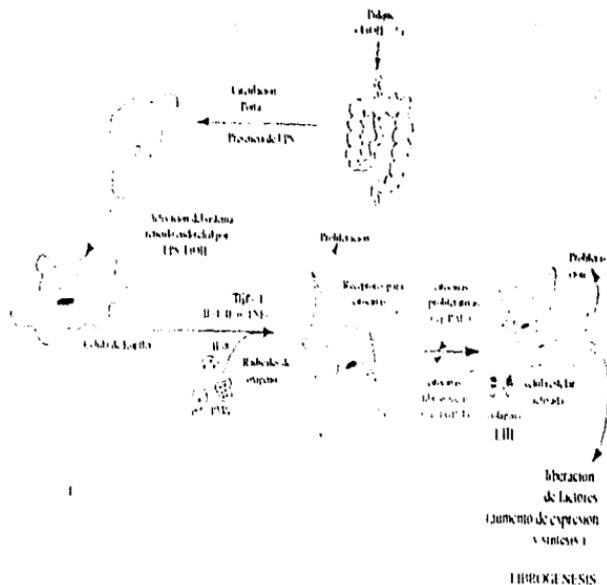


Fig. 1 Modelo de transición celular de la célula estelar a la célula estelar activada (miofibroblasto)

Inicia con la proliferación de la cél. estelar junto con la expresión de receptores para citocinas. Este estímulo es ayudado por la acción de factores secretados por cel. de Eupffer. En esta etapa ocurre la síntesis de una pequeña cantidad de colágeno. Las cel. estelares son activadas a causa de citocinas proliferativas y fibrogénicas provocando que se secrete colágeno tipo I y III de manera excesiva junto con otros componentes de matriz extracelular, favoreciendo de esta manera la fibrogenesis.

(tonado de Gressner, A., 1995)

enfermedad hepática crónica, como la ictericia, ascitis, esplenomegalia, hepatomegalia y sangrado de tubo digestivo, o bien la enfermedad hepática puede ser detectada cuando el paciente es evaluado por un evento no relacionado. Entre los pacientes masculinos cirróticos la feminización y el hipogonadismo son mucho más comunes. En estos pacientes se presenta con frecuencia la hemocromatosis en comparación con los pacientes que presentan hepatitis crónica.

Las complicaciones de la cirrosis alcohólica incluye la ascitis, peritonitis bacteriana espontánea, síndrome hepatorenal, encefalopatía hepática y carcinoma hepatocelular.

1.2.4 Datos de laboratorio

Las anomalías en las PFH en la cirrosis alcohólica son menos pronunciadas que en la hepatitis alcohólica. Muchos de los valores de las pruebas hepáticas están cerca de los valores normales.

Las anomalías cuando se presentan pueden incluir un ligero incremento en transaminasas ALT y AST no sobrepasando cinco veces su valor normal¹⁰. Alteración en la Bt y Bd, lo cual puede ser traducido como un trastorno de su captación, conjugación así como de su eliminación, considerándose estos cambios como un factor pronóstico. Hay un

descenso en la cifra de TP, pero más importante es el descenso de la concentración de ALB. El origen de esta hipoalbuminemia es por la disminución de la síntesis hepática y por la hemodilución. Existe también una posible elevación de las globulinas.

La GGT es más sensible que las transaminasas y la ALP, cuando se sospecha de una hepatopatía crónica. Es especialmente útil en casos de abuso de alcohol ¹⁰. La ALP está elevada en el 70% de los casos de cirrosis no sobrepasando más de tres veces su valor normal. El tiempo de protrombina forma parte de los índices pronósticos de gravedad de la cirrosis, éste parámetro suele estar alargado, debido a una deficiencia de la síntesis de los factores de la coagulación ¹⁸. El hiperesplenismo, en la cirrosis hepática, por sí sola no permite niveles de plaquetas menores de 50,000/mm³, y la esplenectomía o cirugía no está indicada ².

En la biometría hemática la anemia es quizá el signo hematológico más frecuente en la cirrosis hepática. Se observa con frecuencia un origen multifactorial como hemólisis, STD, deficiencia de vitamina B12, ácido fólico, plaquetopenia y leucopenia.

1.2.5 Diagnóstico

El diagnóstico diferencial de la cirrosis hepática debe realizarse con numerosos procesos que pueden cursar con hepatomegalia, alteraciones de las PFH, ictericia, ascitis o hipertensión portal.

Un examen físico cuidadoso puede permitir descubrir estigmas cutáneos de gran valor diagnóstico. Junto con ello la realización de las exploraciones complementarias permitirá establecer con seguridad el diagnóstico de la cirrosis. Un segundo estudio es el diagnóstico etiológico ya que permite precisar mejor el pronóstico o determinar la adopción de ciertas medidas profilácticas o terapéuticas en los familiares ¹⁸.

El diagnóstico etiológico se basa en los datos de la anamnesis, en la observación de otras consecuencias de la ingesta excesiva como macrocitosis, trastornos de la memoria o del comportamiento, y en el hallazgo en la biopsia hepática.

La evolución de la cirrosis hepática alcohólica es variable pero en general su supervivencia depende al menos en parte del abandono o prosecución del hábito alcohólico.

1.2.6 Pronóstico

No puede valorarse en cifras absolutas de supervivencia ya que esta enfermedad puede evolucionar en forma subclínica y permanecer sin diagnosticar durante años. No es raro observar largas supervivencias de más de 10 años en pacientes no descompensados en quienes el diagnóstico se realizó en forma casual. Por el contrario, el pronóstico se ensombrece notablemente desde el momento en que aparece la primera descompensación clínica. No obstante se dispone de datos objetivos que permiten en muchos casos emitir un pronóstico aproximado.

El pronóstico de la cirrosis alcohólica mejora si el paciente deja de beber a menos de que se halle en una fase muy avanzada con hipertensión portal y varices esofágicas. La muerte de los enfermos cirróticos ocurre pocas veces por insuficiencia hepatocelular progresiva. Lo habitual es que esté en relación con la aparición de hemorragias digestivas, ascitis e insuficiencia renal o infecciones graves y también con el desarrollo de carcinoma hepatocelular ¹⁶.

1.2.7 Tratamiento

En contadas ocasiones se dispone de medidas terapéuticas para realizar un tratamiento etiológico de la cirrosis hepática. Por el momento no existen pruebas de que la administración de agentes antifibrogénicos sean eficaces en el tratamiento de la cirrosis.

La abstinencia del alcohol, recomendada a todos los enfermos cirróticos, es especialmente valiosa en los enfermos con lesiones hepáticas alcohólicas. La cirrosis hepática compensada no requiere ningún tratamiento especial. El reposo y los regímenes dietéticos no son en esta fase de utilidad. Debe permitirse al paciente realizar una vida social, laboral normal y alimentarse con una dieta variada y equilibrada ¹⁹.

1.3 Cofactores del daño hepático por alcohol

1.3.1 Alcohol

El alcohol (etanol) es un compuesto químico que ha estado ligado a la humanidad. Se ha usado con fines diversos, aunque su empleo más común es como euforizante y ansiolítico ¹⁰.

Seguramente cuando el hombre conoció el alcohol y disfrutó de sus efectos placenteros, nunca imaginó el daño que era capaz de producirle a lo largo de la historia de la humanidad. El alcohol se ha incorporado a la vida del hombre y ha oscilado entre el uso moderado y placentero, hasta el abuso intemperante y la dependencia que lo convierten en un agente tóxico de alto riesgo.

La asociación de la cirrosis hepática con el consumo de alcohol en cantidades excesivas es conocida desde la antigüedad. Esto surgió de la observación de que los grandes bebedores desarrollaban cirrosis mucho más

frecuentemente que los no bebedores. Además está demostrada una relación entre el consumo de alcohol y mortalidad por cirrosis. La toxicidad hepática del alcohol *per se* ha sido demostrada, pero lo que no está completamente esclarecido es la causa por la que solo una parte de los alcohólicos crónicos desarrollan cirrosis hepática. Un factor crucial es la cantidad y duración de la ingesta alcohólica, ya que hasta un 75% de las personas que ingieren más de 160 g/día de EtOH presentan lesiones hepáticas graves al cabo de 15 años. Se ha visto que las infecciones por bacterias enteroinvasivas Gram-negativas, así como los factores inmunológicos genéticos o también por llevar una mala nutrición, pueden actuar como factores predisponentes para el desarrollo de daño hepático.

El mecanismo por el cual el alcohol llega a producir cirrosis no es bien conocido. La esteatosis no es una lesión pre-cirrótica pero sí lo es la hepatitis alcohólica. Probablemente el alcohol es también capaz de inducir cirrosis por mecanismos distintos de la hepatitis alcohólica, relacionados fundamentalmente con su capacidad para inducir fibrosis progresiva del hígado.¹⁴

1.3.1.1 Pulque

1.3.1.1.1 Naturaleza y elaboración

El pulque es una bebida tradicionalmente fermentada de bajo grado alcohólico. Es obtenido por fermentación del aguamiel el cual es la savia de

muchas especies de agave (maguey). El aguamiel es extraído de plantas que tienen entre 8 a 10 años de edad. El tallo floral es cortado con una clase especial de cuchillo, la operación es conocida con el nombre de "castración".

El jugo de la savia se acumula gradualmente en la cavidad formada en el centro del agave. En esta cavidad el aguamiel es removido diariamente por una succión oral a través de un "acocote" (instrumento largo que funciona como popote). El aguamiel es transferido a unos barriles para transportarlo al sitio donde se procesa el pulque, ahí es fermentado en tanques de madera, cuero, plástico o fibra de vidrio (tinacal).

El pulque es entonces distribuido a las pulquerías ó a pequeñas tiendas llamadas "toreos" ^{17, 18}.

En las ciudades pequeñas de las zonas rurales el pulque proviene de pequeños productores y es donde aún se puede beber el pulque de buena calidad, con su moderado sabor agrídulce, sin olor, casi sin viscosidad y con diferentes grados de alcohol. Caso contrario a lo que sucede en las grandes urbes donde solo de un 40% a un 50% pasa por las "aduanas" ya que todo lo demás pasa de contrabando para venderse en pulquerías clandestinas ¹⁹.

1.3.1.1.2. Significado económico

Para los campesinos el maguey no es un cultivo exclusivo sino complementario, tanto desde el punto de vista económico como del uso racional de suelo. La planta exige muy pocos cuidados, proporciona alimento, abono, protección contra el ingreso de animales y es el medio para evitar la erosión. Cuando llega a la etapa final de su vida es posible obtener un ingreso adicional con la venta del gusano de maguey, el mexiote y del pulque, además de que antes se sembraron o se vendieron los hijuelos.

A lo largo de la historia el maguey y el pulque han tenido un destacado lugar en la satisfacción de las necesidades del pueblo mexicano. Si bien su contribución económica ha sido importantísima, es posible determinar su aporte a lo que los economistas llaman el Producto Interno Bruto. Pese a ello, si es posible señalar que la participación es cada vez más pequeña y que el declive se ha acentuado drásticamente.¹⁹

1.3.1.1.3 Significado clínico

El pulque es una bebida que no sufre procesos de destilación, filtración ó pasteurización, por lo que se sugiere que puede estar contaminado de una gran variedad de flora así como de sus correspondientes productos. Es tradicionalmente consumido en el centro de México como parte de una dieta

normal desde la infancia. Frecuentemente provee un 15% de los requerimientos energéticos en adultos de 20 a 50 años (ingesta promedio de 1 a 2 L).

Ningún estudio ha podido demostrar que la cerveza, el vino o los licores destilados sean mejores o causen menos daño que el pulque ¹⁹

Algunos estudios microbiológicos del pulque se han enfocado principalmente al aislamiento de diferentes especies de levaduras *Lactobacillus spp* parece ser la responsable de la producción de ácido láctico mientras que *Saccharomyces cerevisiae* y *Zimomonas mobilis* son las principales productoras de alcohol. Se ha observado que estos microorganismos tienen una acción antimicrobiana contra coliformes y levaduras filamentosas, previniendo así la posible contaminación contra microorganismos enteropatógenos ²⁰⁻²²

Actualmente ciertos estudios clínicos asocian la presencia de diarrea con la ingesta de pulque. Asimismo, el consumo de pulque ha sido asociado a la gran prevalencia del daño hepático. De hecho, la mortalidad causada por la cirrosis hepática en México es más alta en aquellos estados productores de pulque ²³

Investigaciones en animales han mostrado que las endotoxinas juegan un papel importante en el desarrollo de la enfermedad hepática alcohólica ²⁴. La toxicidad en el hígado a través de endotoxinas producidas por las bacterias Gram-negativas se asocia con el incremento del consumo de alcohol.

Se ha reportado que pacientes con alto consumo de alcohol presentan un elevado nivel de endotoxinas producidas por bacterias Gram-negativas, y esto se asocia con la presencia de daño hepático²⁵⁻³⁰

1.3.1.1.4 Pulque como fuente de enterobacterias

El pulque como tal es una bebida de alto arraigo en México. El contenido de alcohol en esta bebida es considerablemente bajo (ver tabla I), pero se ha observado que contiene otra serie de elementos que juegan un papel importante para el desarrollo del daño hepático (ver tabla II). Fuentes indirectas señalan que durante el proceso de fermentación del pulque se utiliza materia orgánica desconocida para realizar la fermentación del mismo.

Como se señala previamente el pulque es un reservorio importante de microorganismos, ya que su composición lo hace un medio de cultivo rico, en donde muchos microorganismos heterótrofos crecen fácilmente en él. Esto sucede desde el almacenamiento, en el momento de procesarlo o bien cuando el producto es combinado con otros elementos para su rápido proceso de fermentación, lo que hace suponer la presencia de bacterias Gram-negativas en el pulque.

Por todo lo anterior se ha sugerido la posibilidad de que en el pulque haya la presencia de bacterias enteropatógenas de carácter invasivo como ECEI, *Shigella* o *Salmonella*, la presencia de éstas bacterias además de

producir los cuadros diarréicos típicos, pueden llevar a alteraciones a distancia por la presencia de sus endotoxinas en la sangre ³¹.

Se asocian cuadros diarréicos en los pacientes que ingieren pulque posiblemente por la presencia de enteropatógenos de carácter invasivo. Se cree que si una persona ingiere pulque contaminado de manera crónica, puede provocar que estos enteropatógenos o productos de las mismas (endotoxinas) puedan llegar a torrente circulatorio y provoquen una respuesta inmune acelerada.

En México la diarrea es una causa importante de morbilidad y mortalidad. Desde edad pequeña los niños presentan diarreas generalmente ocasionadas por bacterias como *Shigella*, *Campylobacter*, *Salmonella* y otros no patógenos; lo cual puede estar asociado con la costumbre de beber pulque desde la niñez, en algunos estados de nuestro país.

Como se ha comprobado, el pulque en un alto porcentaje no sigue los lineamientos de sanidad adecuados. Su fabricación se lleva a nivel casero, en condiciones poco higiénicas.

México es un país que reporta tasas de mortalidad extraordinariamente elevadas debido a cirrosis hepática producida por consumo de alcohol. Algunos países que tradicionalmente tienen un alto consumo de alcohol, tienen una frecuencia mucho menor de mortalidad por cirrosis hepática producida por el consumo de alcohol con respecto a nuestro país ³¹⁻³².

Se observa una alta incidencia de mortalidad por afecciones hepáticas en algunas regiones del país. La mayor proporción de muertes reportadas en los últimos años involucra solo unos cuantos estados federativos que se agrupan en las zonas de las mesetas centrales del país, siendo ésta el área de mayor producción de pulque en México.

1.3.1.2 Determinación de los grados de consumo de alcohol

Como fué señalado previamente el pulque es una bebida cuyo contenido de alcohol es bajo y el grado de consumo va a depender directamente si la entidad lo produce o no, es decir, en estados como Pachuca, el consumo es mayor por ser un gran productor de pulque, caso contrario con lo que ocurre en el D.F.

Como se observa en la tabla III, se puede comprobar que el pulque es una bebida alcohólica fermentada cuyo contenido de alcohol es bajo en comparación con otras bebidas alcohólicas comerciales.

La determinación de los grados de consumo de alcohol que presentan las diferentes bebidas alcohólicas se ha hecho en base a los siguientes criterios.

$$\rho = m / V$$
$$m = \rho V$$

donde.

$$\rho = 0.789 \text{ g / dL a } 20^{\circ}\text{C}$$

$$V = ^{\circ} \text{ Gay Lussac}$$

$$m = \text{g de EtOH / 100 mL}$$

TABLA I. COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL PULQUE

Conc. de etanol :	3.1 +/- 1.1 g/dL
desproteínizado con ácido perclórico	
Conc. de proteínas :	0.3 g/dL
Conc. de carbohidratos :	0.35 g/dL = 43 Kcal / dL 30 - 70 J/L
Grado alcohólico :	4.0 - 6.0 °G.L.
Acidez total (ácido láctico) :	400 - 700 mg/100mL
Valor de pH :	3.5 - 4.0
Densidad a 20°C :	0.996 g/cm³

(tomado de Kershenovich, D., y cols. 1996)³¹

TABLA II. ADICIONES DURANTE LA FERMENTACIÓN DEL PULQUE.

INGREDIENTE	No. DE MUESTRAS	% DE TOTAL
Aguamiel	43	33
Aguamiel + Pulque	33	25.4
Aguamiel + Azúcar	10	7.7
Aguamiel + Pulque + Agua	1	0.8
Aguamiel + Pulque + Agua + Bicarbonato	1	0.8
Aguamiel + Pulque + Agua + Bicarbonato + Azúcar	1	0.8
Aguamiel + Pulque + Cáscara de plátano + Hojas de durazno	1	0.8
Aguamiel + Materia orgánica desconocida	40	30.8
Total de muestras analizadas	130	100

(tomado de Kershenobich, D., y cols. 1996)³¹

TABLA III. GRADOS DE ALCOHOL EN DIFERENTES BEBIDAS COMERCIALES

BEBIDA	° G.L.	g de EtOH / 100 mL
Pulque	5	3.945
Cerveza	6	4.734
Vino de mesa	12	9.468
Ron, Vodka, Brandy	40	31.560
Whisky, Tequila	43	33.927

(tomado de Kershenobich, D., y cols. 1996) ³¹

En base al criterio anterior se puede simplificar la determinación de los gramos de etanol por bebida estándar, definiéndose de la siguiente manera:

1 bebida estándar	1 = lata de cerveza	1 medida de = whisky,brandy, vodka,ron,etc.	1 = vaso de vino	1/2 = litro de pulque
todo lo anterior equivale a 12 gramos de alcohol absoluto				

(tomado de Kershenobich, D., y cols. 1996) ³¹

1.3.2 Infecciones por bacterias enteroinvasivas Gram-negativas

Existen tres géneros de bacterias enteroinvasivas Gram-negativas que son encontradas frecuentemente en enfermedades gastrointestinales : *Salmonella*, *Shigella* y ECEI. Estos tipos de enterobacterias, además de producir endotoxinas, tienen la capacidad de penetrar y destruir el epitelio intestinal. Están asociadas comúnmente con gastroenteritis y disentería, en la cual la sangre aparece a menudo en los cultivos de heces. La destrucción del epitelio también contribuye a la entrada de bacterias y endotoxinas hasta la circulación. La fiebre es típica en este tipo de infecciones entéricas.

Un número de estudios en muchos países reportan evidencias clínicas e histopatológicas de hepatitis con fiebre tifoidea. La hipertrofia de células de Kupffer y la proliferación es típica en todas las series celulares. La prevalencia de hepatitis con fiebre tifoidea se encuentra entre un 10% y 40%³³⁻³⁶.

La diarrea bacteriana enteroinvasiva en México es endémica, pero existe una prevalencia actual que en la mayoría de los casos no se reporta. Por ejemplo la infección con *Salmonella* se considera que ocurre en un 15% de los casos de diarrea en niños mexicanos³⁷.

Existen evidencias de que el consumo de alcohol crónico y la infección facilitan el escape de endotoxinas desde el lumen intestinal hasta la circulación sistémica. Estas endotoxinas sensibilizan macrófagos para producir altos

niveles de citocinas; esto hace suponer que los alcohólicos infectados con este tipo de bacterias presenten altos niveles de endotoxinas. Se ha sugerido que los niveles altos de endotoxinas lleven a las citocinas y/o factores de crecimiento a inducir hepatotoxicidad ³⁶.

1.3.2.1 Características de las endotoxinas

Todas las bacterias Gram-negativas tienen una membrana externa alrededor de la pared celular. Esta pared externa está constituida por lipoproteínas, fosfolípidos y lipopolisacáridos (LPS).

Los LPS están constituidos de un componente lipídico llamado lípido A que está ligado a un complejo de polisacáridos. Este complejo polisacárido está dividido en dos regiones: un centro polisacárido que lo conservan intacto todas las bacterias Gram-negativas, y la otra es una región externa que muestra gran variabilidad entre las especies de bacterias Gram-negativas. Esta región es conocida como el antígeno-O ³⁷⁻³⁸.

El lípido A es la parte que va a ejercer la acción de endotoxina. Estas son liberadas cuando la bacteria muere o cuando la pared celular se rompe, es decir, cuando hay lisis celular (fig.4).

Todas las endotoxinas producen los mismos signos y síntomas (escalofríos, fiebre, debilidad, dolor, choque y muerte), aunque no al mismo

grado Cuando las bacterias Gram-negativas son fagocitadas por los polimorfonucleares, se degradan en las vacuolas, y los LPS se liberan ³⁹.

Al liberarse los LPS a la circulación se van a presentar las citocinas en respuesta a éste estímulo. Se ha visto que cuando se expone una porción de intestino de rata al etanol, en condiciones *in vitro*, se incrementa la permeabilidad de la mucosa hacia un gran número de moléculas, entre las que se encuentran las endotoxinas ⁴⁰.

Se piensa que las endotoxinas son factores que contribuyen al daño hepático, pues se observa que cuando se reduce de alguna manera a éstas endotoxinas, la enfermedad hepática mejora ⁴¹.

Los principales daños producidos por las endotoxinas en tejidos extrahepáticos esta lejos de ser bien conocidos. Se sabe que la endotoxina, a través del lípido A, interactúa con un número de células incluyendo las células de Kupffer y las células endoteliales ⁴².

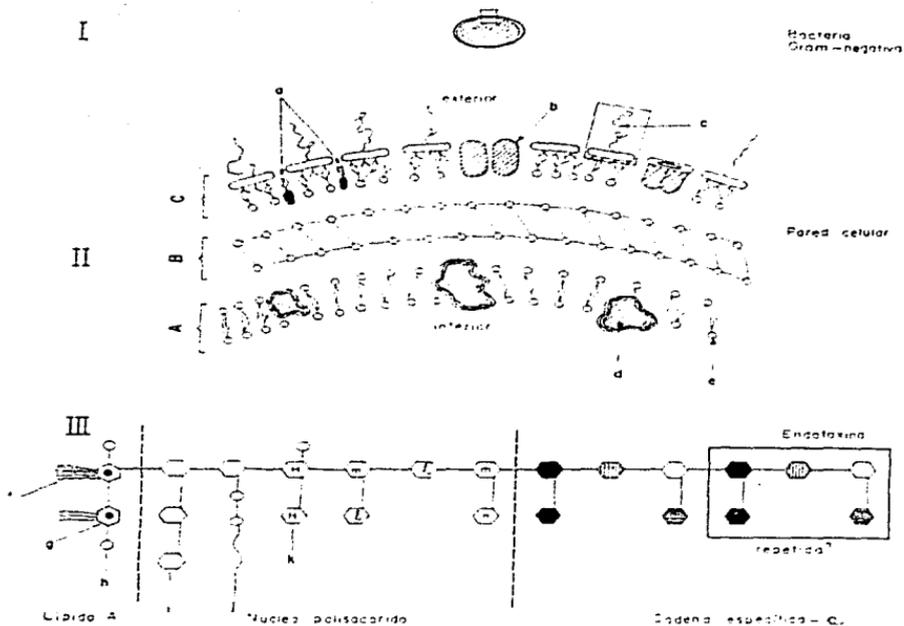


Fig. 4 Características estructurales de la membrana, pared celular y del LPS de una bacteria Gram-negativa. I. Bacteria Gram-negativa. II. Pared celular de la bacteria (A: membrana citoplasmática; B: periplasma; C: membrana externa; a: lipoproteínas; b y d: proteínas; c: (LPS); e: (fosfolípidos) III: LPS mostrando los tres dominios característicos: un lípido A, un núcleo de azúcares y los azúcares externos conocidos como cadena específica O, la cual varía de especie a especie (f: ácidos grasos; g: glucosaminas; h: fosfatos; i: Kdo; j: etanolamina; k: heptosa; l: galactosa; m: glucosamina; n: N-acetil glucosamina) (tomado de Rietschel, E., et al. 1992) ²⁹

2. JUSTIFICACIÓN

En México existen una gran cantidad de bebidas alcohólicas, una de las más importantes a nivel de consumo en la población de bajos recursos es el pulque. Esta bebida juega un papel importante en el proceso salud-enfermedad. Por un lado, su gran consumo en ciertas regiones del país lo asocian al desarrollo de cirrosis hepática, y por otro lado, a infecciones gastrointestinales, debido a la presencia de enterobacterias invasivas (entre ellas, *Salmonella*, *Shigella* y ECEI).

Las enterobacterias son microorganismos patógenos para el hombre, estas tienen como característica fundamental presentar endotoxinas, que juegan un papel importante para su patogenicidad. Al llegar a circulación por ser factores solubles, pueden llegar a producir una endotoxemia y provocar una respuesta inmune en el huésped. Como consecuencia el hígado puede llegar a tener una sobreproducción de citocinas como IL-1, IL-6, IL-8 y TNF. La presencia de citocinas en exceso puede provocar a su vez una cascada de liberación de otros factores de crecimiento y otras moléculas (como proteínas de matriz extracelular) dentro de las diferentes células y a la larga, pueda llevar al daño hepático crónico.

Puesto que la cirrosis hepática se origina como consecuencia de la ingesta aguda o crónica del alcohol, se sugiere que las infecciones gastrointestinales producidas por enterobacterias presentes en bebidas o

alimentos que consume el hombre, entre ellos el pulque, puedan ser un cofactor que indirectamente los conlleve al daño hepático (fig 5)

Un estudio preliminar realizado en el INNSZ, sobre el cultivo y aislamiento de bacterias enteroinvasivas Gram-negativas presentes en pulque, recolectados de diferentes zonas del país, mostró la presencia de enterobacterias Gram-negativas en el 60% de las muestras analizadas. Entre las enterobacterias Gram-negativas encontradas se incluyen *Yersinia pseudotuberculosis*, *Pseudomonas spp.*, *Hafnia alvei*, *Salmonella spp.* y *Escherichia coli*

Como se menciona, durante el proceso de elaboración y almacenamiento, el pulque se contamina con bacterias patógenas para el hombre. En ese mismo estudio se pudo observar que el valor medio de pH encontrado para las muestras fue de 3.96 (± 0.3), es decir, todas ellas tuvieron características ácidas. Además se encontró que la cantidad de LPS encontradas por la Prueba del Lisado de Amebocitos fue de 365.5 (± 227.6 $\mu\text{g/mL}$), lo que indica que la presencia de enterobacterias Gram-negativas fue muy variable en ellas*.

Sin embargo, aunque estos datos no han sido todavía publicados, nosotros podemos plantear nuestra hipótesis de trabajo

* Datos no publicados del Depto. de Gastroenterología del INNSZ

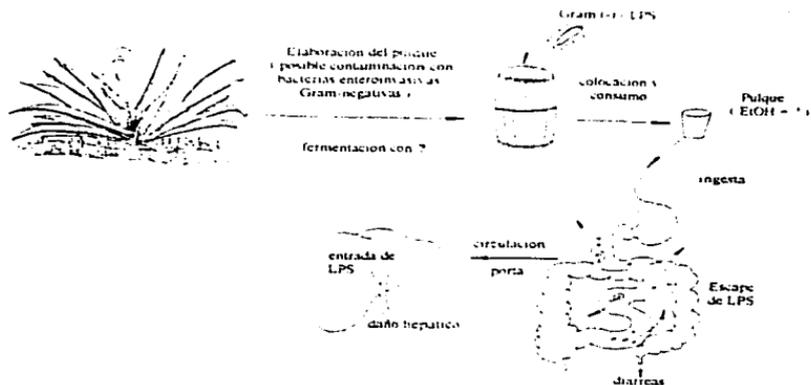


Fig. 5 Modelo propuesto de la infección por bacterias enteroinvasivas Gram-negativas/LPS a través de la ingesta de pulque. El pulque proviene del aguamiel fermentado obtenido del maguey. El pulque puede contaminarse con enterobacterias invasivas Gram-negativas. Si se hace un consumo de manera crónica existe la posibilidad de infectarse. Estas enterobacterias junto con los LPS llegan a sistema porta y posteriormente a hígado. Aquí se desencadena una serie de estímulos que llevan a la producción de citocinas y a la larga al daño hepático, además de presentar los cuadros diarréicos debido a la infección.

3. HIPÓTESIS

La ingesta de pulque asociada a la presencia de bacterias enteroinvasivas Gram-negativas son dos factores predisponentes al daño hepático crónico.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

▲ Identificar la presencia de bacterias enteroinvasivas Gram-negativas en coprocultivos de pacientes con ingesta de pulque y hacer la correlación con la presencia o ausencia de daño hepático.

4.2 Objetivos particulares

- Realizar coprocultivos a pacientes con antecedentes de ingesta de pulque y que presenten cuadros diarreicos al momento de la entrevista.
- Realizar la identificación de bacterias enteroinvasivas Gram-negativas por el método de la PCR de esos coprocultivos
- Identificar la presencia de signos de hepatopatía en pacientes con ingesta de pulque.
- Identificar alteraciones en las pruebas de funcionamiento hepático en pacientes con ingesta de pulque.

- **Hacer una correlación entre los pacientes con coprocultivos positivos a enterobacterias invasivas Gram-negativas y la presencia de daño hepático.**

5. METODOLOGÍAS

5.1 Selección de pacientes

El estudio se llevó a cabo en colaboración con 2 instituciones de salud, ubicadas en México, D.F. y Pachuca, Hgo. La elección de estos sitios se realizó tomando en cuenta la prevalencia variable de diarreas en esas zonas asociado a la ingesta de alcohol crónica, además de existir disponibilidad de la gente con experiencia clínica y participación previa de estudios multicéntricos, capaces de realizar seguimientos de problemas gastrointestinales y hepáticos, así como de su control.

Se manejó un número total de 48 pacientes de las dos entidades. Estos pacientes fueron incluidos en base a una encuesta, identificando pacientes con consumo de alcohol, prevalencia de diarrea y daño hepático. Este número de pacientes fue suficiente para detectar prevalencias con un intervalo de confianza considerable.

El paciente en primera instancia debió haber presentado un cuadro diarréico por lo menos en los últimos 30 días al día de la entrevista, no tener

antecedentes de ningún tipo de cirugía gastrointestinal, y por último, no haber tomado ningún antibiótico dentro de los últimos 15 días al día de la entrevista.

En base a lo anterior se procedió a realizar los criterios de inclusión y exclusión de los posibles pacientes para participar en el protocolo. Los criterios tomados se enlistan a continuación.

CRITERIOS DE INCLUSIÓN

- ⇒ Sujetos de ambos sexos entre 18 y 75 años de edad,
- ⇒ Con antecedentes de episodios de diarrea de 2 o más días de duración, durante los últimos 30 días. Definiéndose a la diarrea como 3 o más evacuaciones en 24h de consistencia pastosa, semilíquida o líquida,
- ⇒ Consentimiento informado

CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

- ⇒ Mujeres embarazadas,
- ⇒ Sujetos que hayan tomado antibióticos en los últimos 15 días,
- ⇒ Historia de haber sido sometidos a cirugía gastrointestinal,
- ⇒ Imposibilidad de adherirse a los requerimientos del protocolo,
- ⇒ Pacientes que por gravedad del padecimiento tuvieran que ser tratados de inmediato

Las muestras biológicas manejadas para cada paciente fueron de heces para los coprocultivos y de suero (para las PFH), esta última tomada en ayunas. Las heces se colectaron por medio de un isopo que después de ser impregnado se inoculó en el medio de transporte adecuado (Cary-Blair). De aquí se transportó al laboratorio de análisis (la muestra no se refrigeró). Para obtener el suero del paciente se tomaron 7 mL de sangre periférica en ayunas y se colectaron en un tubo seco (sin anticoagulante), se centrifugó a 3500 rpm durante 10 min. Se tomó el sobrenadante (suero), separándolo del paquete celular, para su posterior determinación de PFH.

5.2 Coprocultivo y aislamiento de enterobacterias

Para llevar a cabo el cultivo y aislamiento se utilizó el método directo, seleccionando el medio adecuado para el aislamiento de bacterias enteroinvasivas Gram-negativas de interés (*Salmonella*, *Shigella* y ECEI). Para lo cual se utilizó agar Mac Conkey, agar Salmonella-Shigella y agar XLD. Se sembraron e incubaron las cajas durante 18-24 h a $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. La presencia de esas posibles enterobacterias fue identificada por la observación macroscópica (un crecimiento de colonias lactosa positivas y/o lactosa negativas) ⁴³ (fig 6).

**COLECCION DE
MUESTRA
Y TRANSPORTE**

Heces
(frascos limpios
de boca ancha
con tapa)



uso de medio
de
transporte

CULTIVO Y AISLAMIENTO

METODO DIRECTO

Medio selectivo
Agar MacConkey
Agar Salmonella y Shigella
Agar XLD



18-24 hrs



Colonias lactosa
negativas

Colonias lactosa
positivas

Fig. 6. Campesadillo

Metodología utilizada para llevar a cabo el aislamiento de la (s) enterobacteria (s).

5.3 Obtención del ADN bacteriano (método de fenol:cloroformo/alcohol isoamílico).

Los cultivos bacterianos obtenidos se resuspendieron en 1 mL de PBS, pH 7.5. Las bacterias se separaron por centrifugación a baja velocidad (2500 rpm durante 5 min). El sobrenadante se eliminó. El botón formado se resuspendió en 1 mL de una solución de lisis (STE). Se centrifugó a baja velocidad (2500 rpm durante 5 min). El sobrenadante se eliminó. El botón formado se resuspendió con 500 μ L de una solución de lisis nuclear (STEP) y se incubó a 50°C durante 1 h. Al término de la incubación se agregaron 5 μ L de RNAsa 10 μ g/mL. Después de 5 min, se agregó al tubo de reacción 1 mL de fenol⁹, se agitó por inversión y se centrifugó a 10,000 rpm durante 10 min. Se recuperó la fase acuosa y se agregó 1 mL de una solución 1:1 de cloroformo/alcohol isoamílico⁵. Se agitó por inversión y se centrifugó a 10,000 rpm durante 10 min. Se repitió la operación de lavado con cloroformo/alcohol isoamílico. Una vez recuperada la fase acuosa se agregaron 40 μ L de NaCl 1M. Se adicionaron 2 volúmenes de etanol absoluto (de acuerdo al volumen que se tenga) y se mezclaron suavemente por inversión hasta que se formó la madeja de ADN. Se decantó el etanol y se lavó con una solución de etanol al 70%. Se

⁹ Debe manejarse en la campana de extracción o en un lugar bien ventilado. Puede causar quemaduras. Usarse con precaución.

⁵ El cloroformo estabiliza la frontera entre la fase acuosa y orgánica. Reduce la cantidad de solución acuosa retenida en la fase orgánica. El alcohol isoamílico previene la formación de espuma y facilita la separación de las fases.

decanto y secó la madeja. Se resuspendió el ADN en agua destilada estéril para la determinación por PCR ⁴⁴.

5.4 Cuantificación del ADN bacteriano (espectrofotometría).

Se hizo una dilución 1:250 del ADN bacteriano extraído. (498 μ L de agua destilada estéril + 2 μ L muestra de ADN) Se colocó una alícuota de la dilución en una celda y se midieron las absorbancias (D.O.) a 240, 260 y 280 nm ⁴⁵.

❶ Para calcular la concentración de ADN:

$$1 \text{ unidad de D.O. a } 260 \text{ nm} = 50 \text{ ng}/\mu\text{L} = 0.05 \mu\text{g}/\mu\text{L}$$

$$(0.05 \times 250) \times (\text{D.O. a } 260 \text{ nm}) = \mu\text{g}/\mu\text{L}$$

❷ Para conocer la pureza de la muestra de ADN:

$$(\text{D.O. a } 260 \text{ nm} / \text{D.O. a } 240 \text{ nm}) < 2$$

indicativo de presencia de proteínas.

$$(\text{D.O. a } 260 \text{ nm} / \text{D.O. a } 280 \text{ nm}) < 2$$

indicativo de una pureza relativa.

5.5 Amplificación del ADN bacteriano por la reacción en cadena de la polimerasa. (PCR)

Por medio de la PCR se llevó a cabo la amplificación del ADN obtenido de los coprocultivos para el gen *IpaH* perteneciente a *Shigella* y/o ECEI y del gen *fimA* perteneciente a *Salmonella* utilizando una copia múltiple de las secuencias localizadas en el cromosoma de la bacteria y el plásmido de invasión. Se ha demostrado que este método ofrece un mayor índice de detección que el método microbiológico tradicional.

Todas las amplificaciones se realizaron en tubos eppendorf de pared delgada, utilizando uno por cada muestra de reacción, llevando a un volumen final de 50 μ L. Se utilizó la enzima Amplitaq DNA polimerasa® 10 U/mL. Se preparó una mezcla de reacción con 100 ng/ μ L de cada oligonucleótido, 200 μ M de cada uno de los cuatro dNTP's, 1X amortiguador de reacción, 1.5-3.5 mM de $MgCl_2$. Se agregó 1 μ g/ μ L de ADN molde (muestra) por cada muestra de reacción. Se corrió la PCR de acuerdo a las siguientes condiciones de temperaturas:

- Desnaturalización: 95°C / 1 min / 1 ciclo
- Desnaturalización: 95°C / 1 min / 35 ciclos
- Alineamiento : 60°C / 1 min / 35 ciclos

Extensión : 74°C / 1 min / 35 ciclos

- Extraextensión : 74°C / 7 min / 1 ciclo
- Almacenamiento : 4°C / 30 min

Las concentraciones exactas y la cantidad utilizada para las reacciones de la técnica de PCR se muestran en la tabla IV.

Para la detección de *Shigella* y/o ECEI se utilizaron unas secuencias específicas del plásmido de invasividad H (ipaH) usando los siguientes oligonucleótidos: ipaH III (5'- GTT CCT TTG ACC GCC TTT CCG ATA CGT TC-3') e ipaH IV (5'- GCC GGT CAG CCA CCC TCT GAG AGT AC-3') dando un producto de amplificación de 620 pb ⁴⁶⁻⁴⁷

Para la detección de *Salmonella* se utilizó la región del gen fimA de *S. enteritidis*. Los oligonucleótidos utilizados son FPP-1 (5'- CTA TTG CGA GTC TGA TGT TTG TCG C-3') y FPP-2 (5'- GGC ACC TGC GCA GTC GTA TTA CC-3) que dan un producto de amplificación de 209 pb ⁴⁸⁻⁴⁹

5.6 Identificación y análisis del ADN extraído y amplificado (geles de agarosa-bromuro de etidio).

Para visualizar y ver la integridad del ADN extraído y amplificado de las bacterias, se llevó a cabo en un gel de agarosa al 1%.

Tabla IV. CONDICIONES ÓPTIMAS PARA REALIZAR LA TÉCNICA DE PCR UTILIZANDO LOS OLIGONUCLEÓTIDOS (FPP1/FPP2 e IpaH III/ IpaHIV).

Reactivo	Volumen	Stock	[final]	Reactivo	Volumen	Stock	[final]
Agua	35.6 μ L			Agua	34.7 μ L		
FPP1	3 μ L	100ng	6ng	IpaH III	4 μ L	100ng	8ng
FPP2	3 μ L	100ng	6ng	IpaH IV	4 μ L	100ng	8ng
dNTP'S	4 μ L	10mM	200 μ M	dNTP'S	4 μ L	10mM	200 μ M
enzima	0.4 μ L	10U/ μ L	4U/ μ L	enzima	0.3 μ L	10U/ μ L	3U/ μ L
MgCl ₂	3 μ L	30mM	1.8mM	MgCl ₂	4 μ L	30mM	30mM
ADN	5 μ L	100ng/ μ L	500ng/ μ L	ADN	5 μ L	100ng/ μ L	500ng/ μ L
final	50 μ L			final	50 μ L		

Se hizo una apreciación cualitativa a través del fago lambda de concentración conocida (50ng/ μ L). El ancho de banda del fago lambda se compara con el de la muestra problema (poniendo la misma cantidad en microlitros del fago lambda y del problema en el amortiguador de boratos para corrida). De esta manera conocemos de manera aproximada la concentración de nuestro ADN problema.

Para visualizar el ADN amplificado también se realizó un gel de agarosa al 2%. Para conocer si el peso del amplificado correspondió al esperado, se utilizó un marcador de peso molecular llamado ϕ X174 que presenta bandas de distinto peso molecular. Así el amplificado migra dependiendo del tamaño que tenga y se puede comparar cuanto migra éste con respecto al patrón de migración de las bandas presentadas por el marcador de peso.

Para la elaboración de los geles, utilizando la agarosa y el TBE 0.25X se hizo de la siguiente manera: Se disolvió la agarosa en el TBE por calentamiento (horno de microondas, 1min). Una vez disuelto se dejó enfriar hasta alcanzar una temperatura aproximada de 55 °C. Una vez alcanzada ésta temperatura se agregó 1 μ L de Bret^d 10 μ g/mL mezclando perfectamente. Se colocó la solución en la cámara de la electroforesis horizontal. Se dejó enfriar hasta solidificar. Se

^d El bromuro de etidio es potencialmente carcinogénico por lo que se deben utilizar guantes durante toda la manipulación

tomaron 10 μ L por cada muestra de producto amplificado y 2 μ L de amortiguador para carga. Se mezclaron y se depositó la muestra en el pozo correspondiente del gel. Se colocó el marcador de peso molecular para guía de la concentración del ADN extraído (fago lambda) y para comparación del peso del producto amplificado (ϕ X174).

Ya colocadas las muestras, se corrió la electroforesis correspondiente, donde el patrón de corrimiento del ADN es de carga negativa a positiva. Las condiciones de corrimiento para la electroforesis fueron las siguientes: 100 V, 65 miliamperes (corriente) y 110 watts (potencia)*.

Para fotografiar el gel de agarosa se colocó en un transiluminador de UV (> 2500 μ W/cm²)[†] utilizando un filtro naranja y un filtro transparente bloqueador de luz UV, con película a blanco y negro (como Polaroid 667 ASA 3000)[‡].

5.7 Evaluación del daño hepático.

Para llevar a cabo la evaluación del paciente, con respecto al daño hepático, se realizó a cada uno de ellos una exploración física, ayudados por los médicos residentes del departamento de Gastroenterología del INNSZ y del otro

* Es importante recordar que los voltajes utilizados en la electroforesis son letalmente elevados. Es conveniente utilizar aparatos con blindaje adecuados, una fuente de poder regulable conectada apropiadamente a tierra.

† Tener precaución al trabajar con luz UV ya que puede dañar los ojos y la piel expuesta; se deben usar lentes protectores.

centro hospitalario en provincia. Dentro de los signos para la evaluación del daño hepático se detectaron más comunmente los siguientes:

- a) Ictericia
- b) Ascitis
- c) Esplenomegalia
- d) Hepatomegalia
- e) Sangrado del tubo digestivo

En base a la exploración física, el resultado de la encuesta de cuadros diarreicos y consumo de alcohol, se llevó a cabo la toma de producto, para las pruebas de funcionamiento hepático. La sangre total obtenida se sometió a centrifugación a 3000 rpm durante 10 min. Una vez centrifugada se tomó una alícuota. Las PFH se realizaron en un autoanalizador SYNCHRON CX5 (Beckman), y los parámetros a evaluar fueron: AST, ALT, Bt, Bd, GGT, ALP, ALB, TP (ver introducción). En base a éstos parámetros se evaluó la función hepática de cada uno de los pacientes.

5.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Las características generales, clínicas y moleculares de ingreso de los pacientes del proyecto se resumirán en términos de frecuencias (porcentajes), y medianas (intervalos).

6. RESULTADOS

6.1 Selección de pacientes

El estudio se llevó a cabo en colaboración con dos entidades federativas, el D.F y área conurbada, y con Pachuca, Hgo. Se manejaron un total de 48 pacientes de los cuales 22 pacientes que corresponden al D.F y área conurbada y 26 pacientes que pertenecen a Pachuca, Hgo.

Estos 48 pacientes fueron aleatoriamente distribuidos tanto en edad como en sexo para cada entidad federativa (ver tabla V).

La variable constante en estos sujetos fué la ingesta de pulque para todos ellos, aunque también hay que tener en consideración, que hubo muchos pacientes que ingerían otro tipo de bebida alcohólica (ver tabla VI). Debido a lo anterior, la cantidad de alcohol ingerida por cada paciente fue muy heterogénea y sólo fué posible evaluar la cantidad de alcohol consumido por semana.

La mitad de los pacientes del D.F. y área conurbada (50%) presentaron un consumo por debajo de los 100 g de EtOH/semana, el 40% consumieron entre 100-500 g de EtOH/semana, y sólo el 9% consumió por arriba de 500 g de EtOH/semana (ver tabla VII).

TABLA V. SELECCIÓN DE PACIENTES POR LUGAR, EDAD Y SEXO

Grupo de edades (años)	D.F. y área conurbada No. pacientes (F/M)	Pachuca, Hgo. No. pacientes (F/M)
20-30	3 (2/1)	2 (0/2)
31-40	4 (0/4)	7 (5/2)
41-50	2 (2/0)	6 (3/3)
51-60	8 (3/5)	6 (3/3)
61-80	5 (4/1)	5 (3/2)
Total	22 (11/11)	26 (14/12)

TABLA VI TIPO DE BEBIDAS INGERIDAS POR LOS PACIENTES

TIPO DE BEBIDA	D.F. y área conurbada No. pacientes	Pachuca, Hgo. No. pacientes
Pulque	1(4.5%)	4(15.4%)
Pulque + vino	11(50%)	7(26.9%)
Pulque + vino + cerveza	9 (40.9%)	9(34.6%)
Pulque + vino + cerveza + destilados	1(4.5%)	5(19.2%)
Pulque + vino + cerveza + destilados + etanol	0	1(3.8%)
Total	22 (100%)	26(100%)

TABLA VII. CONSUMO DE ALCOHOL

Alcohol consumido (g/semana)	D.F. y área conurbada No. pacientes	Pachuca, Hgo. No. pacientes
< 100	11(50%)	12(46.1%)
101-300	6(27.3%)	3(11.5%)
301-500	3(13.6%)	3(11.5%)
501-700	1(4.5%)	2(7.7%)
>701	1(4.5%)	6(23.0%)
Total	22(100%)	26(100%)

Por otro lado , en la ciudad de Pachuca, Hgo. , el 46% tuvo un consumo por debajo de 100 g de EtOH/semana, el 23% estuvo entre 100-500 g de EtOH/semana y el 30% consumió más de 500 g de EtOH/semana (ver tabla VII).

6.2 Coprocultivos y aislamiento de enterobacterias.

La elección de los sitios de estudio se consideró tomando en cuenta la prevalencia de diarreas en las zonas asociadas a la ingesta crónica de alcohol, y específicamente de pulque. De ahí que una característica importante de los pacientes fué que tuvieran o hubiesen tenido cuadros diarréicos al momento de la entrevista, o en los últimos 30 días. Con esta característica se les realizó el coprocultivo correspondiente. El coprocultivo se realizó para el aislamiento de las posibles enterobacterias causantes del cuadro diarréico, para su posterior identificación, a través de la técnica de PCR.

La frecuencia de los cuadros diarréicos de los distintos pacientes, pertenecientes a las dos entidades federativas, se presentan en la tabla VIII. Aquí se evaluó a la diarrea por el número de episodios que habían presentado, además de ver cuantos días lo presentaron durante los episodios.

Un 86.9% de los pacientes del D.F. y área conurbada presentan de 1-3 episodios en los últimos 30 días, y un 13% presentan 4 episodios o más. Por otro lado, los pacientes provenientes de la ciudad de Pachuca presentaron un episodio solo el 84.6% de ellos y solo un 15.4% presentó entre 2-3 episodios. En lo que se refiere a la duración de la diarrea, es importante señalar que

73.1% de los pacientes presentaron una duración de menos de 3 días y solo un 26.9% presentó entre 4-10 días

Por el contrario, en el D.F. y área conurbada solo un 30.4% de los pacientes presentaron menos de 3 días de duración, un 43.4% presentó entre 4-10 días, y un 21.7% presentó más de 10 días de duración en sus diarreas. Ambas entidades federativas presentaron un porcentaje elevado en el número de evacuaciones por día (ver tabla VIII).

TABLA VIII. CARACTERÍSTICAS DE LOS CUADROS DIARRÉICOS DE LOS PACIENTES

D.F. y Área conurbada (23 pacientes)	1 (65.7%)	< 3 (30.4%)	< 3 (13.0%)
	2 (13.0%)	4-6 (30.4%)	4 (39.0%)
	3 (8.7%)	7-10 (13.0%)	> 5 (39.0%)
	4 (8.7%)	10-20 (13.0%)	
	6 (4.3%)	21-30 (8.7%)	
Pachuca, Hgo. (26 pacientes)	1 (84.6%)	< 3 (73.1%)	3-4 (30.8%)
	2 (7.7%)	4-6 (19.2%)	> 5 (69.2%)
	3 (7.7%)	7-10 (7.7%)	

Ya conociendo las características de cada paciente, se realizó la toma de producto para llevar a cabo el coprocultivo. En todos los coprocultivos realizados en los medios selectivos correspondientes, presentaron crecimiento enterobacteriano, exceptuando muestras de cuatro pacientes provenientes de Pachuca, en donde no se logró obtener crecimiento en el coprocultivo, lo que nos dió un 91.6% de crecimiento del total de las muestras (ver tabla IX). A partir

de los estudios microbiológicos nosotros no podíamos conocer de que enterobacteria se podía tratar; ya que al hacer una evaluación de los crecimientos bacterianos, no fue posible realizar una identificación con un alto grado de certeza. Por este motivo se hizo una recolección del crecimiento desarrollado en la placa, para que a partir de este crecimiento heterogeneo se hiciera la extracción del ADN correspondiente, para su posterior identificación. Esta identificación se basó en los tres géneros principales causantes de diarreas en esas comunidades, que como se señaló previamente, fueron *Salmonella spp.*, *Shigella spp.* y ECEI.

TABLA IX. NÚMERO DE COPROCVLTIVOS QUE PRESENTARON
CRECIMIENTO DE ENTEROBACTERIAS

D.F. y área conurbada	22/22	100
Pachuca, Hgo.	22/26	84.6
Total	44/48	91.6

6.3 Obtención del ADN bacteriano.

Se tomó todo el crecimiento enterobacteriano que existiera en el cultivo selectivo agar MacConkey, ya que es donde se obtuvo una mayor cantidad de crecimiento bacteriano aumentando las posibilidades de encontrar enterobacterias invasivas, de cada uno de los pacientes. Se hizo la extracción de ADN por la metodología antes descrita (ver inciso 5.3). De esta manera se formó un banco de ADN de 44 coprocultivos de pacientes. En todos los casos la

concentración de ADN fue superior a $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Como criterio de pureza se tomó el cociente mayor a 1.6 calculado de la relación entre los valores obtenidos a 260 nm (ácidos nucleicos) y 240 nm (fenol contaminante) o 280 nm (proteínas). En todos los casos se logró obtener un ADN íntegro, es decir, no degradado (fig. 7).

6.4 Amplificación e identificación del ADN bacteriano.

El ADN obtenido de las extracciones se utilizó para realizar la amplificación y por consiguiente la identificación de los tres géneros de interés para nosotros (ver inciso 5.3). Cada una de las cepas requirió de un par de oligonucleótidos, como se señaló previamente para *Salmonella* utilizamos FPP1 y FPP2, para *Shigella/ECEI* se utilizó el par de oligonucleótidos IpaH III y IpaH IV. Es importante señalar que este último par de oligonucleótidos codifican para el gen de invasividad que comparten ambas cepas (*Shigella* y *ECEI*), por lo que no es posible hacer una diferenciación entre una cepa con respecto a la otra. El producto amplificado para la detección de *Salmonella* es de 209 pb. En la fig. 8 se señalan las muestras de los pacientes a quienes a través de la técnica de PCR se les identificó el género *Salmonella spp.* así como algunas muestras de pacientes que no presentan la banda de amplificación, es decir, fueron pacientes negativos para los tres géneros de interés.

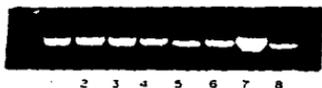


Fig. 7 Integridad del ADN bacteriano obtenido por el método de fenol: cloroformo/alcohol isoamílico. Carril 1-6: ADN extraído de coprocultivos de pacientes con ingesta de pulque. Carril 7: ADN de lambda 2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Carril 8: ADN de lambda 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

El producto amplificado para la detección de *Shigella*/ECEI es de 620 pb. En la fig 9 se muestran las bandas de ADN amplificadas de los pacientes a los cuales se les hizo la identificación por PCR para los géneros de *Shigella*/ECEI. Ambas figuras (8 y 9) muestran a pacientes que corresponden exclusivamente al D.F. y área conurbada.

Por otro lado, las muestras de los pacientes de Pachuca, Hgo a quienes se les identificó los géneros de *Salmonella* y *Shigella*/ECEI, se presentan en las figuras 10 y 11 respectivamente. Es importante observar la baja incidencia de casos positivos con respecto a los negativos en un total de 48 pacientes. Se presentaron un total de 9% para *Salmonella* y 9% para *Shigella*/ECEI para el caso del D.F. y área conurbada, mientras que para Pachuca, Hgo., el porcentaje fué de 11.5% para todos los géneros. Con estas cifras se tiene una identificación final del 20.8% del total de las muestras estudiadas (incluyendo las dos entidades federativas).

6.5 EVALUACIÓN DEL DAÑO HEPÁTICO

La evaluación del daño hepático se realizó mediante el análisis de las PFH y las exploraciones físicas de los pacientes. Como se puede ver en la tabla X, en los pacientes del D.F. y área conurbada se observó que, aunque todos los pacientes fueron bebedores de pulque o pulque/otra bebida, no presentaron datos de hepatopatías (40% no presentó alteraciones bioquímicas, y 59% no presentó signos de hepatopatías).



Fig. 8 Amplificación del gen *Fim A* perteneciente a *Salmonella* utilizando el par de oligonucleótidos FPP1 y FPP2 en pacientes del D.F. y área conurbada. Carril 1: control positivo utilizando *S.typhimurium*. Carril 2: control negativo utilizando *E. coli* (flora normal). Carril 3: Marcador de peso molecular ϕ X174/HaeIII Carril 5,7: pacientes infectados con *Salmonella spp.* Carril 4,6,8: pacientes no infectados con *Salmonella spp.*



Fig. 9 Amplificación del gen IpaH perteneciente a *Shigella*/ECEI utilizando el par de oligonucleótidos IpaHIII/IpaHIV en pacientes de D.F. y área conurbada. Carril 1: control positivo utilizando *S. flexneri*. Carril 2: control negativo utilizando *E.coli* (flora normal). Carril 3: marcador de peso molecular ϕ X174/HaeIII Carril 5,7: pacientes infectados con *Shigella*/ECEI. Carril 4,6,8: pacientes no infectados con *Shigella*/ECEI.



Fig. 10 Amplificación del gen *Fim A* perteneciente a *Salmonella* utilizando el par de oligonucleótidos EPP1 y EPP2 en pacientes de Pachuca, Hgo. Carril 1: control positivo utilizando *S.typhimurium*. Carril 2: control negativo utilizando *E. coli* (flora normal). Carril 3: Marcador de peso molecular ϕ X174/HaeIII Carril 4,6,8: pacientes infectados con *Salmonella spp.* Carril 5,7: pacientes no infectados con *Salmonella spp.*

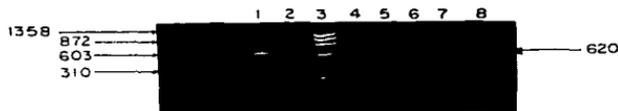


Fig. 11 Amplificación del gen IpaH perteneciente a *Shigella/ECE1* utilizando el par de oligonucleótidos IpaHIII/IpaHIV en pacientes de Pachuca, Hgo. Carril 1: control positivo utilizando *S. flexneri*. Carril 2: control negativo utilizando *E. coli* (flora normal). Carril 3: marcador de peso molecular ϕ X174/HaeIII Carril 4,6,8: pacientes infectados con *Shigella/ECE1*. Carril 5,7: pacientes no infectados con *Shigella/ECE1*.

Es importante hacer notar que de los pacientes que si presentaron datos de hepatopatía, esta fue de mediana intensidad (de una a cuatro alteraciones); ningún paciente presentó más de cinco alteraciones bioquímicas y signos de hepatopatías .

Por otro lado, en los pacientes de Pachuca, Hgo ., cerca del 40% de ellos no mostraron datos de hepatopatías Sin embargo, a diferencia de los pacientes que si mostraron datos de hepatopatias esta fue muy variada e incluso el 50% de ellos mostró entre tres y seis alteraciones bioquímicas y signos de hepatopatía

La asociación de alteraciones bioquímicas con signos de hepatopatías indicó la presencia de daño hepático crónico en esos pacientes.

6.6 Efecto de la ingesta de alcohol e infección por bacterias enteroinvasivas Gram-negativas sobre el daño hepático.

Para llevar a cabo la evaluación clínica de los pacientes se tomaron en cuenta cinco parámetros para evaluar el daño hepático (ver anexo 5.7). En base a las manifestaciones clínicas de los pacientes se logró saber la condición física del mismo. Además se evaluó la funcionalidad del hígado a través de las PFH (ver tablas XI y XII). Es necesario hacer notar que en estas tablas se presentan solo a los pacientes que presentaron infección por las enterobacterias de interés para nosotros, y así poder hacer la correlación entre la presencia de estas enterobacterias y el daño hepático crónico. Es importante señalar que en

los pacientes que presentaron infecciones y daño hepático, hubo un predominio tanto por la edad como por el sexo. Un dato que llamó la atención fue que el mayor daño hepático y la presencia de más alteraciones a nivel hepático, la presentaron pacientes del sexo femenino además tuvieron una edad por arriba de los 50 años. Otra característica que se pudo encontrar es que con una ingesta mayor a 500 g de EtOH /semana hubo un mayor número de alteraciones en las PFH así como en los signos de hepatopatías presentadas (más de cuatro signos)

Los pacientes que tuvieron un consumo menor de 500 g/semana, en ambas entidades, no presentaron tantos signos de hepatopatías, a excepción del paciente 7 de Pachuca, quien al parecer no ingirió gran cantidad de alcohol, pero tuvo cinco datos de hepatopatías presentes así como más de cinco alteraciones bioquímicas en sus PFH. Asimismo para Pachuca, Hgo., los pacientes que presentaron infección por los géneros *Shigella*/ECEI tendieron a un mayor número de alteraciones bioquímicas y hepatopatías. Por el contrario los pacientes provenientes del mismo lugar infectados con *Salmonella*, sus hepatopatías fueron mínimas al igual que su alteraciones bioquímicas.

TABLA X. ESTADO FUNCIONAL DEL HÍGADO*

D.F. y área conurbada		
Pachuca, Hgo.	Normal (9/41%)	Normal (13/59%)
	1-2 (11/50%)	1-2 (8/36%)
	3-4 (2/9%)	3-4 (1/5%)
	5-6 ———	5-6 ———
	Normal (12/46%)	Normal (10/39%)
Total de pacientes	1-2 (7/27%)	1-2 (8/31%)
	3-4 (1/4%)	3-4 (4/15%)
	5-6 (6/23%)	5-6 (4/15%)
	48/100	48/100

* El estado funcional es evaluado tomando en consideración el número de alteraciones bioquímicas y el número de signos de hepatopatía. (ver inciso 5.7)

**TABLA XI. PACIENTES DEL D.F. Y ÁREA CONURBADA CON PCR (+)
 PARA ENTEROBACTERIAS GRAM-NEGATIVAS QUE PRESENTARON
 DATOS DE HEPATOPATÍA Y/O ALTERACIONES EN SUS PFH**

	●	●	●	●
Sexo	m	f	m	f
Edad (años)	54	22	54	67
Diarreas (episodios/evacuaciones/días)	1/7/5	1/3/4	1/6/4	6/5/5
Tipo de bebida ingerida	P.V.Co	P.V	P.V	P.V
gr.EtOH/semana	24	24	144	516
Hepatopatías presentadas	no presenta	no presenta	no presenta	lc, As, Esp, STD
Alteraciones bioquímicas	Normal	ALT↓, pT↓	ALT↓	Ald↓, pT↓, AST↑, Alp↑, BT↑
Infección por enteroinvasiva Gram-negativas	Shigella spp/EIEC	Shigella spp/EIEC	Salmonella spp	Salmonella spp

TABLA XII. PACIENTES DE PACHUCA, HGO. CON PCR (+) PARA ENTEROBACTERIAS GRAM-NEGATIVAS QUE PRESENTARON DATOS DE HEPATOPATÍA Y ALTERACIONES EN SUS PFH

Sexo	m	f	f	f	m	m
Edad (años)	28	49	62	69	44	59
Diarreas (episodios/evacuaciones/días)	1/3/>5	1/1/>5	1/8/4	3/3/3	1/1/>5	1/3/>5
Tipo de bebida ingerida	P,V,Ce	P,V,Ce	P,V,Ce,D	P	P,V	P,V
EtOH/semana	108	264	1500	12	312	24
Hepatopatía presentada	Ic	Ic, As, Hep, Esp, STD	Ic, As, Esp, STD	As, Esp	As	no presenta
Alteraciones bioquímicas	AST↑, ALT↑, BD↑	AST↑, ALT↑, BD↑, BT↑, Aip↑, Alb↓	AST↑, BT↑, BD↑, Aib↓	GGT↑	GGT↓	Normal
Infección por enteroinvasivas Gram-negativas	Sal. spp	Shigella spp/EIEC	Shigella spp/EIEC	Shigella spp/EIEC	Sal. spp	Sal. spp

Es importante señalar que el paciente 26, a pesar de tener características de ingesta de pulque y vino, así como de cuadros diarreicos, no presentó datos de hepatopatías.

En lo que se refiere a los pacientes del D.F. y área conurbada se observaron dos casos de infección con *Shigella/ECEI* y dos con *Salmonella*. De los pacientes infectados con *Salmonella*, uno de ellos (paciente 23) tendió a presentar alteraciones bioquímicas en cinco pruebas además de observarse cinco signos de hepatopatías. El otro paciente (paciente 8) tuvo la misma infección pero no presentó signos de hepatopatías, y solo tuvo una alteración bioquímica. Es importante hacer notar que los dos pacientes infectados con *Shigella/ECEI* no tuvieron datos de hepatopatías, y solo uno de ellos tuvo mínimas alteraciones bioquímicas. El paciente 2 no presentó alteraciones bioquímicas, por lo que solo presentó cuadros diarreicos, por otro lado el paciente 3 solo presentó dos alteraciones bioquímicas además del cuadro diarreico debido a la infección.

7. DISCUSIÓN

La enfermedad hepática alcohólica es una consecuencia común de la ingesta intensa y prolongada de alcohol. La enfermedad comprende un amplio espectro de lesiones histológicas, siendo la más característica la esteatosis alcohólica (hígado graso), la hepatitis alcohólica, la fibrosis y cirrosis alcohólica. Todos estos tipos de lesiones traen como consecuencia una serie de alteraciones bioquímico-moleculares las cuales se van a traducir en una serie de manifestaciones clínicas típicas de la enfermedad hepática.

Muchas de las características de la enfermedad hepática alcohólica están asociadas con la respuesta de "fase aguda". La reacción de fase aguda representa la respuesta del cuerpo a una lesión tisular. Se manifiesta como una reacción sistémica acompañada entre otras cosas de fiebre y un cambio en la concentración de proteínas en sangre. Muchas de éstas proteínas se sintetizan en el hígado y son reguladas por una gran variedad de mediadores⁴⁹. En este estudio nosotros incluimos 48 pacientes de dos entidades federativas, las cuales se caracterizaron por tener una alta ingesta de alcohol. Aunque en este estudio, uno de los requisitos para incorporarlos era la ingesta de pulque, se pudo comprobar que el 89.5 % de los pacientes incorporados ingería pulque en combinación con otra bebida alcohólica y un alto porcentaje de ellos

presentaron datos de hepatopatía (40% para el D.F. y área conurbada y 60% para Pachuca, Hgo.).

Diversos estudios epidemiológicos han demostrado la estrecha asociación entre el alcoholismo y el daño hepático. El riesgo de adquirir una cirrosis hepática aumenta con la duración y la intensidad del alcoholismo. Sin embargo, no todos los alcohólicos cirróticos desarrollan daño hepático. Los estudios de autopsia demuestran que la cirrosis está presente entre el 10 y el 25% de los alcohólicos fallecidos. Se desconocen, no obstante, cuales son los factores relacionados con la susceptibilidad para el daño hepático inducido por el alcohol. Como pudimos observar en nuestros resultados no hubo un predominio en cuanto a la edad de los pacientes bebedores de alcohol, asimismo, fue posible comprobar que los pacientes que ingerían la misma cantidad de alcohol hubo quienes presentaron datos de hepatopatía y otros no. Es decir, la respuesta individual de cada paciente fue diferente en cada caso, lo cual corrobora la susceptibilidad individual de cada persona a desarrollar daño hepático posterior a la ingesta de alcohol.

El pulque es una bebida tradicional de bajo contenido de alcohol. Aunque es obtenido por un proceso de fermentación este no es producido en condiciones asépticas adecuadas, ni sufre procesos de pasteurización. Para fines del estudio, la ingesta de pulque por los pacientes incluidos fue de gran importancia en dos aspectos: en primer lugar dado que es una bebida

tradicional, esto significa que esta bebida es consumida desde etapas tempranas, de hecho en las encuestas fue señalado que algunas familias de bajos recursos alimentan a sus niños con pulque en lugar de leche; por otro lado, la falta de un proceso de pasteurización sugiere que esta bebida está contaminada con diferente flora, la cual es patógena al hombre

Estudios preliminares realizados en el INNSZ han mostrado que el pulque contiene una gran variedad de microorganismos enteropatógenos (datos no publicados). Una característica de estas enterobacterias es la síntesis de endotoxinas. Se sugiere la posibilidad de que en el pulque exista la presencia de bacterias enteropatógenas de carácter invasivo, como ECEI, *Salmonella* y *Shigella*. La presencia de éstas bacterias además de causar los cuadros diarreicos típicos, puede llevar a alteraciones a distancia por la presencia de sus endotoxinas³¹. Existen evidencias de que el consumo de alcohol crónico asociado a la infección por enterobacterias Gram-negativas, facilitan el escape de endotoxinas desde el lumen intestinal hasta la circulación. Estas endotoxinas sensibilizan a los macrófagos para producir altos niveles de citocinas, por lo que hace suponer que los alcohólicos infectados con estas bacterias presentan altos niveles de endotoxinas, las cuales pueden a largo plazo, influir en el desarrollo del daño hepático³²

Se ha observado en animales de experimentación, sometidos a una dieta crónica de alcohol, éstos son más susceptibles al daño hepático mediado por endotoxinas ^{25,50}

Asimismo, en estudios recientes se han encontrado altas concentraciones de TNF en suero de ratas cuando se les administra etanol/LPS en su dieta, y esto se ha asociado con el daño hepático que presentan los animales. Por lo tanto se sugiere que el consumo de etanol y la exposición a LPS son dos factores que conllevan a la producción de citocinas, entre ellas el TNF, y por otro lado al daño hepático ⁵¹.

En un estudio reportado en 1990 sobre el seguimiento de pacientes que presentaron daño hepático, se observó que los pacientes que fallecieron durante ese tiempo presentaban una elevada concentración de TNF plasmático, mientras que los que sobrevivieron no presentaron dicho incremento de TNF en sangre ⁵². En resumen la presencia de endotoxinas y la producción de citocinas son directamente proporcional al daño hepático, es decir, entre mayor sea la cantidad de citocinas que esten presentes, mayor es la severidad del proceso.

Si consideramos las características que presentaban los pacientes involucrados en este estudio, todos ellos presentaron diarreas en los últimos 30 días. Esto nos indicó que sí hubo un cuadro de infección por enterobacterias, posiblemente provenientes de la ingesta de pulque. Es importante señalar que

aunque todos presentaron diarrea, solo hubo desarrollo bacteriano en un 91,6 % de los coprocultivos realizados. Las muestras que no desarrollaron crecimiento bacteriano procedieron de la ciudad de Pachuca, lo cual habla de que posiblemente no fueron apropiadamente procesadas y transportadas, pues como señalamos previamente todos los pacientes tuvieron cuadros diarreicos .

Para la identificación de las enterobacterias en los coprocultivos se realizó la extracción del ADN correspondiente. El método utilizado fue el de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico. La técnica se estandarizó para bacterias, ya que esta técnica se utiliza normalmente en el laboratorio donde se desarrolló este trabajo, para la extracción de ADN de células eucariotas. Nosotros lo aplicamos para la extracción de ADN bacteriano, y los resultados obtenidos nos indicaron la obtención de un material genético "puro y limpio", además de obtenerlo prácticamente "íntegro", es decir no degradado. La identificación bacteriana se realizó por medio de la reacción en cadena de la polimerasa, la cual se realiza en un período de aproximadamente 4 horas y tiene una confiabilidad cercana al 100%.

Como se pudo observar la cantidad de casos positivos con respecto a los negativos del total del número de pacientes fue muy bajo (20%, 10 pacientes), de un total de 48 pacientes. Se detectaron cuatro casos positivos para el D.F. y área conurbada, en dos de ellos se detectó *Shigella* y en los otros dos se detectó *Salmonella*. Mientras que para Pachuca, Hgo. se

detectaron seis casos positivos, en tres de ellos se detectó *Shigella* y en los otros tres se detectó *Salmonella*. Es importante señalar que la gran incidencia de casos que resultaron negativos, no necesariamente indicó que no tuvieron infección, pues como se indicó previamente al menos presentaron un cuadro diarreico en los últimos treinta días; por el contrario, esto sugiere que probablemente ellos estuvieron infectados con algún otro género de bacteria patógena, diferente al que nosotros detectamos por la técnica de PCR, por ejemplo *Yersinia spp.*, *Hafnia spp.* etc., que se han detectado en el pulque por el INNSZ.

En cuanto a la correlación entre ingesta de pulque y daño hepático es importante mencionar que de los pacientes a quienes si se les detectó algún género de enterobacteria por la técnica de PCR, fue evidente que entre mayor fue el consumo de alcohol, mayor fueron los datos de hepatopatía. En lo que se refiere al D.F. y área conurbada, solamente la paciente 23 presentó tanto alteraciones bioquímicas como signos de hepatopatías. Esta misma paciente, presentó 6 episodios de diarrea (de 5 evacuaciones durante 5 días), lo que quiere decir que al menos el último mes tuvo diarreas; asimismo, esta paciente presentó una ingesta mayor de 500g de EtOH/semana, lo cual justifica el daño hepático. A diferencia de los pacientes 3 y 8, quienes presentaron mínimas alteraciones bioquímicas, una ingesta mucho menos de alcohol y solo un episodio de diarrea.

Por otro lado, en lo referente a los datos obtenidos del estado de Hidalgo, curiosamente los pacientes que presentaron más daño hepático fueron del género femenino de una edad mayor a los 50 años (paciente 7 y 10). Ambas presentaron un gran número de alteraciones en sus PFH, al igual que más de cuatro signos de hepatopatía. Sin embargo, la diferencia entre ellas fué su consumo de alcohol, una de ellas tuvo un consumo por arriba de los 500 g de EtOH/semana y la otra por debajo de esa cantidad, lo cual habla nuevamente de la susceptibilidad individual al daño hepático. Otro aspecto importante de estas pacientes es que aunque el daño hepático fue severo, solo tuvieron un solo episodio de diarreas en los últimos treinta días. De los otros pacientes a quienes se les detectó las enterobacterias, el consumo de alcohol fue muy variable, pero aunque solo presentaron un episodio de diarreas, ellos tuvieron alteraciones en sus PFH, lo cual habla del daño hepático. Un paciente que llamó la atención fue el 26, quién tuvo ingesta de pulque y vino en baja cantidad; este paciente presentó un cuadro diarréico, pero no presentó ningún dato de hepatopatía. Dado que es un paciente que tiene un bajo consumo de alcohol (24g EtOH/semana), la ausencia de daño hepático sugiere dos posibilidades: una susceptibilidad individual menor al daño hepático y deficientes hábitos higienico-dietéticos.

Se ha señalado que el hígado es el principal sitio de traslado de las endotoxinas que provienen del intestino a través de la circulación sistémica

porta. Las endotoxinas son tomadas casi exclusivamente por las células del sistema retículo endotelial, refiriéndose en el hígado a las células de Kupffer ³³. Se sabe que en el alcoholismo crónico la permeabilidad intestinal a este tipo de moléculas se ve incrementada, absorbiéndose sustancias que normalmente no lo hacen.

Las endotoxinas que llegan a hígado son uno de los principales estímulos para que se induzca la expresión y producción de citocinas, por parte de las diferentes células que constituyen este órgano, por lo que puede ser un indicio de que las endotoxinas induzcan hepatotoxicidad ^{36,39,54}.

Una posible respuesta a la interrogante de ¿cómo es que se produce el daño hepático alcohólico posterior a la ingesta de pulque? Es que puede existir 1) una reducción en la capacidad de las células de Kupffer para eliminar las endotoxinas, 2) un incremento en la permeabilidad de la membrana de las células de la mucosa intestinal hacia la endotoxina, 3) un incremento en la flora de bacterias Gram-negativas en el tracto intestinal, el cual proveería un reservorio en la producción de endotoxinas. Al liberarse el LPS a la circulación siempre van a estar presentes las citocinas en respuesta a éste estímulo. Se ha visto que cuando se expone una porción de intestino de rata al etanol, en condiciones, *in vitro*, se incrementa la permeabilidad de la mucosa hacia las endotoxinas ⁴⁰. Se piensa que las endotoxinas son factores que contribuyen al

daño, pues se ha observado que cuando se reduce de alguna manera a estas endotoxinas, la enfermedad hepática mejora ⁴¹.

De nuestros resultados es evidente que un alto porcentaje de los pacientes bebedores de pulque presentaron datos de daño hepático. Aunque el número de personas a quienes se les identificó los tres géneros estudiados (ECEI, *Shigella* y *Salmonella*) fue bajo, eso no descarta la posibilidad que esten infectados con otro género de bacteria Gram-negativa que nosotros no detectamos y que sean, al menos en parte, los causantes del daño al hígado. Lo que es importante señalar es que nuestros resultados sugieren que la infección por bacterias Gram-negativas es un factor que influye en el desarrollo del daño hepático.

No obstante, debido a que el número de pacientes involucrados en el estudio fue pequeño, sería importante realizar un estudio donde se incluya un mayor número de personas, así como también otras entidades federativas consumidoras de pulque para tratar de dilucidar si realmente el pulque es un factor co-mórbido en el desarrollo de daño hepático.

8. CONCLUSIONES

- La respuesta individual de cada paciente a presentar hepatopatías es diferente, lo que corrobora la susceptibilidad individual de cada persona a desarrollar daño hepático por la ingesta de alcohol/LPS.
- El 91% de los coprocultivos presentaron enterobacterias Gram-negativas donde estas pudieron provenir de la ingesta crónica de pulque contaminado.
- Aunque el número de pacientes a quienes se les identificó los tres géneros estudiados fue bajo, no se descarta la posibilidad de que estuvieran infectados con otros géneros de enterobacterias Gram-negativas que nosotros no identificamos.
- La infección por enterobacterias Gram-negativas es un factor que influye en el desarrollo del daño hepático.
- La PCR es una técnica de elevada sensibilidad y especificidad además de obtener los resultados en mucho menor tiempo que lo requerido mediante el cultivo bacteriano. Esta requiere la presencia de ADN perteneciente al agente etiológico que se quiera identificar, no importando la viabilidad del mismo.

9. APÉNDICE

9.1 EQUIPO

- Agitador magnético con parrilla eléctrica CORNING
- Autoanalizador SYNCHRON CLINICAL SYSTEM BECKMAN CX5
- Balanza analítica OHAUS
- Baño maria PRECISION
- Cámara fotográfica POLAROID DS34
- Centrifuga BECKMAN
- Centrifuga EPPENDORF
- Computadoras
- Congeladores -20°C y -70°C
- Equipo de electroforesis EC
- Espectrofotómetro DU65 BECKMAN
- Fuente de poder BIORAD
- Pipeteadores
- Potenciómetro BECKMAN
- Refrigeradores 4°C
- Termociclador PERKIN ELMER 9600
- Transiluminador UVP
- Vortex THERMOLYNE

9.2 MATERIAL

- **Agujas**
- **Asa bacteriológica**
- **Autoclave**
- **Cajas de Petri desechables**
- **Celdas de cuarzo para espectrofotómetro**
- **Cronómetro**
- **Charola de pesada**
- **Embudo de filtración rápida**
- **Espátula**
- **Gasas**
- **Gradillas**
- **Guantes de asbesto**
- **Jeringas desechables**
- **Matraces Erlenmeyer**
- **Matraces volumétricos**
- **Mechero**
- **Micropipetas automáticas 20,100,1000 μ L**
- **Pinzas**
- **Pipetas pasteur**
- **Pipetas serológicas**

- Piseta
- Probetas
- Recolector de punzocortantes
- Tripie
- Tubos de ensaye
- Tubos Eppendorf de 1.5 mL
- Tubos vacutainer
- Vasos de precipitados

9.3 REACTIVOS

- Ácido bórico MERCK
- Agar MacConkey DIBCO
- Agar Salmonella Shigella DIBCO
- Agar XLD DIBCO
- Agarosa GIBCO BRL
- Agua desionizada estéril
- Alcohol isoamílico SIGMA
- Amortiguador de PCR PERKIN ELMER
- Amplitaq DNA polimerasa PERKIN ELMER
- Azul de bromofenol SIGMA
- Bromuro de etidio SIGMA

- Cloroformo BAKER
- Cloruro de magnesio PERKIN ELMER
- Cloruro de potasio BAKER
- Cloruro de sodio SIGMA
- dATP PERKIN ELMER
- dCTP PERKIN ELMER
- dGTP PERKIN ELMER
- dTTP PERKIN ELMER
- Duodecil sulfato de sodio SIGMA
- Etanol absoluto SIGMA
- Etilendiaminotetracético SIGMA
- Fenol SIGMA
- Ficoll PHARMACIA
- Fosfato de potasio monobásico BAKER
- Fosfato de sodio dibásico BAKER
- Proteínasa "K" GIBCO BRL
- RNasa SIGMA
- Xilencianol SIGMA

9.4 PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

- Cloruro de sodio 1M

NaCl	0 5844g	10mL
------	---------	------

- Duodecil sulfato de sodio 20%

SDS	2g	100mL
-----	----	-------

- Cloruro de magnesio 2.5 mM

MgCl ₂ (30mM)	5 µL	50 µL
--------------------------	------	-------

- Mezcla de dinucleótidos trifosfato 200 µM

dGTP (10mM)	1 µL	50 µL
-------------	------	-------

dATP (10mM)	1 µL	50 µL
-------------	------	-------

dTTP (10mM)	1 µL	50 µL
-------------	------	-------

dCTP (10mM)	1 µL	50 µL
-------------	------	-------

- Solución de oligonucleótidos 100 ng/ µL

FPP1 (35 ng/µL)	3 µL	50 µL
-----------------	------	-------

FPP2 (35 ng/µL)	3 µL	50 µL
-----------------	------	-------

IpaH III (35 ng/µL)	3 µL	50 µL
---------------------	------	-------

IpaH IV (35 ng/µL)	3 µL	50 µL
--------------------	------	-------

• Amortiguador de PCR 1X		
PCR buffer (10X)	5 μ L	50 μ L
• Ácido desoxirribonucleico molde 4 μ g/ μ L		
ADN (1 μ g/ μ L)	4 μ L	50 μ L
Amplitaq DNA polimerasa 4 U/ μ L		
Taq (10U/ μ L)	0.4 L	50 μ L
• Agarosa 1% y 2%		
Agarosa 1%	0.4g	40 mL
Agarosa 2%	0.3g	60 mL
• Agar MacConkey, XLD, SS		
Medio de cultivo	60 g	1L
• TBE 10X		
Tris Hcl	324 g	2L
Ac. bórico	100 g	2L
EDTA	19 g	2L
• Amortiguador de carga		
Azul de bromofenol	0.0625 g	25 mL
Xilencianol	0.0625 g	25 mL
Ficoll	3.75 g	25 mL

- STE

Tris HCl (10mM)	1 mL	100 mL
EDTA (1mM)	0.2 mL	100 mL
NaCl	0.1 g	100 mL

- STEP

SDS (20%)	250 μ L	10 mL
Tris HCl (10mM)	0.5 mL	10 mL
EDTA (0.5mM)	0.8 mL	10 mL
Prot K.	0.01g/1mL	10 mL

- PBS 0.1 M pH7.4

Na ₂ HPO ₄	3.603 g	250 mL
KH ₂ PO ₄	0.680 g	250 mL

- Ácido etilendiaminotetracético 0.5 M

EDTA	1.8625 g	10 mL
------	----------	-------

10. REFERENCIAS

1. Tortora G (1987) Principios de anatomía y fisiología Ed Harla, México, 5ª ed
2. Stephen D, Galton J (1995) Gastroenterology Physiology of the liver W.B. Saunders, vol 3, 5ª ed. Philadelphia Penn USA
3. Bockus H.L (1981) Cirrosis Gastroenterologia **107**:395-448
4. Lieber C S (1982) Alcohol e hígado Temas selectos de hepatología 1
5. Dienstag J L, Feinstone S M (1977) Non-A, Non-B post-transfusion hepatitis Lancet **1**:560
6. Dajer F, Guevara L (1978) Consideraciones sobre la epidemiología de la cirrosis hepática alcohólica en México Rev Inv Clin **30**:13
7. Leevy C M. (1968) Cirrhosis in alcoholics Med Clin North Amer **52**:1445
8. Lieber C.S. (1968) Alcohol nutrition and liver The Amer **52**:1445
9. Rubin E., Lieber C S (1975) Relation of alcoholic liver injury to cirrhosis Clinical Gastroenterology **4**:247
10. Díaz A. (1996) Enfermedad hepática por alcohol Quimica Knoll de México Ed. Piensa México
11. Benavides L (1979) Alcoholismo y genética Rev Med Hosp. Gral **42**:133
12. Popper H. (1977) Pathologic aspects of cirrhosis A review Am.J Pathol **87**:228-264
13. Rojkind M., Greenwell P. (1988) The liver as a bioecological system. The liver: biology and pathobiology Reven Press, New York 1269-1285
14. Greenwell P., Geerts A., Ogata I., Soliz-Herrezo J., Rojkind M. (1994) The liver biology and pathobiology Reven Press, New York 1367-1377
15. Masaaki M (1995) Expression of hepatocyte growth factor and transforming growth factor β -1 mRNA in *Pancreas* and lipopolysaccharide-treated rats J.Gastroenterol **30**:48-54

16. Rodel J., Bruguera M. (1982) Manual de las enfermedades del hígado y vías biliares. Ed. Científico-Médico, Barcelona
17. Keith H., Streinkraus (1996) Handbook of indigenous fermented foods. 2nd ed. New York-Basal Hong Kong. Marcel Dekker Inc 389-396
18. Herrera T., Calderon V (1991) Yeast isolated from pulque, the traditional beverage of Mexico. Rev Mex Mic 7 121-128
19. Gobierno del Estado de Hidalgo Museo Nal de las Culturas Populares (1988) El maguey, árbol de las maravillas. INI, SEP, DGCP, México
20. Lappe P., Ulloa M., Herrera T (1989) Estudio de cinco especies de levaduras del pulque y comparación de la microbiota de esta bebida con las otras semejantes del mundo. Ann Inst Biol UNAM 59 1 31-48
21. Lappe P., Ulloa M (1993) Alimentos fermentados indígenas de México. Wachter M C., Lappe P editores México D F., UNAM 75 79
22. Ulloa M., Herrera T., Lappe P (1987) Fermentaciones tradicionales indígenas en México. INI Serie de investigaciones sociales 33 39
23. Anuario Estadístico (1993) Mortalidad causada por cirrosis SS de México
24. Nanji A.A., Khettry U. (1994) Severity of liver injury in experimental alcoholic liver disease. Correlation with plasma endotoxin and evidence for endotoxin tolerance in chronic ethanol-fed rats. Life Science 55 611
25. Bhagwandeem B.S., Apte M., Manwarring L., Dickenson J (1987) Endotoxin induced hepatic necrosis in rats on alcohol diet. J Pathol 151 47
26. Day C.P., Bashir R., James O., Bassendine M., Crabb D., Thomasson H., Li T., Edenberg H. (1991) Investigation of the role of polymorphism of the alcohol and aldehyde dehydrogenase loci in genetic predisposition to alcohol-related and organ damage. Hepatology 14 789-801
27. Leblach W.K. (1976) Epidemiology of alcoholic liver disease. Prog.Liver.Dis 5:494-513
28. Marbet U.A., Bianchi L., Meury V., Stadler G (1987) Long term histological evaluation of the natural history and prognostic factors at alcoholic liver disease. J Hepatol 4:364-372

29. Pares A., Caballeria J., Bruguera M. (1986) Histological course of alcoholic hepatitis influence of abstinence, sex and extent of hepatic damage. J Hepatol 2:33-42
30. Pequinot G. Tuyns A.S., Berta J.L. (1978) Ascitis cirrhosis in relation to alcohol consumption. Int.J.Epidem 7:113-120
31. Keršenobich D., Vargas-Vorácková F. (1996) Curso anual de postgrado alcohol e hígado Secretaría de Salud, Consejo Nacional contra las Adicciones, CONACYT, NIAAA
32. Dufour M.C., Stinson F.S., Caces M.F. (1993) Trends in cirrhosis morbidity and mortality: United States, 1979-1988. Seminars in liver Disease 13:2 109
33. McClain C., Cohen D., Dinarello C., Cannon J., Sheldofsky S., Kaplan A. (1986) Serum interleukin-1 (IL-1) activity in alcoholic hepatitis. Life Science 39: 1479-1485
34. Riikonen P., Makela P., Saarilahti H., Sukupalui S., Taira S., Rhen M. (1992) The virulence plasmid does not contribute to growth of Salmonella in cultured murine macrophages. Microbial Pathogenesis 13 281-291 Nalae
35. Bird G., Sheron N., Goka A., Alexander G., Williams R. (1990) Increased plasma tumos necrosis factor in severe alcoholic hepatitis. Ann Int Med 112:917-920
36. Bjamason Y., Ward K. (1984) The leaky gut of alcoholism possible route of entry for toxic compounds. Lancet. January:179-182
37. Reitschel E., Kirakae T., Shade F., (1994) Bacterial endotoxin Molecular relationships of structure to activity and function. FASEB J 8 217
38. Fox E., Broitman S., Thomas P. (1990) Bacterial endotoxins and the liver. Lab Invest 63:733
39. Rietschel E.T., Brade H. (1992) Bacterial endotoxins. Scientific America: August
40. Arai M. (1986) Efect of ethanol on intestinal uptake of endotoxin. Jpn Gastroenterol 83:1060
41. Nanji A., Sadrzadeh S., Khettry U. (1994) Lactobacillus feeding reduce endotoxemia and severity of experimental alcoholic liver disease. Proc Soc Exp Biol Med 205:243

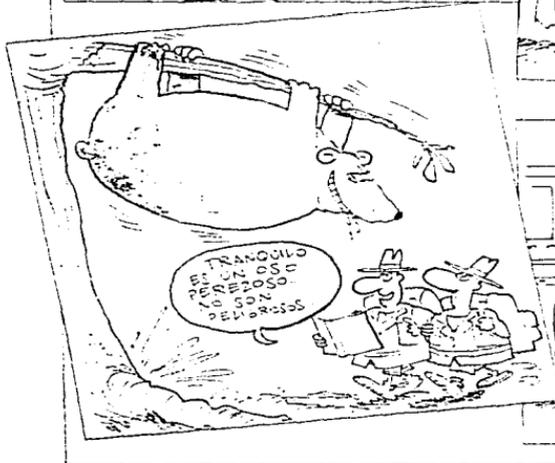
42. Rodriguez D.C., Tauxe R.V., Rowe B (1990) International increase in *S. enteritidis*: A new pandemic. *Epidem Infection* **105** 21-27
43. Bailey y Scott (1989) Diagnóstico microbiológico Ed Panamericana, ed. séptima, Argentina
44. Sambrook, Fritsh, Maniatis (1989) Molecular cloning, a laboratory manual 2nd. edition. Cold Spring Harbor Lab Press U S A
45. Lüscher D., Altwegg M (1994) Detection of shigellae, enteroinvasive and enterotoxigenic *Escherichia coli* using the polymerase chain reaction (PCR) in patients returning from tropical countries. *Mol Cell Prob* **8** 285-290
46. Sethabutr D., Venkatesan M., Murphy G., Eampokap B., Hoge C., Echeverria P. (1993) Detection of Shigellae and Enteroinvasive *Escherichia coli* by amplification of the Invasion Plasmid Antigen H DNA sequence in patients with dysentery. *The Journal of Infectious Diseases* **167** 458-61
47. Doran J., Collinson S., Kay C., Banser P., Burian J., Munro C., Lee S., Somers J., Tood E., Kay W (1994) *fimA* and *lctC* based DNA diagnostic for *Salmonella*. *Mol Cell Prob* **8** 291-310
48. Frankel G., Riley L., Giron J. et al (1990) Detection of *Shigella* in feces using DNA amplification. *J Infection Disease* **161**.1252-1256
49. Weganka U., Bushmann J., Luticken C., Heinrich P., Horn F. (1993) Acute-response factor, a nuclear factor binding to acute-phase response elements, is rapidly activated by IL-6 at the posttranslational level. *Molecular Cell Biology* **13** 1 276
50. Arai M., Nakaro S., Okuno F (1989) Endotoxin-induced hypercoagulability, a possible aggravation factor of alcoholic liver disease. *Hepatology* **9** 846
51. Nanji A., Zhao S., Sadrzaden S., Waxman D (1994) Use of reverse trascription-polymerase chain reaction to evaluate in vivo cytokine gene expression in rats fed ethanol for long periods. *Hepatology* **19**.1483
52. Felver M., Mezey E., McGuire M., Mitchell M., Herlong H., Veech G (1990) Plasma tumor necrosis factor- α predicts decreased long term survival in severe alcoholic hepatitis. *Alcohol Clin Exp Res* **14**:225,259
53. N.A., Shnyra A., Huitenby K., Lindberg A. (1992) *S. choleraesuis* and *S. typhimurium* associated with liver cells after intravenous inoculation of rats are located mainly in Kupffer cells and multiply intracellularly. *Infection and Immunology* **60** 2758-2768

54. Nolan J.P. (1988) Intestinal endotoxins as mediators of hepatic injury.
Hepatology 8:232

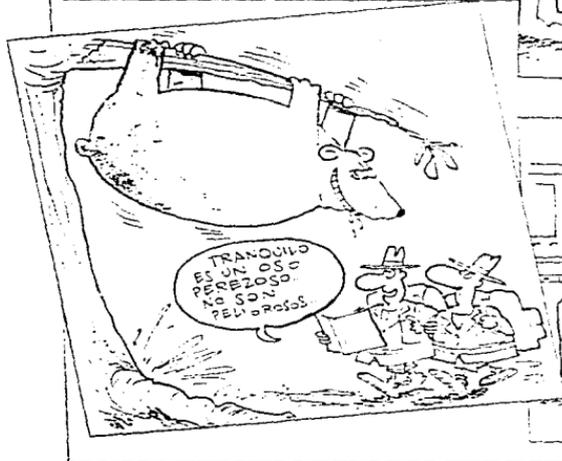
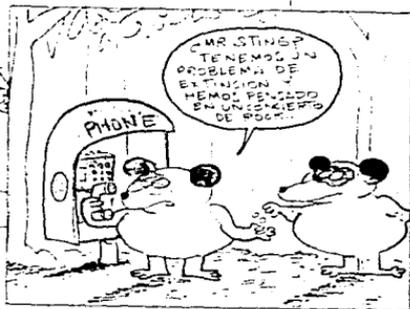
55. Gressner AM. (1993) Cytokines and cellular crosstalk involved in the
activation of fat-storing cells. J. Hepatol 22:28

56. Flier JS., Underhill LH. (1993) The cellular basis of hepatic fibrosis. The new
England. Journal of Medicine 328:25:1828

HUMOR



HUMOR



CITAS

Yo se que la poesia es imprescindible, pero no se para que.

Jean Cocteau

Una vez terminado el juego, el rey y el peón vuelven a la misma caja.

Proverbio italiano

Si Dios hubiera querido prohibirnos el vino, las viñas serían amargas.

Proverbio francés

Donde acaba la biología empieza la religión.

Gilbert Keith

El amor tiene facil la entrada y dificil la salida, además de ser una tontería hecha por dos.

Napoleón

*Pasó con su madre. ;Qué rara belleza!
;Qué rubios cabellos de trigo garzul!
;Qué ritmo en el paso!
;Qué innata realeza de porte!
;Qué formas bajo el fino tul!...
Pasó con su madre. Volvió la cabeza:
;Me clavó muy honda su mirada azul!
Quedé como en éxtasis...
con febril premura
;siguela! gritaron cuerpo y alma al par.
...pero tuve miedo de amar con locura
de abrir mis heridas que suelen sangrar
y no obstante toda mi sed de ternura
cerrando los ojos la dejé pasar.*

Amado Nervo