

Propuesta para la detección temprana del consumo de etanol en estudiantes de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos

Sara García-Jiménez^{1*}, Miguel Erazo-Mijares¹, Cairo D. Toledano-Jaimes², Antonio Monroy-Noyola², Fernando Bilbao-Marcos³, Miguel A. Sánchez-Alemán⁴ y Myrna Déciga-Campos⁵

¹Laboratorio de Bioquímica Clínica, Facultad de Farmacia; ²CA Farmacia Clínica y Diagnóstico Molecular, Facultad de Farmacia; ³Facultad de Psicología, Universidad Autónoma del Estado de Morelos; ⁴Centro de Enfermedades Infecciosas, Instituto Nacional de Salud Pública, Cuernavaca, Mor. México; ⁵Sección de Estudios de Posgrado e Investigación, Escuela Superior de Medicina del Instituto Politécnico Nacional, Ciudad de México, México

Resumen

En el presente estudio se determinó mediante técnicas analíticas la cuantificación de algunos biomarcadores que podrían ser de utilidad para detectar el consumo temprano de etanol entre la población estudiantil. Se analizó un grupo de 117 alumnos de reciente ingreso a la Universidad Autónoma del Estado de Morelos. La determinación enzimática de aspartato aminotransferasa (AST), alanina aminotransferasa (ALT) y γ -glutamyl transferasa (GGT) como marcadores metabólicos de etanol, y la concentración de transferrina deficiente de carbohidrato (CDT) mediante la cromatografía de líquidos (hasta un 1.8% de CDT) permitieron identificar que el 6% de la población estudiantil presentaba un riesgo potencial de consumo de alcohol. El empleo del método bioquímico-analítico en conjunto con un instrumento psicológico de drogas y factores de riesgo (DROYFAR) establecido en la Universidad Autónoma del Estado de Morelos permite la identificación de aquellos estudiantes que, por el consumo de sustancias de abuso, ponen en riesgo su eficiencia terminal y nivel académico. Mediante su detección oportuna al ingreso a la universidad se puede dar seguimiento y apoyo a los estudiantes consumidores de sustancias de abuso.

PALABRAS CLAVE: Biomarcadores de alcohol. Consumo de alcohol en México. Alcohol en estudiantes universitarios.

Abstract

The present study determined through analytic techniques the quantification of some biomarkers that have been useful to detect early ethanol consumption in a college population. A group of 117 students of recent entry to the Universidad Autónoma del Estado de Morelos was analyzed. The enzyme determination of aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase, and gamma glutamyltransferase as metabolic markers of ethanol, as well as the carbohydrate-deficient transferrin (CDT) detected by high chromatographic liquid (up to 1.8% of CDT), allowed us to identify that 6% of the college population presented a potential risk of alcohol consumption. The use of the biochemical-analytical method overall with the psychological drug and a risk factor instrument established by the Universidad Autónoma del Estado de Morelos permit us to identify students whose substance abuse consumption puts their terminal efficiency at risk as well as their academic level. The timely detection on admission to college can monitor and support a student consumer's substance abuse. (Gac Med Mex. 2016;152:151-7)

Corresponding author: Sara García Jiménez, saragarcia@uaem.mx

KEY WORDS: Alcohol biomarker. Alcohol consumption in Mexico. Alcohol in college students.

Correspondencia:

*Sara García-Jiménez
Laboratorio de Bioquímica Clínica, Facultad de Farmacia
Universidad Autónoma del Estado de Morelos
Av. Universidad, 1001
Col. Chamilpa, C.P. 62209, Cuernavaca, Mor., México
E-mail: saragarcia@uaem.mx

Fecha de recepción: 19-11-2014
Fecha de aceptación: 15-04-2015

Introducción

En México la deserción escolar y el bajo desempeño académico en universitarios de todo el país se deben, entre varios factores sociales, al consumo de sustancias de abuso¹. El consumo de bebidas alcohólicas es una práctica común entre los jóvenes, debido al fácil acceso que se tiene a ellas y al bajo costo de las bebidas de muy baja calidad analítica. El abuso del consumo de alcohol genera cambios a nivel cerebral, produciendo tolerancia y dependencia; por ello, los consumidores de alcohol y tabaco fácilmente pueden continuar en poco tiempo con el consumo de otras sustancias de abuso como la marihuana y la cocaína^{2,3}. De acuerdo a la Encuesta Nacional de Adicciones del año 2011 (ENA 2011) de la Secretaría de Salud de México, el consumo de alcohol se incrementó considerablemente de 2002 a 2011. En la población de 12 a 65 años se observó un aumento significativo del consumo de alcohol: el consumo esporádico (alguna vez en la vida) pasó del 64.9 al 71.3%, la prevalencia de consumo en los últimos seis meses, del 46.3 al 51.4% y la prevalencia del último mes, del 19.2 al 31.6%. Un estudiante que ingresa a la universidad tiene una edad promedio de 19 años, y en esta etapa de la vida ya ha estado expuesto al consumo de alcohol y tabaco. De acuerdo a la ENA 2011, este sector de población incrementó el consumo considerablemente. El consumo esporádico (alguna vez) en los jóvenes de entre 18 y 20 años pasó del 35.6 al 42.9%, tanto en hombres (del 11.5 a 17.4%) como en mujeres (del 2.7 al 11.6%). En 2013 se publicó un estudio realizado en la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo que determinó una incidencia del consumo de alcohol del 76.9% en los jóvenes universitarios, y se determinó que no había diferencias entre hombres y mujeres (73.7 y 78.5%, respectivamente)⁴. Por todo ello, es necesario e indispensable que las universidades cuenten con un programa para detectar a tiempo el consumo de sustancias de abuso entre los jóvenes universitarios, y poder eliminar el riesgo de deserción escolar, el inicio de otras sustancias de abuso y, en muchas ocasiones, casos de violencia.

En la Universidad Autónoma del Estado de Morelos se implementó y validó un instrumento de evaluación psicológico denominado DROYFAR, con el cual se pretendía diagnosticar los posibles riesgos relacionados con el consumo de sustancias de abuso a los cuales podían verse sometidos los adolescentes⁵. Previamente, nuestro grupo de trabajo correlacionó este

instrumento con el consumo de marihuana y cocaína, mediante el análisis analítico de los metabolitos δ 9-THCA-A y benzoilergonina, respectivamente. Se determinó que el instrumento era adecuado para detectar a los jóvenes en alto riesgo por consumo de sustancias de abuso⁶.

El objetivo del presente trabajo fue determinar la utilidad de algunos biomarcadores de alcohol para que, junto con el instrumento DROYFAR, se pudiera detectar de manera temprana el consumo de alcohol en estudiantes de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

Los biomarcadores que se propusieron fueron las enzimas GGT⁷, ALT⁸, AST⁹ y CDT¹⁰, además del volumen corpuscular medio (VCM)^{11,12}.

Método

Aplicación del instrumento DROYFAR

De acuerdo al diario oficial *Tierra y libertad* (2007)¹³, el instrumento DROYFAR tiene como objetivo identificar los factores que influyen en los estudiantes y que ponen en riesgo su desempeño académico, así como su salud mental y física. Este cuestionario evalúa 6 áreas relacionadas con la salud mental, las relaciones familiares, el nivel educativo, la conducta agresiva, el rendimiento académico y la información sobre los efectos y daños del uso y abuso de sustancias. La idea de aplicar este instrumento permite a las autoridades universitarias, con base en los resultados obtenidos en la población, solventar las decisiones para la prevención y/o atención oportuna a los jóvenes con riesgo de deserción, con percepción de bajo nivel académico, deficiente comunicación con su familia, cambios frecuentes del estado de ánimo o agresión manifiesta contra el medio, entre otros problemas. El instrumento fue aplicado a 117 estudiantes a su ingreso a la Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

Muestras biológicas

Para seleccionar a los estudiantes se realizó un muestreo no probabilístico y de tipo incidental, es decir, que participaron estudiantes que estaban presentes en el momento de aplicar el instrumento DROYFAR. La muestra estuvo conformada por 74 mujeres y 43 hombres, estudiantes de diferentes carreras de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos. El instrumento DROYFAR fue evaluado por el Departamento de Psicología de la universidad bajo la dirección del Dr. Fernando Bilbao. Se solicitó una muestra sanguínea

de cada participante mediante una punción venosa (5 ml) y una muestra de orina (10 ml). Con la finalidad de determinar el estado de salud general de los estudiantes, la sangre total fue analizada mediante una biometría hemática (cuantificación de leucocitos, hemoglobina y VCM) y las muestras de orina, con tiras reactivas (determinación de pH, densidad, nitritos, proteínas, glucosa, cuerpos cetónicos y la evaluación microscópica correspondiente). Otra parte de las muestras sanguíneas fueron centrifugadas a 3,500 g durante 5 min y el suero se almacenó a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ para el análisis de la concentración de etanol y las enzimas ALT, AST y GGT.

Determinación enzimática de ALT, AST, GGT y etanol

La actividad de las enzimas ALT, AST y GGT se determinó con kits enzimáticos de laboratorios Roche-USA y en un equipo automatizado Cobas c 111 (Roche USA). Se utilizaron 100 μl de suero con el sustrato correspondiente de cada enzima; la medición se basa en la oxidación de NADH por lactato deshidrogenasa y/o malato deshidrogenasa, formando un compuesto capaz de absorber luz ultravioleta (405 nm para GGT y 340 nm para ALT y AST).

Determinación de etanol en muestras sanguíneas

La cuantificación sanguínea de alcohol se realizó mediante un ensayo enzimático colorimétrico a 340 nm, empleando un kit de diagnóstico Roche-COBAS USA. El etanol presente en la muestra sanguínea reacciona con el NAD⁺ y la enzima alcohol deshidrogenasa, para producir acetaldehído y NADH reducido, el cual es proporcional a la cantidad de alcohol en la muestra.

Determinación de CDT

Para la determinación de transferrina glucosilada se implementó un método analítico previamente validado por Helander, et al. (2003)¹⁴, utilizando la cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC). En una muestra de 200 μl de suero se saturó con hierro la transferrina con 40 μl de una solución 10 mmol/l de ácido férrico nitrilotiacético (FeNTA); cada molécula de transferrina se une como máximo a dos iones hierro de forma instantánea, por lo que no se requiere incubación. La solución de FeNTA se preparó con 275 mg de sal monohidratada trisódica de ácido nitrilotiacético

y 270 mg de FeCl_3 en 90 ml de agua. En esta muestra las lipoproteínas fueron precipitadas por una solución de sulfato de dextrán- CaCl_2 (20 g/l y 1 mol/l, respectivamente). Las muestras fueron colocadas en hielo durante 30-60 min y centrifugadas a 3,500 g durante 5 min. Los 100 μl del sobrenadante fueron diluidos en una proporción 2:5 con una solución amortiguadora Bis-Tris 10 mM pH 6.2 para dar estabilidad a la transferrina.

Para cuantificar las glucoformas de transferrina se inyectaron 100 μl de la muestra en una HPLC de la marca Waters utilizando una columna de intercambio iónico Waters Protein Pak Q 15 HR 15 μm (10 x 100 mm), con un detector UV a 470 nm y una elución por gradiente de cuatro soluciones *buffers* de composición variable: solución A: Bis-Tris 10 mM pH 7; solución B: Bis-Tris 10 mM + 0.5 M NaCl pH 6.2; solución C: Bis-Tris 10 mM pH 6.2 y solución D: NaCl 2 M.

Resultados

En el presente trabajo participaron 74 mujeres y 43 hombres de recién ingreso a la Universidad Autónoma del Estado de Morelos, a los cuales se les aplicó el instrumento DROYFAR. Se determinó un intervalo de edad de 18-20 años; el 62% mencionaron haber consumido alguna sustancia de abuso inicial (alcohol [44%], alcohol y tabaco [11%] y sólo tabaco [7%]). Se detectó que la población analizada, en su mayoría, aún contaba con estabilidad familiar, ya que el 86% de los participantes vivían con familiares.

A todos los encuestados se les tomó una muestra sanguínea y una de orina, a las cuales se les realizó un análisis de biometría hemática y un análisis general de orina, respectivamente. Todas las muestras analizadas, tanto de hombres como de mujeres, se encontraron dentro de los valores normales de referencia para la población en la ciudad de Cuernavaca (Morelos); sólo el 4% presentó una ligera leucopenia y el 5%, leucocitosis. El 4% de las mujeres y el 14% de los hombres presentaron hipocromía.

Por otra parte, se cuantificaron las enzimas GGT, AST y ALT como posibles marcadores de alcohol, y todas las muestras, excepto siete, se encontraron dentro de los límites normales de referencia. En la tabla 1 se presenta el número de muestras que se encontraron fuera de los límites normales de las concentraciones enzimáticas de AST, ALT y GGT. La concentración de AST resultó alta en las siete muestras, en tanto que la de ALT y la de GGT sólo lo fueron en dos de éstas. Con la finalidad de descartar que el aumento de la

Tabla 1. Número de estudiantes con los biomarcadores enzimáticos aumentados

Enzima	Valores de referencia	Número de muestras con valores aumentados	
	U/l	Hombres	Mujeres
AST	31 en mujeres y 36 en hombres	4 (42, 44, 50, 52)	3 (40, 42, 50)
ALT	38 en mujeres y 55 en hombres	2 (64, 66)	2 (48, 56)
GGT	38 en mujeres y 55 en hombres	2 (79, 98)	2 (42, 120)

Tabla 2. Perfil del gradiente utilizado para la separación de glucoformas de transferrina por HPLC

Tiempo (min)	Solución A (%) [*]	Solución B (%) [†]	Solución C (%) [†]	Solución D (%) [§]
0.00	100	0	0	0
1.00	100	0	0	0
1.01	0	0	100	0
30.00	0	30	70	0
30.01	0	0	0	100
35.00	0	0	0	100
35.50	100	0	0	0
37.00	100	0	0	0

^{*}Solución A: 10 mmol/l Bis-Tris pH 7.

[†]Solución B: 10 mmol/l Bis-Tris + 0.5 mol/l NaCl pH 6.2.

[†]Solución C: 10 mmol/l Bis-Tris pH 6.2.

[§]Solución D: NaCl 2M.

concentración de enzimas fuera debido a una hepatitis B o C, se utilizaron tiras reactivas de pruebas rápidas, y se determinó que ninguno de los sujetos era positivo a estas pruebas.

El VCM es considerado un biomarcador cuando el consumo de alcohol es alto. En el presente trabajo ningún participante mostró un aumento significativo de este parámetro (94.6 fl), por lo que en el presente estudio no se propuso como biomarcador.

La determinación de etanol en suero se realizó mediante un método enzimático colorimétrico a 340 nm validado con una precisión del 0.5% de coeficiente de variación; con este método se puede determinar un intervalo de concentraciones de 10 a 500 mg/dl. Todos los resultados de las muestras analizadas fueron inferiores al límite de detección (10 mg/dl).

Para cuantificar las glucoformas de transferrina se evaluaron cuatro soluciones diferentes por HPLC. En la tabla 2 se muestra el perfil cromatográfico del gradiente obtenido a una velocidad de flujo de 1 ml/min.

Para determinar la CDT se implementó el método analítico por HPLC de intercambio iónico¹⁴. Las diferentes glucoformas eluyeron durante 20-30 min (Fig. 1). Para determinar la reproducibilidad, se consideró el área bajo la curva (ABC) de la disialotransferrina (ABC: 1565.4 ± 94.6; CV: 6.0%) y se obtuvo una precisión del 6%. La linealidad se determinó con cuatro soluciones diferentes de suero al 50 (100 µl), al 100 (200 µl), al 150 (300 µl) y al 200 (400 µl), y se obtuvo un coeficiente de 0.99.

Todas las muestras analizadas presentaron valores por debajo del 2% de CDT; las siete muestras más altas presentaron en promedio un valor del 1.8%. Con la finalidad de establecer que el método de cuantificación de los diferentes biomarcadores era adecuado, se procesaron ocho muestras positivas de un grupo de sujetos de un centro de rehabilitación del Estado de Morelos clasificados como altos consumidores crónicos de alcohol. El nivel enzimático máximo de las enzimas de esta población control osciló entre los

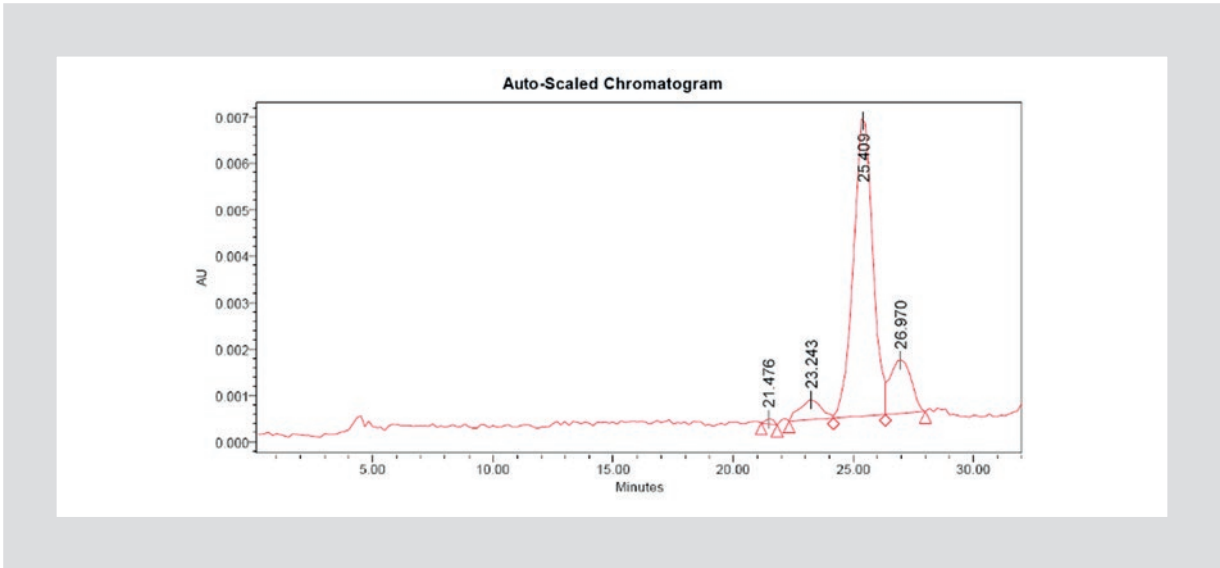


Figura 1. Cromatograma de análisis de evaluación de CDT: de izquierda a derecha, aparecen las glucoformas de transferrina disialotransferrina (21'), trisialotransferrina (23'), tetrasialotransferrina (25') y pentasialotransferrina (27').

siguientes valores: ALT: 89-186 U/l; AST: 47-64 U/l, y GGT: 69-315 U/l. En la figura 2 se representan los valores «positivos» de CDT (eje Y) con respecto a los valores obtenidos de las muestras de estudiantes (eje X). Las muestras de consumidores crónicos de etanol se representan en color gris y fueron mayores al 2.2% con respecto a los determinados en la muestra estudiantil.

De acuerdo a la determinación enzimática de ALT, AST y GGT, se detectaron siete estudiantes con posible riesgo de alcoholismo; estos datos están

correlacionados con los valores más cercanos al límite más alto de CDT (1.8%). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas con respecto a los valores más bajos detectados en cuatro de las muestras positivas de CDT (2-3%) mediante una prueba t de Student utilizando $p < 0.05$. Por ello, se puede establecer que el método analítico enzimático de ALT, AST y GGT y el cromatográfico de CDT son adecuados para detectar el consumo de alcohol.

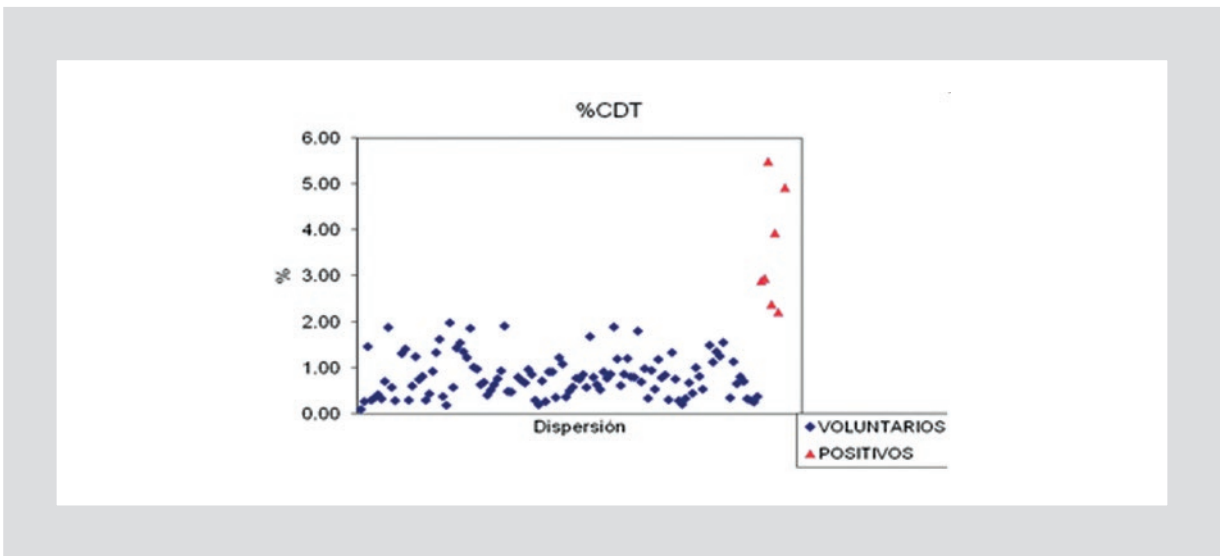


Figura 2. Dispersión de los valores séricos de CDT; en azul se muestran los valores de los estudiantes voluntarios y en rojo, los de las muestras obtenidas en un centro de rehabilitación de Cuernavaca (Morelos).

Es importante señalar que no se detectaron niveles de CDT ni de enzimas (ALT, AST, GGT) tan altos como en las muestras de control positivas, debido a que estas últimas correspondían a bebedores crónicos de alcohol y los jóvenes universitarios eran consumidores iniciales.

Discusión

El instrumento DROYFAR se implementó en la Universidad Autónoma del Estado de Morelos en 2005 con la finalidad de detectar a tiempo los casos de estudiantes que podrían formar parte del grupo de deserción escolar o de bajo rendimiento por el uso de sustancias de abuso. Mediante este instrumento de evaluación en el presente estudio se detectó que el 62% de los 117 estudiantes evaluados había estado expuesto al consumo de sustancias de abuso; se desconoce cuáles forman parte de un grupo de alto riesgo que podría continuar con otras sustancias como la marihuana y la cocaína.

Con la finalidad de identificar realmente a los estudiantes de alto riesgo que no evadieran la detección mediante el instrumento DROYFAR aplicado, se decidió analizar una serie de biomarcadores de etanol.

Un biomarcador se define como una característica que es objetivamente medida y evaluada como un indicador de un proceso biológico normal, un proceso patológico o una respuesta farmacológica a una intervención terapéutica. Los biomarcadores se clasifican en marcadores de estado, cuando están ausentes antes y después de la enfermedad, y su presencia puede ser útil en el diagnóstico y tratamiento, y marcadores de rasgo, cuando son indicadores presentes a lo largo de la vida entera del individuo y pueden coexistir con la enfermedad¹⁵.

De acuerdo a la literatura, las enzimas AST, ALT y GGT, así como el VCM y el valor de CDT, son considerados como biomarcadores para detectar el alto consumo de etanol⁸⁻¹⁰. En el presente estudio el VCM se excluyó como biomarcador porque no se encontraron diferencias significativas con respecto a los valores normales. La determinación de las concentraciones de etanol tampoco fue de utilidad ya que no se pudieron determinar concentraciones mayores al valor de referencia⁸⁻¹⁰. Así, sólo se consideraron como biomarcadores las enzimas AST, ALT y GGT, además del valor de CDT⁸⁻¹⁰. El aumento de los valores enzimáticos de AST, ALT y GGT sugirió que siete individuos podían estar en el grupo de alto riesgo, y este dato se

correlacionó con los valores de CDT. Aunque se ha documentado que se requiere un valor de CDT del 2%⁹⁻¹⁰ para clasificar al individuo en un grupo de alto riesgo, en el presente estudio se determinó como valor promedio un 1.8% de CDT. Es importante considerar que este dato depende de la población analizada; por ejemplo, en Corea se ha registrado como referencia hasta el 2.4% de CDT¹⁶. En México no se tiene un dato de referencia de CDT; en este primer estudio se propone un valor del 1.8% para una población joven clasificada como de alto riesgo de consumo de etanol.

Se explican a continuación algunas consideraciones que se deben tomar en cuenta para realizar estudios futuros. Aunque el método bioquímico resultó adecuado para detectar a los consumidores de alto riesgo, es importante contar con un diagnóstico clínico, además del instrumento DROYFAR, ya que los niveles de las enzimas cuantificadas pueden verse modificados en enfermedades como la hepatitis B y C, los abscesos hepáticos, las enfermedades biliares o la cirrosis y con el consumo de medicamentos (al menos un mes antes). Además, hay que considerar que los marcadores dependen de la edad, el género y la población de estudio. Evidentemente, es necesario ampliar la muestra de estudio para establecer un valor de referencia de las enzimas AST, ALT, GGT y CDT.

Conclusiones

El método analítico empleado resulta adecuado al detectar valores mayores al 2% en individuos positivos provenientes de un centro de rehabilitación; en el caso de las muestras de estudiantes, los valores detectados fueron menores al 2%. Sin embargo, el valor de CDT, junto con la determinación de las enzimas AST, ALT y GGT, es adecuado para detectar oportunamente el consumo de alcohol en estudiantes que ingresan a la universidad. El método analítico, en conjunto con el instrumento DROYFAR, permite establecer una propuesta para detectar a tiempo a los estudiantes con un potencial riesgo de deserción por el consumo de sustancias de abuso como el etanol.

Agradecimientos

El autor agradece el financiamiento PROMEP (UAEMOR-PTC-112) y de la Facultad de Farmacia de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos para la realización de este trabajo.

Bibliografía

1. Mancha BE, Rojas VC, Latimer WW. Alcohol use, alcohol problems, and problem behavior engagement among students at two schools in northern Mexico. *Alcohol*. 2012;46(7):695-701.
2. DeWit DJ, Adlaf EM, Offord DR, Ogborne AC. Age at first alcohol use: a risk factor for the development of alcohol disorders. *Am J Psychiatry*. 2000;157(5):745-50.
3. Wagner FA, Velasco-Mondragón HE, Herrera-Vázquez M, Borges G, Lazcano-Ponce E. Early alcohol or tobacco onset and transition to other drug use among students in the State of Morelos, Mexico. *Drug Alcohol Depend*. 2005;77(1):93-6.
4. Fabelo JR, Iglesias S, Cabrera R, Maldonado MT. Tobacco and alcohol consumption among health sciences students in Mexico and Cuba. *ME-DICC Rev*. 2013;5(4):18-23.
5. Bilbao F, Palacios B. Factores psicosociales en el consumo de drogas en los adolescentes. *Revista Inventio*. 2005;1:5-7.
6. García-Jiménez S, Heredia-Lezama K, Bilbao-Marcos F, Fuentes-Lara G, Monroy-Noyola A, Deciga-Campos M. Screening for marijuana and cocaine abuse by immunoanalysis and gas chromatography. *Ann N Y Acad Sci*. 2008;1139:422-5.
7. Taracha E, Habrat B, Wozniak P, Walkowiak J, Szukalski B. The activity of beta-hexosaminidase (uHex) and gamma-glutamyltransferase (uGGT) in urine as non-invasive markers of chronic alcohol abuse: I. Alcohol-dependent subjects. *World J Biol Psychiatry*. 2001;2(4):184-9.
8. Niemela O. Biomarkers in alcoholism. *Clin Chem Acta*. 2007;377(1-2):39-49.
9. Hock B, Schwarz M, Domke I, et al. Validity of carbohydrate-deficient transferrin (%CDT), gamma-glutamyltransferase (gamma-GT) and mean corpuscular erythrocyte volume (MCV) as biomarkers for chronic alcohol abuse: a study in patients with alcohol dependence and liver disorders of non-alcoholic and alcoholic origin. *Addiction*. 2005;100(10):1477-86.
10. Reynaud M, Schellenberg F, Loiseux-Meunier MN, et al. Objective diagnosis of alcohol abuse: compared values of carbohydrate-deficient transferrin (CDT), gamma-glutamyltransferase (GGT) and mean corpuscular volume (MCV). *Alcohol Clin Exp Res*. 2000;24(9):1414-9.
11. Litten RZ, Allen JP, Fertig JB. Gamma-glutamyltransferase and carbohydrate deficient transferrin: alternative measures of excessive alcohol consumption. *Alcohol Clin Exp Res*. 1995;19(6):1541-6.
12. Schwan R, Albuissou E, Malet L, et al. The use of biological laboratory markers in the diagnosis of alcohol misuse: an evidence-based approach. *Drug Alcohol Depend*. 2004;74(3):273-79.
13. Tierra y Libertad. Órgano del Gobierno del Estado libre y soberano de Morelos. Director: Lic. Sergio Álvarez Mata. Cuernavaca, Morelos, 30 de marzo de 2007, 6.ª época 4522, páginas 1-12.
14. Helander A, Husa A, Jeppsson JO. Improved HPLC method for carbohydrate-deficient transferrin in serum. *Clin Chem*. 2003;49(11):1881-90.
15. Musshoff F, Daldrup T. Determination of biological markers for alcohol abuse. *J Chromatogr*. 1998;713(1):245-64.
16. Kim SG, Kim JS, Kim SS, Jung JG, Yun SJ, Kim EC. Relationships between the level of alcohol consumption and abnormality in biomarkers according to facial flushing in Korean male drinkers. *Korean J Fam Med*. 2013;34(2):123-30.