



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO FEDERICO GÓMEZ

**NIVELES DE L- ARGININA EN NIÑOS OBESOS CON
TRANSAMINASEMIA.**

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE
ESPECIALIDAD EN:

PEDIATRÍA MÉDICA

PRESENTA:

DR. DANIEL IBARRA RÍOS.

ASESOR DE TESIS:

DR. SALVADOR VILLALPANDO CARRIÓN.



HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO
FEDERICO GÓMEZ
División de Estudios de Posgrado

MÉXICO, D. F.

FEBRERO 2009



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.

DR. SALVADOR VILLALPANDO CARRION
Jefe de Departamento de Pre y Post grado
Hospital Infantil de México Federico Gómez

AGRADECIMIENTOS:

A los niños del Hospital Infantil de México que diariamente transforman mi vida y me permiten crecer como ser humano.

Al Dr. Villalpando por permitirme trabajar con una mente brillante.

A la Dra. Fengyang Huang y al Q.F.B. José Alfredo Pérez Ontiveros por su ayuda a la determinación de los niveles de L- Arginina en el Departamento de Investigación en Farmacología y Toxicología.

A mi gran amigo el Químico Ajax Pérez por ayudar a un médico a entender química.

A la Dra. María Argelia Escobar por facilitarme y asesorarme con las fotos de la biopsia que ilustran el marco teórico.

A Dios por darme vida y a la mejor familia que puede existir Jorge, Cecilia, Andrés y la luz de mi vida la Dra. Viridiana.

A mi Abuela Carmen, la Nana y mi abuela Queta.

A la guardia de los soberbios.

A todos los doctores que me han brindado su amistad y enseñado durante la residencia en especial a las Doctoras Murguía, Zapata, Villaguillén, Santillán, Villanueva, Gutiérrez, Cerón, Peña y Heller y los Doctores Pacheco, Zamora, García y Olivar,

A mis amigotes de toda la vida Gon, Peter, Núñez, Peña, Paco, Carlos, Pedro Antonio, Juacas, Ilse y Daniela

ÍNDICE

Título.....	4
Antecedentes.....	4
Marco teórico.....	4
Planteamiento del problema.....	13
Pregunta de Investigación.....	13
Justificación.....	14
Objetivos.....	14
Metodología.....	14
Resultados.....	16
Análisis estadístico.....	18
Discusión.....	20
Conclusión.....	22
Limitaciones.....	22
Bibliografía	23
Anexo 1: Figuras.	

TÍTULO:

Niveles de L- Arginina en niños obesos con transaminasemia.

ANTECEDENTES:

La obesidad pediátrica representa una pandemia en el siglo XXI. Es favorecida por factores como hábitos sedentarios, aumento en las porciones de los alimentos y cambios en los patrones alimenticios que incluyen: un aumento en la ingesta de alimentos ricos en grasa, sacarosa, fructosa y carbohidratos refinados. La obesidad en el niño se sigue considerando por el común de los pediatras y cuerpo médico en general, como una condición clínica poco importante, por lo cual no se tiene en cuenta rastrear en estos pacientes afecciones de los diferentes órganos y sistemas asociadas a obesidad. La esteatohepatitis es un hallazgo común en los pacientes con obesidad. Se describió por primera vez en adultos en 1970 y hasta 1980 se reportó una patología similar en niños. Se considera la enfermedad hepática crónica más común en los Estados Unidos y muchas partes del mundo¹. El daño hepático puede conducir de manera temprana a la cirrosis y la falla hepática. El primer caso de cirrosis hepática en un niño secundario a una esteatohepatitis no alcohólica fue reportada en Japón (donde se cree que hay reportes anteriores en su lengua natal) en 1984²⁹. Esta situación tan deletérea puede ser prevenida con la detección temprana e intervención oportuna.

MARCO TEÓRICO:**Introducción:**

La esteatohepatitis se define como el depósito de lípidos en las células hepáticas. Se asocia fuertemente con la obesidad y la resistencia periférica a la insulina, problemas cada vez más frecuentes en nuestra población. Este padecimiento puede pasar inadvertido por un largo periodo de tiempo sin tener manifestación clínica alguna. Puede ser un hallazgo ocasional o bien, puede presentarse como cirrosis hepática, con una considerable actividad inflamatoria y fibrosis extensa. El

daño hepático crónico puede conducir de manera temprana a la cirrosis y la falla hepática, Esta situación tan deletérea puede ser prevenida con la detección temprana y oportuna de la esteatosis hepática.

Terminología:

La esteatohepatitis se describe en la literatura internacional como Enfermedad del Hígado Graso No Alcohólico (EHGNA), del inglés Non Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD). Este término se refiere al amplio espectro de enfermedades hepáticas que van de una esteatosis simple (acumulación de grasa en el hígado) a una esteatohepatitis no alcohólica (EHNA o NASH, del inglés non-alcoholic steatohepatitis) y se refieren a acumulación grasa en el hígado que lleva a inflamación, hasta una cirrosis hepática (cicatrización irreversible y avanzada del hígado como resultado de la inflamación crónica).¹ Se utilizarán las transaminasas Alanino Aminotransferasa (ALT) y Aspartato Aminotransferasa (AST).

Epidemiología:

De acuerdo a la Encuesta Nacional de Nutrición de 1999², el promedio nacional de sobrepeso y obesidad para niños de 5 a 11 años fue de 27%. La prevalencia fue mayor en los estados del norte del país (34%) que colindan con Estados Unidos, donde los índices de obesidad infantil son muy elevados. El incremento de obesidad en las últimas décadas nos orienta a pensar que la incidencia de esteatosis hepática ha aumentado de manera paralela.²

La EHGNA probablemente representa la causa más común de enfermedad hepática en la comunidad pediátrica. La prevalencia reportada en la población general de niños y adolescentes va del 2.6 a 9.6%. Como se verá más adelante en el texto no existe un consenso para diagnosticar EHGNA, por lo que la prevalencia varía según el criterio utilizado en los estudios ya existentes: a) valores elevados de aminotransferasa de alanina (ALT), prevalencia de 3% en Estados Unidos³ y de 3.2% en Korea⁴; b) Más de 5% de los hepatocitos conteniendo grasa macrovesicular, prevalencia de 9.6% en Estados Unidos⁵; c) Ultrasonido con esteatohepatitis, prevalencia de 2.6% en Japón⁶.

Se ha reportado EHGNA de un 25 a 75 % en poblaciones con obesidad o Diabetes Mellitus tipo II.⁷ La prevalencia de la esteatosis hepática en nuestra

población obesa es desconocida. Hay un estudio realizado en México por Flores y colaboradores donde se reportan una prevalencia de 42% en niños con sobrepeso y obesidad.⁸

El principal factor de riesgo para desarrollar EHGNA es la obesidad, los niños tienen una prevalencia más elevada que las niñas mostrando una relación de 2:1. Una explicación a este fenómeno es que los estrógenos promueven el uso de lípidos como una fuente energética y la distribución de grasa no visceral, haciendo menos factible que el exceso de grasa se deposite en el compartimento intra abdominal²². A pesar de que se ha encontrado que los niños negros tienen mayores factores de riesgo para presentar hígado graso como son la obesidad y resistencia periférica a la insulina, estos tienden a presentar bajas tasas de EHGNA comparados con niños blancos e hispanos⁹. En estos últimos predomina la histología tipo 2 (ver más adelante)¹⁹.

Típicamente se describe la enfermedad en preadolescentes y adolescentes aunque existen casos desde preescolares³⁰.

La incidencia de cirrosis hepática en pacientes pediátricos con esteatosis se ha estimado por debajo del 1% del total de los casos.¹⁶ A pesar de que la incidencia de daño extenso al hígado en la población pediátrica con obesidad es menor comparada con la que se observa en pacientes adultos, el establecimiento temprano de la obesidad y el daño hepático, es un factor pronóstico para el desarrollo de fibrosis y cirrosis en la edad adulta. En un estudio de autopsias en Estados Unidos para establecer la prevalencia de EHGNA se encontró que ésta fue de 9.6% en niños de 2 a 19 años²⁰.

Fisiopatología:

En adultos se considera la EHGNA como la presentación hepática del síndrome metabólico^{27, 31}. La fisiopatogenia del incremento en los ácidos grasos circulantes asociado a obesidad central y una resistencia periférica de insulina explica un “primer golpe” en la lesión hepática. El aumento de la entrega de ácidos grasos al hígado se acompaña de una disminución en el metabolismo en los hepatocitos llevando a una acumulación neta de triglicéridos en el hígado. Esta acumulación

de grasa en el hígado exacerba la resistencia a la insulina ya que interfiere con la fosforilación de sustratos de los receptores de insulina¹⁰. Hay aumento en la expresión hepática del citocromo p450 E1 que puede ser un mediador importante de este proceso¹¹. Esto origina un círculo vicioso donde el síndrome metabólico conduce a cambios grasos en el hígado y viceversa. Se ha demostrado en ratas Zucker (ratas que tienen deficiencia de leptina y desarrollan hígado graso) que al existir esteatohepatitis se presenta una disminución en el flujo regional hepático y por lo tanto la oxigenación de la hemoglobina es menor. Existe hipoxia hepática inhibiéndose la función respiratoria con fuga de electrones a nivel mitocondrial formándose especies reactivas de oxígeno³⁹. Un “segundo golpe” puede ser causado por una serie de agresiones citogénicas que se han identificado y se proponen como posibles causas etiológicas; el estrés oxidativo juega un papel clave. Las alteraciones identificadas y postuladas como probables causas son: disfunción mitocondrial, cambios tisulares secundarios a la exposición crónica de citocinas (el más importante TNF- α) y adipocitocinas (adiponectina, resistina y leptina)²⁷, inadecuada detoxificación y/o un proceso inadecuado de citoprotección que incluye incremento de procesos oxidativos, deficiencia de antioxidantes como vitamina E y óxido nítrico, (propósito de este trabajo)¹². Ver Figura 1.

L-Arginina y la vía del óxido nítrico:

Como se describe en la sección anterior el estrés oxidativo juega un papel muy importante en el “segundo golpe” de la fisiopatología de la esteatohepatitis. Así mismo se acepta que la EHGA es la manifestación hepática del síndrome metabólico. Desde hace tiempo se reconoce el impacto de la vía L arginina-óxido nítrico en el estrés oxidativo y la patogenia del síndrome metabólico³⁷. Inicialmente estudiado en aterosclerosis se encontró que la liberación inapropiada de óxido nítrico o niveles bajos de L-arginina (su precursor) se asociaban a un aumento en la formación de trombos³⁸. Se reconoció su papel como vasodilatador endógeno que previene la agregación plaquetaria e inhibe la proliferación del músculo liso.

En el síndrome metabólico y en la esteatohepatitis suceden varios efectos:

- a) Hay defectos en la liberación de óxido nítrico estimulado por insulina.
- b) El estrés oxidativo aumenta la inactivación del óxido nítrico.
- c) Alteraciones en la función de la adiponectina reduce la activación del óxido nítrico endotelial y aumenta el estrés oxidativo.
- d) Hay una disminución global de la biodisponibilidad del óxido nítrico.

Al presentarse el círculo vicioso donde el síndrome metabólico causa esteatosis y viceversa por fosforilación e inactivación de los receptores de insulina, se genera a nivel mitocondrial (tras peroxidación de productos lipídicos y producción de factor de necrosis tumoral alfa) un desequilibrio, aumentando el número de electrones que entran a la cadena respiratoria y bloqueando de manera parcial la salida de los mismos, estos electrones reaccionan directamente con el oxígeno formando especies reactivas como los peroxinitritos que dañan el DNA⁴⁰.

En un estudio de experimentación animal realizado por el Dr. Salvador Villalpando se bloqueó por vía enteral la síntesis de la enzima óxido nítrico sintetasa (NOS), encontrando un incremento en la concentración plasmática de ácidos grasos libres y triglicéridos, así como la concentración hepática de triglicéridos (esteatosis hepática) y su disminución al suplementar a los animales con L-arginina.¹⁸

La manera en que L-arginina produce óxido nítrico es solo a través de la enzima NOS teniendo como producto final citrulina. De manera análoga es posible obtener citrulina a través de la acción del complejo enzimático arginasa. Sin embargo, la tasa de producción de óxido nítrico solamente depende de la concentración de arginina. Este sistema enzimático no tiene reversibilidad y el destino del óxido nítrico que tiene una vida media fugaz de algunos milisegundos es muy diverso. El paso inicial es la producción de los compuestos nitrito y nitrato en su forma reducida. Estos compuestos se han utilizado en estudios en humanos como marcadores de actividad de NOS. La excreción renal de ambos compuestos es casi al 100%, sin embargo, algunos pueden ser sustrato de nitrosilación de proteínas como hemoglobina, albúmina, etc. La presencia o ausencia de esteatosis hepática en niños con resistencia a la insulina y síndrome metabólico

puede ser un marcador de variabilidad en el metabolismo de las lipoproteínas así como alteraciones en los mecanismos para contender con un exceso de ácidos grasos⁴¹. Ver Figura 2.

Diagnóstico:

Actualmente la obesidad, el sobrepeso y más aún la EHGNA son sumamente subdiagnosticadas. Una muestra de ello es el estudio realizado por Riley y colaboradores donde se analizaron 2256 visitas al pediatra general, endocrinólogo pediatra y gastroenterólogo pediatra. Se realizó el diagnóstico solo en el 31% de los niños obesos. El abordaje para síndrome metabólico ocurrió con más frecuencia durante la visita al endocrinólogo y el diagnóstico de EHGNA fue realizado mayoritariamente por gastroenterólogos pediatras⁴⁰. El abordaje habitual de los pacientes obesos en la práctica pediátrica cotidiana no incluye la monitorización de la función hepática ni de otros padecimientos asociados a obesidad

Tabla 1. Patologías asociadas con esteatosis hepática.²⁷

General o sistémicas:

- a) Enfermedad sistémica aguda con deshidratación y/o infección sistémica.
- b) Desnutrición calórico- protéica.
- c) Emancipación aguda.
- d) Nutrición parenteral total.
- e) Cirugía bariátrica.
- f) Enteropatía por intolerancia al gluten.
- g) Síndrome nefrótico.
- h) Diabetes mellitus I.
- i) Hepatitis C crónica.

Enfermedades metabólicas heredadas:

- a) Deficiencia de α 1- antitripsina.
 - b) A-beta o hipobetalipoproteinemia.
 - c) Enfermedad por depósito de ésteres de colesterol.
 - d) Fibrosis quística.
 - e) Hiperlipoproteinemia familiar.
 - f) Galactosemia.
-

Continúa Tabla 1. Patologías asociadas con esteatosis hepática.²⁷

- g) Enfermedades por depósito de glucógeno.
 - h) Intolerancia hereditaria a la fructosa.
 - i) Tirosinemia tipo I.
 - j) Homocistinuria.
 - k) Enfermedad por depósito de lípidos neutrales (no el Síndrome Dorfman-Chanarin).
 - l) Porfiria cutánea tardía.
 - m) Síndrome de Swachman.
 - n) Enfermedad de Weber Christian.
 - o) Enfermedad de Wilson.
-

El diagnóstico de EHGNA debe ser por exclusión de otras formas de enfermedad hepática siendo las más importantes de descartar: hepatitis viral (B y C), autoinmune, medicamentosa (valproato, metotrexate, tetraciclinas, amiodarona, prednisona, etc), enfermedad de Wilson y deficiencia de α 1-antitripsina.

Los niños pueden estar asintomáticos o quejarse de dolor abdominal leve en un 42 a 59%¹³. La hepatomegalia es frecuente en la exploración física. Frecuentemente coexiste con dislipidemia siendo la más frecuente hipertrigliceridemia. La acantosis nigricans (pigmentación negra en pliegues y axilas asociado con hiperinsulinemia) se ha asociado en un 50%¹³. La transaminasemia (elevación de alanino y aspartato transferasa) son predictores de la enfermedad; generalmente se encuentran de 2 a 3 veces su valor basal²⁸ pero puede existir enfermedad significativa con transaminasas normales. La ALT se puede encontrar de ligeramente elevada a 10 veces su valor normal.

La evaluación histológica es la única manera de establecer el grado de esteatosis. Básicamente se establecen dos tipos de histología.¹⁴ La de tipo 1 o adulta que se caracteriza por esteatosis, inflamación celular y vacuolización citoplásmica y fibrosis perisinusoidal. La de tipo 2 se caracteriza por esteatosis así como inflamación y fibrosis portal. Ver Figura 3.

Tabla 2. Hallazgos histológicos encontrados en biopsias hepáticas de niños y adultos con EHNA

Variable	Niño	Adulto
Frecuencia en niños	+++	+
Esteatosis	+++	+
inflamación celular y vacualización citoplásmica	-	+
Cirrosis	+	+
Inflamación	Portal	Lobular
Fibrosis	Portal o sin	Perisinusoidal/pericentral.

En la microscopía electrónica se encuentran anomalías estructurales mitocondriales como son inclusiones paracristalinas y megamitocondrias.

El ultrasonido y la resonancia magnética pueden ser utilizados en el estudio pediátrico. La grasa en el hígado dispersa y atenúa el rayo ultrasonografico produciendo un aumento difuso en la ecogenicidad (brillantez) del parénquima hepático. El ultrasonido tiene una sensibilidad del 82 a 89% y una especificidad de 93% para identificar un infiltrado graso⁹. La gran limitante es que es operador y equipo dependiente. La cuantificación exacta del grado de esteatosis no es posible y es útil para la detección en casos de esteatosis severa pero su sensibilidad disminuye si el grado de esteatosis es menor del 30% en la biopsia²¹.

La resonancia magnética puede ser el método ideal para establecer la presencia de grasa en el hígado. Las señales emitidas por el agua y la grasa se detectan en fase o fuera de fase. Al comparar la intensidad de la señal en las imágenes en fase y fuera de fase se puede establecer la presencia de esteatosis y cuantificarse aproximadamente¹⁹. Una modalidad más exacta es la Espectroscopia por Resonancia Magnética en la cual se cuantifica la manera en la que resuenan los protones en el agua y en la grasa (a diferentes frecuencias) con lo cual se pueden determinar las señales emitidas tanto por el agua como por la grasa para

establecer las fracciones de grasa y obtener con más precisión la cantidad de lípidos en el parénquima hepático¹⁹.

La biopsia hepática es un procedimiento relativamente seguro (mortalidad de 0.03%). Este método representa el único fiable para diagnosticar EHGNA y establecer el pronóstico. Se ha propuesto como criterios para realizar una biopsia^{27, 31, 32}:

- a) Enfermedad grave o avanzada.
- b) Hepatoesplenomegalia o comorbilidades.
- c) Diabetes mellitus u obesidad mórbida.
- d) Relación AST/ALT mayor a 1.
- e) Enfermedad persistente a pesar de cambios en el estilo de vida.

Pronóstico:

Dependiendo las series consultadas la historia natural de la EHGNA es que un 25 a 35% desarrollarán fibrosis; de estos de un 9 a un 20% desarrollarán cirrosis; finalmente 22 a 33% de los pacientes cirróticos morirán de insuficiencia hepática o requerirán un trasplante³³. Ver Figura 1. Los pacientes diagnosticados con cirrosis hepática requerirán de un trasplante hepático para reducir el riesgo de mortalidad y preservar la función hepática.

Tratamiento:

La dieta y el ejercicio se consideran la primera línea de tratamiento¹⁹. Algunos estudios recientes han logrado demostrar que el disminuir tan solo 2 kg de peso mejora de manera considerable el patrón de transaminasemia en los pacientes obesos.¹⁵ Sin embargo la baja de peso acelerada o dietas con muy bajas en kilocalorías (menos de 500) pueden empeorar la inflamación hepática y la fibrosis.¹⁷ Las dietas deben ser rediseñadas, no restrictivas; una dieta con bajo índice glicémico puede ser apropiada²³. Las recomendaciones son para toda la familia e incluyen más de 5 raciones de frutas y verduras al día, menos de dos horas de televisión al día, no tener televisión en la habitación de los niños, minimizar o eliminar bebidas azucaradas, tomar desayuno, comer con la familia en

casa, mas de una hora de actividad física diario⁴². Se han estudiado antioxidantes como la vitamina E la cual actualmente es estudiada como monoterapia en un estudio doble ciego controlado tanto en niños como adultos²⁴. Tanto el ácido ursodesoxicólico como la pentoxifilina no han demostrado ser efectivos en el tratamiento de EHGNA en niños²⁵. El único fármaco que ha tenido resultados favorables en población pediátrica es metformina²⁶ y forma parte de los protocolos en curso de la “NASH Clinical Research Network”.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA:

La infusión o administración de L- Arginina ha demostrado ser beneficiosa al inducir la síntesis de óxido nítrico en mujeres preeclámpticas⁴³ (disminuyendo la presión arterial) y en diabéticos con úlceras por presión⁴⁴ (mejorando la tasa de curación). Asimismo al suplementar L-arginina en las ratas Zucker diabéticas anteriormente mencionadas logró disminuir la masa adipocitaria⁴⁵. En un estudio de experimentación animal realizado por el Dr. Villalpando se bloqueó por vía enteral la síntesis de la enzima oxido nítrico sintetasa (NOS), encontrando un incremento en la concentración plasmática de ácidos grasos libres y triglicéridos, así como la concentración hepática triglicéridos (esteatosis hepática) y su disminución al suplementar a los animales con L-arginina.¹⁸

¿Es este modelo aplicable a la población pediátrica?

PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN:

1. ¿Tienen los niños con obesidad y transaminasemia niveles séricos bajos de L- Arginina comparados con lo reportado en la literatura internacional?
2. ¿Hay una relación entre transaminasemia que traduce inflamación hepática y niveles bajos de L-Arginina que reflejan un defecto en el sustrato de la vía del óxido nítrico?

JUSTIFICACIÓN:

La detección de esteatosis en la infancia o adolescencia es una ventana de oportunidad para realizar acciones para la prevención de cirrosis hepática. Asumiendo que el 27% de la población menor de 15 años de edad sufre de sobrepeso y obesidad y que la prevalencia de EHGNA sea similar a la de la población norteamericana (15%), cerca de 1.3 millones de niños mexicanos sufren EHGNA actualmente. Por lo tanto, la monitorización y tamizaje dirigidos de los pacientes obesos para detectar cambios hepáticos puede resultar en una herramienta considerable de prevención de cirrosis hepática en la edad adulta. De igual manera, contribuir a entender mejor los factores etiológicos de la esteatosis hepática podría contribuir a diseñar mejores conductas terapéuticas y preventivas.

OBJETIVOS:

1. Determinar niveles de L-Arginina en pacientes obesos con transaminasemia y sin transaminasemia y compararlos. (Los reportados como normales en la literatura internacional son de 45 – 75 µg/dL) .
2. Proveer de un marco teórico para experimentar la suplementación de L-Arginina para mejorar la condición bioquímica, metabólica y de síntesis de óxido nítrico.

METODOLOGÍA:

Se trata de un estudio de cohorte, actual, con niños entre 9 y 17 años obesos atendidos en el Instituto Nacional de Salud Hospital Infantil de México Federico Gómez.

Se conformó el grupo de obesos con transaminasemia con los siguientes criterios de inclusión:

1. Contar con un consentimiento informado.
2. Obesidad considerada como un IMC > percentila 95.

3. Transaminasemia definida como niveles de AST mayor o igual 60 mg/dL y/o ALT mayor o igual a 45 mg/dL.
4. Ausencia de otras causas de hepatitis.

Se reclutaron 8 pacientes que cumplen los criterios de inclusión anteriormente mencionados y posteriormente 8 controles con obesidad sin transaminasemia. Previo consentimiento informado se realizó una exploración física y la toma de productos para determinar en suero transaminasas y niveles de L-Arginina.

Análisis cuantitativo de aminoácidos por HPLC (High performance liquid chromatography o cromatografía líquida de alta eficiencia) para detectar niveles de L-arginina en suero. Ver figura 4.

A. Preparación de la muestra (suero)

1. Recolección de la muestra sanguínea de pacientes obesos sometidos al estudio.
2. Separación de la muestra en suero por centrifugación para la cuantificación de niveles séricos de L-Arginina.
3. Resguardo de muestras a -70°C.
4. Utilización de estándar interno (Norvaline 1000 µM) para reproducibilidad del método.
5. Utilización de Alcohol Etílico grado HPLC en frío (2 a 6°C) para precipitación de proteínas y purificación de la muestra.
6. La técnica de purificación de la muestra sérica se realizó por los métodos de centrifugación y precipitación simple considerando la fuerza de 10,000g por 10 min.
7. Evaporación del sobrenadante de la muestra con nitrógeno (N₂)
8. Incorporación del residuo seco con fase móvil de fosfatos a pH=7.8 con 200 µL.
9. Inyección de la muestra 50 µL.
10. Análisis cuantitativo de niveles séricos de L-Arginina.

B. Cuantificación por HPLC de L-arginina

El análisis cromatografico cuantitativo para la determinación de los niveles de L- Arginina en niños con transaminasemia, se desarrollo con la técnica de análisis por reacción de derivatizacion usando oftalaldeido (o-phthalaldehyde, OPA) para la serie de aminoácidos primarios; utilizando las siguientes condiciones de HPLC para su separación:

- Cromatógrafo Perkin Elemer cuaternario
- Solución Buffer de Boratos.
- Fase Móvil: A: NaH_2PO_4 (Solución de Fosfatos) pH: 7.8
B: ACN: MeOH : H_2O (v/v)
(Acetonitrilo 45% : Metanol 45% : Agua 10%)
- Columna Zorbax Eclipse-AAA 4.6 x 150 mm , 5 μm
- Flujo: 2 min/mL
- Tiempo de corrida: 20 min
- Detector: (DAD) Arreglo de Diodos-Perkin Elmer
- Longitud de onda: 338 nm UV
- Inyección: 50 μL

RESULTADOS:

Dentro del grupo de obesos con transaminasemia encontramos una edad promedio de 11 años, 63% hombres y 37% mujeres, con un peso promedio de 57.5 kg, talla promedio de 145 cm y un índice de masa corporal de 27.15 Kg/m^2 . El 62% tiene estudio de imagen y solo un niño está biopsiado. Se encontró una AST promedio de 76.85 mg/dl y una ALT promedio de 145.12 mg/dl. La L- Arginina en este grupo tiene un rango de 114.39 $\mu\text{g/dl}$ $\pm$ 37.84 desviaciones estándar.

Tabla 3. Características clínicas y demográficas de los pacientes obesos que cursaban con transaminasemia

No	Nombre/ Sexo.	Edad (años)	Patología concomitante	Peso (Kg)	Talla (cm)	IMC Kg/m ²	Estudios de imagen/Biopsia	AST (mg/dl)	ALT (mg/dl)	L-ARGININA (µg/dl)
1	A.A.P (F)	10	Púrpura de Henoch Schönlein/Nefrótico secundario. Asma leve intermitente. Rinitis alérgica	52	147	24	USG esteatosis difusa.	60	112	191.8
2	A.A.R.C. (M)	10	No.	65.4	144	31.5	Biopsia: NASH. Figura 3.	80	179	139.01
3	A.G.F. (M)	12	No.	59.5	146	27.9	USG esteatosis difusa	154	383	75.58
4	C.A.M.G. (M)	12	Rinitis leve persistente.	73	158	29.3	RMI Abdomen hígado de tamaño y situación normal	53	80	139.92
5	D.S.M.V. (M)	11	Pólipos inflamatorios	52	148	26.0	No.	86	136	89.65
6	J.J.S.H. (M)	10	CIV.	43.2	124	28.5	No.	52	115	79.29
7	S.G.G. (F)	15	No.	71.5	162	25.4	TAC hígado graso	33	76	85.09
8	S.A.S.(F)	9	Morfea.	44	135	24.4	No.	97	80	114.83

USG: ultrasonido abdominal, EHNA esteatohepatitis no alcohólica, RMI: imagen por resonancia magnética, TAC: tomografía axial computarizada, AST: aspartato aminotransferasa, ALT: alanino aminotransferasa, IMC: índice de masa corporal, CIV: comunicación interventricular.

Dentro del grupo de obesos sin transaminasemia encontramos una edad promedio de 14 años, 75% hombres y 25% mujeres, con un peso promedio de 78 kg, talla promedio de 160 cm y un índice de masa corporal de 30.3 Kg/m². Ninguno tiene estudio de imagen ni está biopsiado. Se encontró una AST promedio de 25.12 mg/dl y una ALT promedio de 28.37mg/dl. La L- Arginina en este grupo tiene un rango de 123.84 µg/dl ± 33.41 desviaciones estándar.

Tabla 4. Características clínicas y demográficas de los pacientes obesos que cursaban sin transaminasemia

No	Nombre/Sexo	Edad (años)	Patología de concomitante	Peso (Kg)	Talla (cm)	IMC Kg/m ²	Estudios de imagen	AST (mg/dl)	ALT (mg/dl)	L- ARGININA (µg/dl)
1	J.A.C.S. (M)	11	No	56	150	24.88	No.	34	26	129.73
2	R.D.S. (M)	14	Rinitis alérgica.	69	164	25.74	No.	25	31	67.49
3	J.J.M.C. (M)	15	Rinitis alérgica.	64	162	24.42	No.	15	30	101.35
4	J.T.T. (M)	15	No.	89	163	33.58	No.	17	20	146.85
5	C.K.C.S. (F)	17	No.	78	157	31.7	No.	28	29	108.43
6	K.C.L. (F)	16	No.	106	157	43.08	No.	32	35	106.62
7	C.A.B.G. (M)	13	No.	60	146	28.16	No.	28	29	184.36
8	G.E.M.S. (M)	16	No.	102	183	30.9	No,	22	27	145.95

AST: aspartato aminotransferasa, ALT: alanino aminotransferasa, IMC: índice de masa corporal,

ANÁLISIS ESTADÍSTICO:

1. Se compararon las diferencias de dos muestras independientes constituidas por el grupo de obesos con transaminasemia y el grupo de obesos sin transaminasemia. Se realizó una prueba de T de Student.

Tabla 5. Comparación de Niveles de L- Arginina entre obesos con transaminasemia (casos) y obesos sin transaminasemia (controles).

	CASOS	CONTROLES	T (P)
AST	76 +- 35	25+-6	P< 0.1
ALT	145 +-95	28 +-4	P < 0.01
ARG	114 +- 37	123 +- 33	P= 0.31

AST: aspartato aminotransferasa, ALT: alanino aminotransferasa, ARG: L-arginina, T: prueba t de Student

2. Se midió el grado de correlación (r de Pearson) entre la transaminasemia y los niveles séricos de L- Arginina.

Tabla 6. Correlación (Pearson) entre transaminasas y niveles séricos de L-Arginina.

	AST	ALT	ARG
AST	X	0.91	-0.27
ALT	0.91	X	-0.32
ARG	-0.27	-0.32	X

AST: aspartato aminotransferasa, ALT: alanino aminotransferasa, ARG: L-arginina,

En la población total se encontraron niveles de Arginina con un rango de 67.49 a 191.8 µg/dl con un promedio de 119.12µg/dl $\pm$ 37.19 desviaciones estándar.

DISCUSIÓN:

La EHGNA es una entidad muy importante representando hoy en día la causa más frecuente de enfermedad hepática crónica en la infancia^{1, 5, 6, 7, 8, 12, 16, 20, 27, 31, 33}. Su diagnóstico e intervención oportuna requiere de un alto grado de sensibilización por parte del clínico. Desgraciadamente esta entidad no es ampliamente difundida y es subdiagnosticada tanto por pediatras como por sub-especialistas alrededor del mundo⁴⁰. Acompañando al amplio espectro de daño que genera la obesidad y el síndrome metabólico la infiltración hepática da manifestaciones clínicas evidentes ya cuando ha avanzado la enfermedad gravemente y en muchas ocasiones de manera irreversible. Hacen falta estudios de prevalencia en México para establecer con precisión la magnitud del problema, sin embargo, en muchas partes del mundo se ha demostrado su prevalencia en la población general y de manera mucho más alarmante en población con sobrepeso y obesidad^{1, 5, 6, 7, 8, 12, 16, 20, 27, 31, 33}. El hecho de ser población hispana representa por si sola un importante factor de riesgo⁹. El incremento en la prevalencia de la obesidad en nuestro país junto con el amplio espectro que engloba el síndrome metabólico y la resistencia periférica a la insulina ha llevado a un aumento en la detección de las complicaciones asociadas y a su estudio para dilucidar la fisiopatología subyacente. El síndrome metabólico se puede entender como un conjunto de factores de riesgo para aterosclerosis y enfermedad cardiovascular, hepática y renal en la cual la resistencia a la insulina juega un papel primordial. Para varios autores la EHGNA representa el componente hepático del síndrome metabólico²⁷. En este estudio se reclutaron 31% niñas y 68% niños (que corresponde con la proporción reportada en la literatura internacional de presentación de EHGNA) de 9 a 17 años con una media de 12.8. Como se ha visto las manifestaciones clínicas y el diagnóstico tanto de síndrome metabólico en la infancia así como EHGNA se realiza en la pre adolescencia y adolescencia lo cual corresponde con nuestra cohorte. Como se explicó anteriormente en la fisiopatología de la infiltración grasa del hígado con inflamación y fibrosis posterior, se reconocen dos fases:

1. En la primera hay aumento de ácidos grasos circulantes asociado a obesidad central y una resistencia periférica a la insulina. En este rubro la intervención adecuada es la prevención primaria entendiendo a la población general mexicana como población en riesgo y promover hábitos alimenticios y de actividad física adecuados.
2. El segundo evento se refiere a una serie de agresiones citogénicas que se han identificado como son: disfunción mitocondrial, cambios tisulares secundarios a la exposición crónica de citocinas (el más importante es el $\text{TNF-}\alpha$) y adipocitocinas (adiponectina, resistina y leptina)²⁷, inadecuada detoxificación y/o un proceso inadecuado de citoprotección que incluye incremento de procesos oxidativos, deficiencia de antioxidantes como vitamina E y el óxido nítrico¹². Es aquí donde cobra relevancia el estudio realizado.

Desde hace tiempo se reconoce el impacto de la vía L arginina-óxido nítrico en el estrés oxidativo y patogenia del síndrome metabólico³⁷. En la esteatohepatitis hay defectos en la liberación de óxido nítrico estimulado por insulina; el estrés oxidativo aumenta la inactivación del óxido nítrico; las alteraciones en la función de la adiponectina reduce la activación del óxido nítrico endotelial y aumenta el estrés oxidativo y hay una disminución global de la biodisponibilidad del óxido nítrico.

Basados en los estudios experimentales en animales y la demostración de la inducción de óxido nítrico al suplementar con L- Arginina decidimos realizar la medición de esta en suero (reflejando el sustrato de la vía) y comparar los resultados en una cohorte de obesos con transaminasemia (reflejando inflamación hepática) y otros sin esta. Posteriormente medimos la correlación entre los niveles de AST y ALT y los niveles de L- Arginina. Con la muestra con la que contamos no encontramos diferencias estadísticamente significativas entre ambas cohortes ($P=0.31$). Sin embargo creemos que si se aumenta el número de la muestra se pueden obtener resultados favorables. El hallazgo interesante es un coeficiente de correlación inverso entre niveles altos de ALT y niveles bajos de L-Arginina ($r=-0.32$). Esto apoya la hipótesis que uno de los factores que agrava el segundo golpe en la fisiopatología de la EHGNA es un sustrato bajo para la síntesis de

óxido nítrico con ALT reflejando inflamación hepática y niveles bajos de L-Arginina reflejando un bajo sustrato y viceversa. ($r=-0.32$). Ver Figura 5.

Esto se correlaciona con los resultados encontrados por Park y colaboradores⁴ quienes encontraron en una población de 1594 preadolescentes y adolescentes en Korea una razón de probabilidad (odds ratio) de 1.5, 2.6 y 6.2 para aquellos pacientes con 1,2 y 3 factores de riesgo con una fuerte asociación entre ALT y síndrome metabólico. Esto es importante en el contexto de la detección temprana que lleve a un tratamiento oportuno. Esta correlación entre ALT elevada que refleja inflamación hepática y se ha validado como factor de riesgo para desarrollar síndrome metabólico y niveles bajos de L- Arginina son altamente sugerentes de la participación de la disminución de la síntesis de óxido nítrico en la segunda fase de daño hepático y hacen factible la posibilidad de suplementar L- Arginina en niños obesos con transaminasemia esperando un cese o disminución del daño.

CONCLUSIONES:

La EHGNA es una entidad muy importante representando la primera causa de hepatopatía crónica adquirida en la infancia y cobrará aún más importancia con el paso del tiempo. Este estudio provee de un marco para corroborar y reproducir los datos y experimentar la suplementación de L- arginina con el objetivo de aumentar la síntesis de óxido nítrico y mejorar los procesos de citoprotección y detoxificación disminuyendo la inflamación hepática.

LIMITACIONES DEL ESTUDIO:

El tamaño de la muestra puede influir en la comparación de la cohorte de niños obesos con transaminasemia y sin esta. No hay rangos establecidos de L- Arginina sérica en población pediátrica.

BIBLIOGRAFÍA:

1. D. Papandreou, I. Rousso, I. Mavromichalis. Update on non-alcoholic fatty liver disease in children. *Clin Nut* 2007; 26, 409-415.
2. Rivera J, Shamah T, Villalpando S, Gonzalez de Cossio T et-al. Encuesta Nacional de Nutricion 1999 estado nutricional de niños y mujeres en Mexico. Instituto Nacional de Salud Publica, México. 2001.
3. Strauss RS, Barlow SE, Dietz WH. Prevalence of abnormal serum aminotransferase values in overweight and obese adolescents. *J Pediatr* 2000; 136:727–33.
4. Park HS, Han JH, Choi KM, et al. Relation between elevated serum alanine aminotransferase and metabolic syndrome in Korean adolescents. *Am J Clin Nutr* 2005;82:1046–51.
5. Schwimmer BJ, Deutsch R, Kahen T, Lavine EJ, Stanley C, Behling C. Prevalence of fatty liver in children and adolescents. *Pediatrics* 2006;118:1388–93.
6. Tominaga K, Kurata JH, Chen YK, et al. Prevalence of fatty liver in Japanese children and relationship to obesity. An epidemiological ultrasonographic survey. *Digest Dis Sci* 1995;40:2002–9.
7. McCullough A. Update on nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Gastroenterol* 2002; 34(3):255-262.
8. Flores-Calderon J, Gomez-Diaz RA, Rodriguez-Gomez G, Moran- Villota S. Frequency of increased aminotransferases levels and associated metabolic abnormalities in obese and overweight children of an elementary school in Mexico City. *Ann Hepatol* 2005;4(4):279–83.
9. Schwimmer JB, McGreal N, Deutsch R, Finegold MJ, Lvine JE. Influence of gender, race, and ethnicity on suspected fatty liver in obese adolescents. *Pediatrics* 2004; 126:T1093.
10. Samuel VT, Liu ZX, Qu X, et al. Mechanism of hepatic insulin resistance in non-alcoholic fatty liver disease. *J Biol Chem* 2004;279:32345–53.

11. Schattenberg JM, Wang Y, Singh R, Rigoli RM, Czaja MJ. Hepatocyte CYP2E1 over expression and steatohepatitis lead to impaired hepatic insulin signaling. *J Biol Chem* 2005;280: 9887–94.
12. Roberts E. Steatohepatitis in children. *B Pract Res Clin Gastro* 2002, 16 (5):749-765.
13. Schwimmer JB, Deutsch R, Rauch JB, Behling C, Newbury R, Lavine JE. Obesity, insulin resistance, and other clinicopathological correlations of pediatric nonalcoholic fatty liver disease. *J Pediatr* 2003;143:500–5.
14. Schwimmer JB, Behling C, Newbury R, et al. Histopathology of pediatric nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2005; 42:641–9.
15. Frelut ML, Rasakarivony R, Cathelineau L, Navarro J. Uneven occurrence of fatty liver in morbidly obese children: Impact of weight loss. *Int J obes* 1995; 22 (suppl 2): 43.
16. Rashid M, Roberts E. Nonalcoholic steatohepatitis in children. *JPGN* 2000;30:48-53.
17. Andersen T, Gluud C, Franzmann MB, Christoffersen P. Hepatic effects of dietary weight loss in morbidly obese subjects. *J Hepatol* 1991;12:224–9.
18. Villalpando S, Jahoor F, Butte N, Merssman H, Stoll B. Administration of L-nitroarginine increases liver triglyceride content in piglets. Poster 407.5, FASEB meeting, San Diego, California, April 2003.
19. Barshop NJ, Sirlin CB, Schwimmer JB, Lavine JE. Review article: epidemiology, pathogenesis and potential treatments of paediatric non-alcoholic fatty liver disease: *Aliment Pharmacol Ther*. 2008 Jul;28(1):13-24. Epub 2008 Apr 4.
20. Schwimmer JB, Deutsch R, Kahen T, Lavine JE, Stanley C, Behling C. Prevalence of fatty liver in children and adolescents. *Pediatrics* 2006; 118.
21. Saadeh S, Younossi ZM, Remer EM, et al. The utility of radiological imaging in nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* 2002; 123: 745–50.
22. Haarbo J, Marslew U, Gotfredsen A, Christiansen C. Postmenopausal hormone replacement therapy prevents central distribution of body fat after menopause. *Metabolism* 1991; 40: 1323–6.

23. Spieth LE, Harnish JD, Lenders CM, et al. A low-glycemic index diet in the treatment of pediatric obesity. *Arch Pediatr Adolesc Med* 2000; 154: 947–51.
24. Lavine JE, Schwimmer JB. Clinical Research Network launches TONIC trial for treatment of nonalcoholic fatty liver disease in children. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2006; 42: 129–30.
25. Vajro P, Franzese A, Valerio G, Iannucci MP, Aragione N. Lack of efficacy of ursodeoxycholic acid for the treatment of liver abnormalities in obese children. *J Pediatr* 2000; 136: 739–43.
26. Schwimmer JB, Middleton MS, Deutsch R, Lavine JE. A phase 2 clinical trial of metformin as a treatment for nondiabetic paediatric non-alcoholic steatohepatitis. *Aliment Pharmacol Ther* 2005; 21: 871–9.
27. Mager D, Roberts E. Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Children. *Clin Liver Dis*; 10 (2006): 109-131.
28. Roberts EA. Non-alcoholic Steatohepatitis in children. *Clin Liver Dis*; 11 (2007): 155-172.
29. Kinugasa A, Tsunamoto K, Furukawa N, et al. Fatty liver and its fibrous changes found in simple obesity of children. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1984;3(3):408–14.
30. Fishbein M, Cox S. Non-alcoholic fatty liver disease in a toddler. *Clin Pediatr (Phila)* 2004; 43(5):483–5.
31. Abdelmalek MF, Diehl AM. Nonalcoholic Fatty Liver Disease as a complication of Insulin Resistance. *Med Clin Am* 91 (2007): 1125-1149.
32. Bayard M, Holt J, Boroughs E. Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Am Fam Phi* 2006; 73: 1961-1968.
33. Ong JP, Younossi ZM. Epidemiology an Natural History of NAFLD and NASH. *Clin Liver Dis*; 11(2007): 1-16.
34. Teerlink T. HPLC analysis of ADMA and other metilated l arginine analogs in biological fluids. *Jour of Chrom B*; 851 (2007): 21-29.

- 35.J.W. Henderson, R.D. Ricker, B.A. Bidlingmeyer, and C. Woodward, "Rapid, Accurate, Sensitive, and Reproducible HPLC Analysis of Amino Acids," Agilent Technologies, 2007
- 36.Martens-Lobenhoffer JM, Bode-Böger SM. Chromatographic-mass spectrometric methods for the quantification of L-arginine and its methylated metabolites in biological fluids. *Jour of Chrom B*, 851 (2007) 30–41
- 37.Assumpção C.R., Brunini T.M.C., Matsuura C.,I et al. Impact of the L-arginine-Nitric Oxide Pathway and Oxidative Stress on the Pathogenesis of the Metabolic Syndrome. *The open biochemistry journal*. 2008;2:108-15.
- 38.Radomski M, Salas E. Nitric oxide Biological mediator, modulator and factor of injury: its role in the pathogenesis of atherosclerosis. *Atherosclerosis* 118 (Suppl.) (1995) 69- 80
- 39.Sato, Nobuhiro. Central role of mitochondria in metabolic regulation of liver pathophysiology. *J Gastroenterol Hepatol*. 2007-Jun; vol 22 Suppl 1 (issue) : pp S1-6
- 40.Riley MR, Bass NM, Rosenthal P, Merriman RB. Underdiagnosis of pediatric obesity and underscreening for fatty liver disease and metabolic syndrome by pediatricians and pediatric subspecialists. *J Pediatr* 2005;147:839-42.
- 41.Caldwell S, Ikura Y, C lezzoni J, et al. Has natural selection in human populations produced two types of metabolic syndrome (with and without fatty liver)? *Jour of Gast and Hep* 22 (2007) Suppl. 1; S11–S19
- 42.Vos B. M, McClain CJ. Nutrition and Nonalcoholic Fatty Liver Disease in children. *Curr Gastroenterol Rep*. 2008 Jun;10(3):308-15
- 43.F. Facchinetti, M. Longo, F. Piccinini, I. Neri, and A. Volpe L-Arginine Infusion Reduces Blood Pressure in Preeclamptic Women Through Nitric Oxide Release. *Reproductive Sciences*, July 1, 1999; 6(4): 202 - 207.
- 44.Desneves, Katherine J., Todorovic, Bree E., Cassar, Ann and Crowe, Timothy 2005-12, Treatment with supplementary arginine, vitamin C and zinc in patients with pressure ulcers: A randomised controlled trial, *Clinical nutrition*, vol. 24, no. 6, pp. 979-987.

45. Fu Wenjiang J; Haynes Tony E; Kohli Ripla; et al. Dietary L-arginine supplementation reduces fat mass in Zucker diabetic fatty rats. The Journal of nutrition 2005;135(4):714-21.

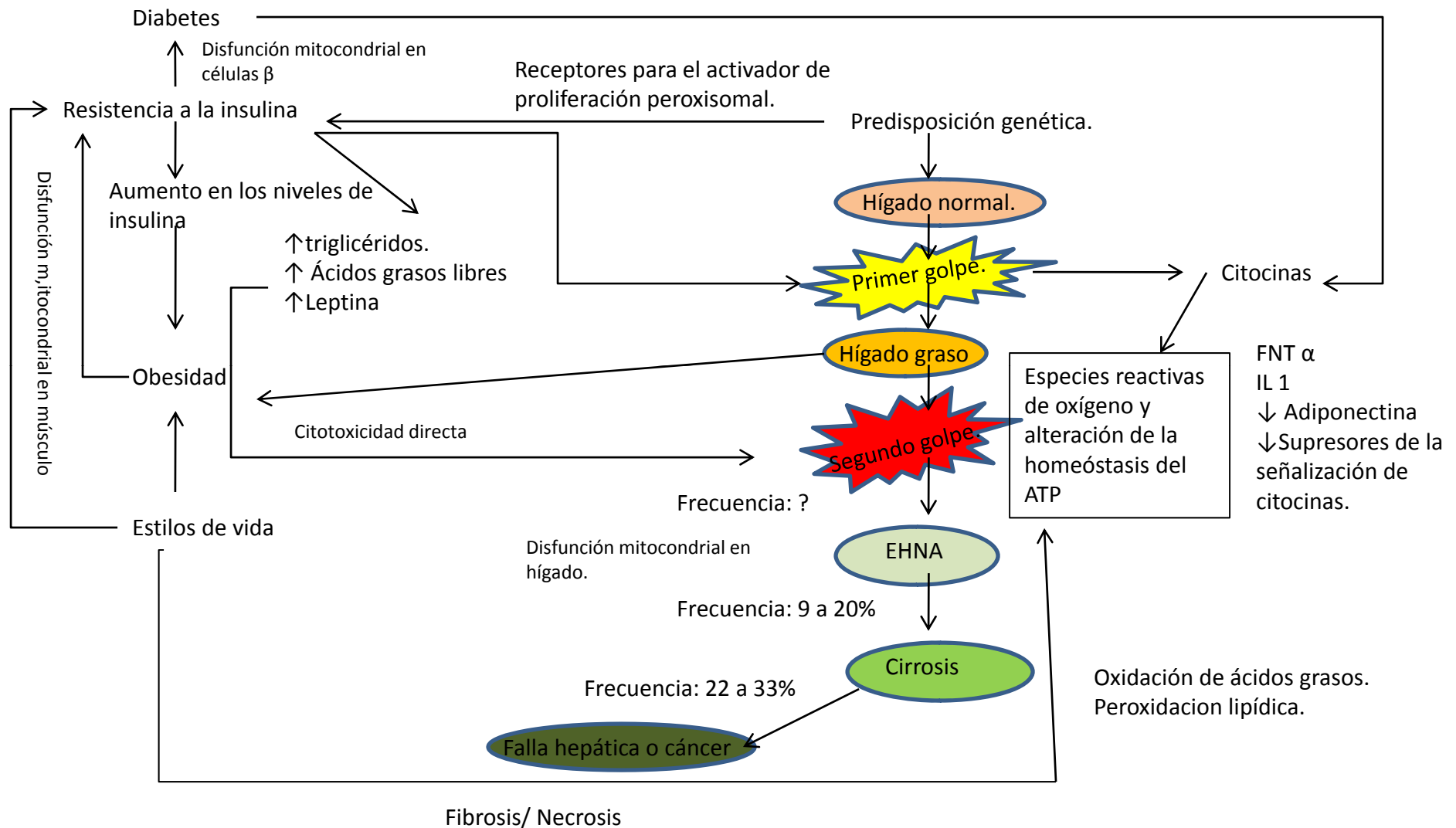


Figura 1. Fisiopatología de la EHGNA. EHGNA. Enfermedad por Hígado Graso No alcohólica. FNT α Factor de necrosis tumoral alfa. IL1. Interleucina 1. ATP. Adenin trifosfato. EHNA. Esteato hepatitis no alcohólica.

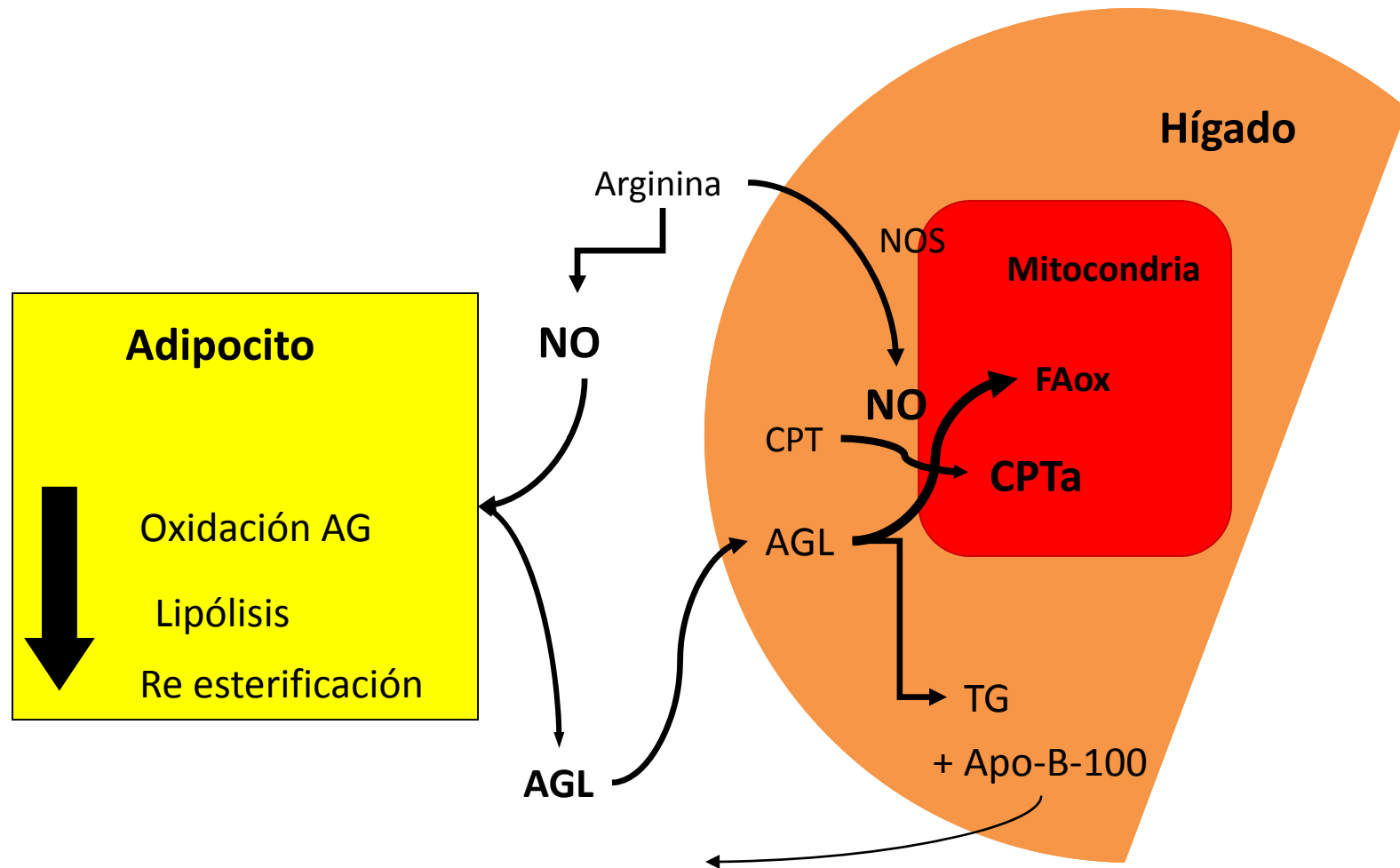


Figura 2. Vía de la L- Arginina- Oxido nítrico en la fisiopatología de la EHGNA. AG. Ácidos grasos, NO Óxido nítrico, AGL: Ácidos grasos libres, TG: Triglicéridos. NOS: Óxido nítrico sintasa, CPT: Carnitin palmitoil trransferasa. CPTa: Carnitin palmitoil trransferasa activada. FA ox: Acidos grasos libres oxidados. Apo B 100: Apoproteína B 100.

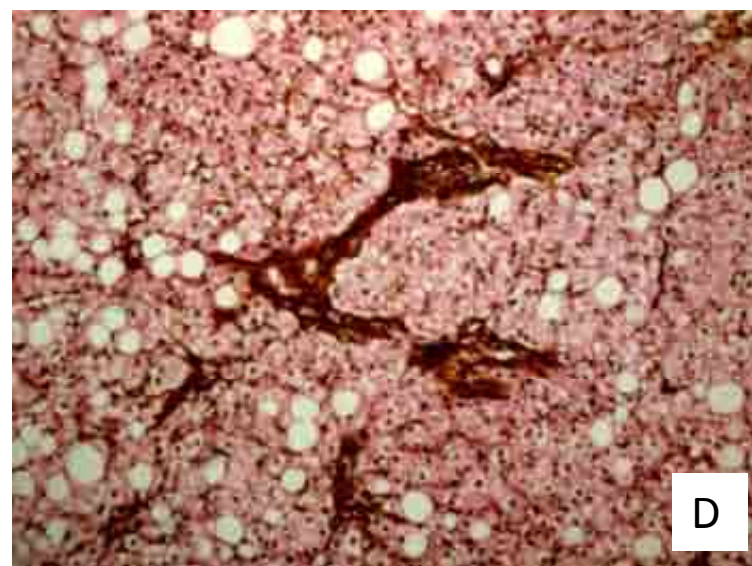
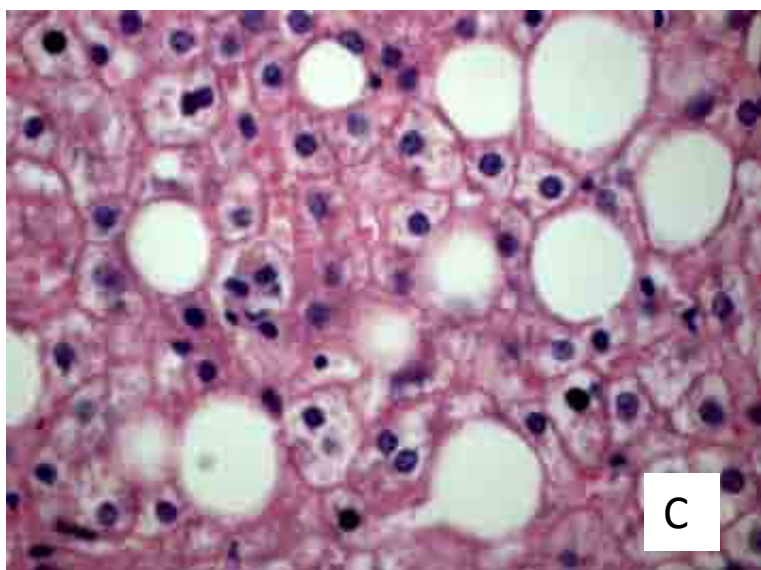
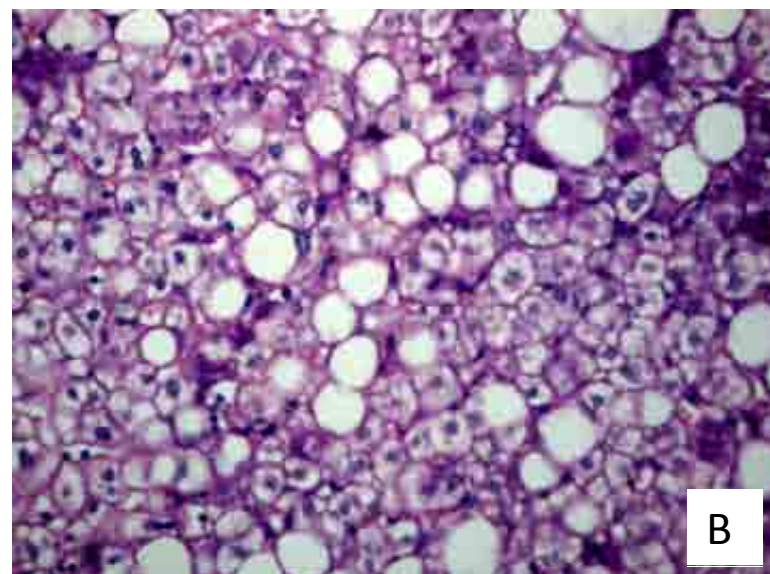
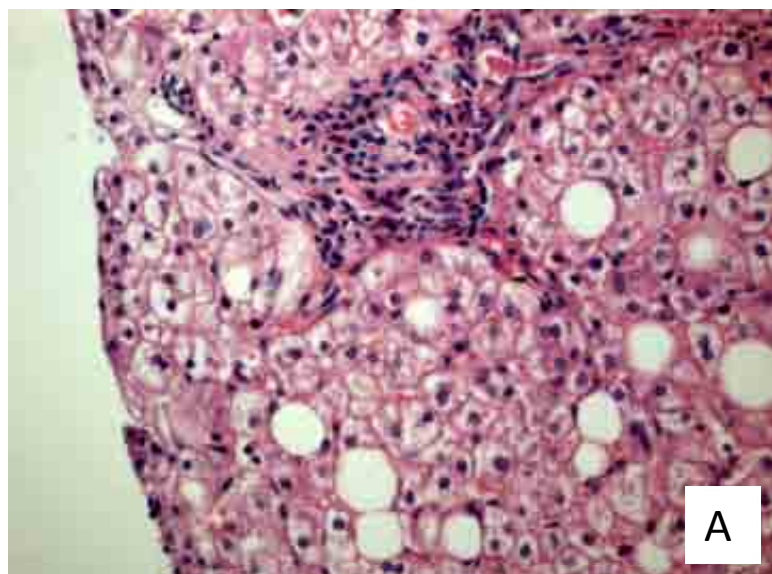


Figura 3. Biopsia hepática de uno de los pacientes con obesidad y transaminasemia (Cortesía de la Dra. María Argelia Escobar) A y C Hematoxilina Eosina. B. PAS. D. Reticulo. Se encuentra esteatosis macrovesicular panlobulillar con espacio porta respetado correspondiente a histología tipo I. (ver texto).

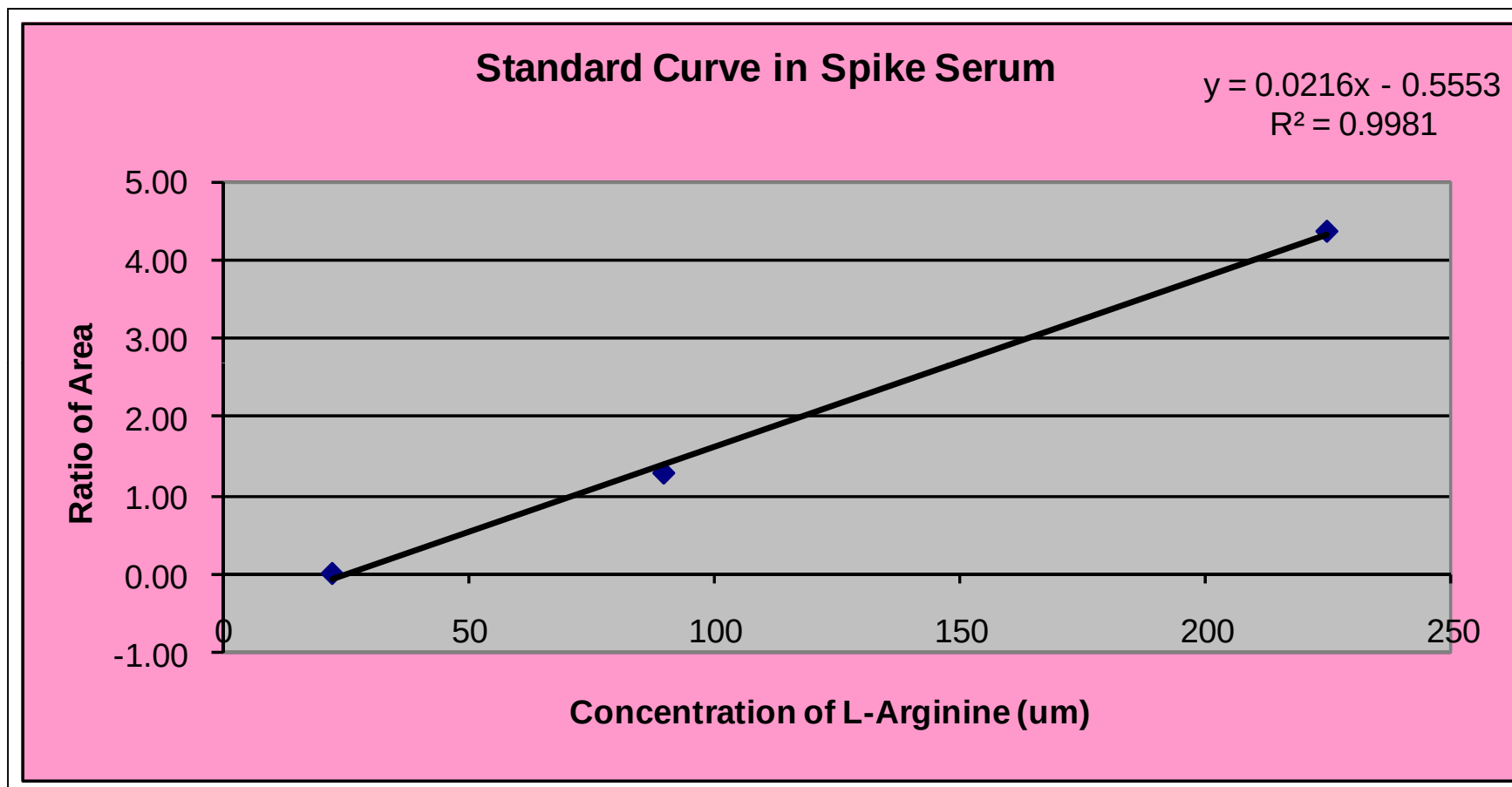


Figura 4. Curva estándar de L- Arginina en suero.

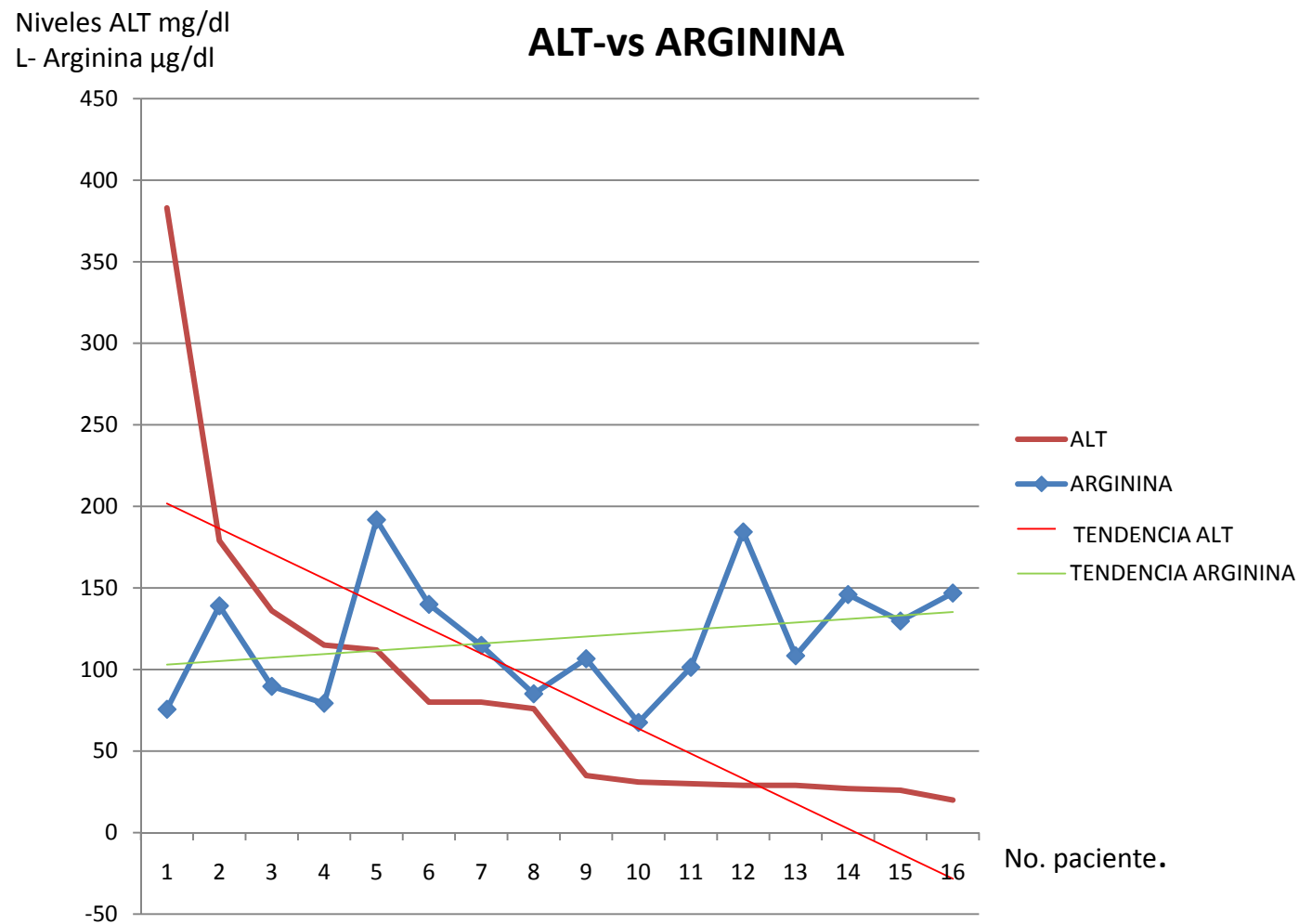


Figura 5. Correlación inversa entre ALT y L- Arginina ($r=-0.32$).