

220
"UNIVERSIDAD IBEROAMERICANA"

INCORPORADA A LA U. N. A. M.

ESCUELA DE CIENCIAS QUIMICAS

BIBLIOTECA DE C. QUIMICAS

"METODO DE DAVID G. NATHAN Y F. LEE ROOKEY, P. D.
PARA LA INVESTIGACION DEL AMONIO SANGUINEO"

TESIS

que para obtener el T. lo de

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

presenta

MARIA CLARA PINONCELY PROAL

MEXICO, D. F.

1962.

8741



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

" UNIVERSIDAD IBEROAMERICANA "

INCORPORADA A LA U.N.A.M.

ESCUELA DE CIENCIAS QUIMICAS

"METODO DE DAVID G. NATHAN Y F. LEE RODKEY, P. D.

PARA LA INVESTIGACION DEL AMONIO SANGUINEO"

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO.

PRESENTA

MARIA CLARA PINONCELY PROAL.

MEXICO, D. F.,

1962.

DESEO HACER PATENTE MI AGRADECIMIENTO AL SR. DON
LUIS M. VERA S. J. A QUIEN DEBO MI FORMACION -
PROFESIONAL Y AL SR. DR. LOUIS DUFFILHOT QUIEN -
CON SUS CONSEJOS E INCONDICIONAL AYUDA ME HIZO -
POSIBLE REALIZAR EL PRESENTE ESTUDIO.

A MIS PADRES

A MIS HERMANOS

" SUMARIO " .

INTRODUCCION.-

Introducción Histórica	1
Naturaleza del Amonio Sanguíneo	2
Métodos para determinar el Amonio Sanguíneo.....	3
Fuentes de Amonio en el Organismo.....	7
Alteraciones en el Metabolismo del Amonio.....	8
Teoría sobre el mecanismo del Coma Hepático.....	12
Coma Exógeno y Endógeno	13
Ciclo de Krebs	14
Teoría sobre el mecanismo del Ciclo de Krebs en una intoxicación por Amonio	17
Métodos para disminuir el Amonio Sanguíneo	18

METODO ESCOGIDO PARA EL ESTUDIO.- VALORES NORMALES.-

Principio	23
Reactivos	23
Material	24
Protocolo de la toma de sangre	25
Técnica	25
Curva tipo de Amonio	28
Recuperación del Amonio	29
Observaciones	29
Cuadro comparativo de determinaciones del Amonio hechas a los 15, 60 y 180 minutos después de la toma de sangre	31
Cuadro comparativo en tiempo entre sangre con ácido tri- cloroacético y sangre heparinizada con ácido tricloroacé- tico.	32

Conclusiones de los cuadros	33
Valores del Amonio Sanguíneo encontrados on adultos normales	33
Valores del Amonio Sanguíneo encontrados en niños recién nacidos sin problema	34
Valores del Amonio Sanguíneo encontrados en personas con padecimiento hepático	34
 PATOLOGIA.-	
Relación entre la Amonioemia y la Bilirrubinemia	35
La Amonioemia y la Bilirrubinemia en el Coma Hepático	35
Amonioemia y Bilirrubinemia en el Kernicterus y en la Eritroblastosis Fetal	36
 DETERMINACIONES HECHAS.-	
Valores de Amonio con Bilirrubina encontrados en niños ictericos recién nacidos	37
 BIBLIOGRAFIA.-	
Datos Bibliográficos	47

MI AGRADECIMIENTO A LA SRITA.

Q. F. B. ARACELI SANCHEZ

Y A LA SRITA. Q. F. B.

CELIA GONZALEZ MUNIZ

" INTRODUCCION " .

1.- INTRODUCCION HISTORICA.

El Amonio tuvo importancia en la investigación clínica en la última parte del siglo XIX, cuando en 1893 Hahn, Massen, Nencki y Pawlow (1), estudiando el efecto de la Fístula de Eck, operación hecha en perros, encontró que al administrar una dieta rica en proteínas provocaba un síntoma característico de desdoblamiento complejo. Se dió una alimentación rica en carne a perros, en los cuales había sido establecida una unión entre el sistema porta y el sistema venoso periférico sin pasar por el hígado, que daba como resultado la muerte de los animales. Los primeros síntomas del "Fleischvergiftung" (intoxicación por carne) eran disnea, ataxia, anorexia, ceguera y un estupor seguido por la muerte. Estos resultados no ocurrían con las dietas a base de cereales y los investigadores llegaron a la conclusión que los síntomas eran debidos al nitrógeno contenido en la carne, pues al aplicarles inyecciones intravenosas de las sales de Amonio, por la similitud de los síntomas confirmaron que se trataba de una intoxicación por Amonio. La escasa sensibilidad de las técnicas de cuantificación entonces empleadas no permitieron rectificar las hipótesis de estos primeros investigadores.

En 1913 Sweet y Ringer, y en 1932 Balo y Korpassy (2), propusieron varias interpretaciones para los síntomas neurológicos ocurridos en animales operados por la técnica de Eck.

En 1932 Van Caulaert (3) con sus experimentos, inició de nuevo el problema de Amonio en los síntomas clínicos, y demostró en efecto tóxico de las sales de Amonio en pacientes con cirrosis hepática, y al dosificarles el Amonio sanguíneo, encontró que cuando estaba elevado aparecían síntomas de estupor.

En 1935, Kirk (4) estudió el efecto de la administración oral de glicina y las sales de Amonio en pacientes con cirrosis hepática y hepatitis y en pacientes sin padecimiento hepático definido, de lo cual sacó como conclusión, que en los pacientes con hepatitis o con cirrosis, metabolizaban perfectamente el Amonio, a condición de que no hubiera unión entre el sistema porta y el sistema venoso periférico. Cuando existía una obstrucción hepática y se administraba por vía oral proteínas u otras sustancias nitrogenadas, aparecían elevadas cantidades de Amonio sanguíneo; Kirk excluyó a los pacientes que presentaban síntomas de coma.

En 1927, Burchi (5) y en 1934, Monguio y Krause (6), estudiaron que la tolerancia de las sales de Amonio estaba alterada en los padecimientos del hígado.

En 1952, Gabuzda y Phillips (7) estudiaron la relación del Amonio en el coma hepático, repitiendo y ampliando los experimentos de Van Caulaert en pacientes con cirrosis hepática, encontrando que el aumento experimental de Amonio sanguíneo podía causar síntomas de un coma hepático. Lo describieron como "Impending Hepatic Coma". Sus observaciones iniciaron una larga serie de investigaciones en muchos laboratorios, y actualmente es claro que el Amonio tiene relación en la aparición de síntomas mentales, no únicamente en enfermedad hepáticas sino también, en numerosas condiciones patológicas.

NATURALEZA DEL AMONIO SANGUINEO

Se sabe que en la sangre normal existe, en pequeñas cantidades, una sustancia que presenta propiedades alcalinas, cuya concentración aumenta en ciertas condiciones patológicas, tal sustancia es el ión Amonio (NH_4). La fijación del protón por el amoniaco para producir el ión Amonio es una ecuación reversible; a un pH de 7.4 el - -

equilibrio favorece la formación del Amoniaco.



En 1927 Jacobs y en 1938 Parpart (8), encontraron que el amoniaco (NH_3), penetra rapidamente a través de la membrana celular, a diferencia del ión Amonio, al cual son impermeables las células tisulares.

En 1956, Vanamee, Poppell, Glicksman, Randall y Roberts - - (10) hicieron estudios en perros y propusieron, que al existir en el coma Amoniogónico de animales acidóticos un aumento en la permeabilidad celular, había una toma superior de Amonio por los tejidos (diferencia arteriovenosa), que en los casos que hay alcalosis.

Warren, en 1958 (11) al hacer estudios sobre ratones, reportó una relación directa entre el pH sanguíneo y la toxicidad de las sales de Amonio. Les administró inyecciones intravenosas de cloruro, acetato, bicarbonato, carbonato, hidróxido y citrato de Amonio. Al estudiar la LD_{50} para cada sal, determinó el aumento del pH, encontró 7.05 para el cloruro a 7.74 para el hidróxido en el orden dado, y la LD_{50} decreció de 6.6 mEq/Kg. a 2.4 mEq/Kg. La causa de que la dosis letal de las sales de Amonio sea aparentemente inversa al pH encontrado en la sangre, es que cuando hay un aumento de Amonio en la célula, esta muere enseguida. El pH determina el momento en el cual el Amonio cruza la membrana celular.

METODOS PARA DETERMINAR EL AMONIO

Son de reciente descubrimiento los métodos para determinar el Amonio, en cantidades como las encontradas en los líquidos biológicos. Se basan en dos procesos generales: 1o.- La conversión del ión Amonio en amoniaco gaseoso. 2o.- La aplicación de técnicas para cuantificar el Amonio desalojado.

METODOS PARA SEPARAR EL AMONIO

a).- DESTILACION.- Los primeros métodos para separar el -- Amonio presente en una solución en cantidades mínimas se basaban en -- su destilación en medio alcalino. Este proceso se podía hacer por -- ebullición, como era la destilación original de Kjeldahl, ó usando -- técnicas más recientes, como la de Parnass y Heller (12), que consis-- te en la separación del Amonio por arrastre de vapor y su condensa--- ción en medio ácido. Este método no es muy adecuado para determinar-- las pequeñas cantidades de Amonio sanguíneo.

b).- AEREACION.- En 1919, Folín (13) empleó el primer méto-- do de aereación, alcalinizando un líquido orgánico, por ejemplo la -- sangre, para desprender el Amonio a una solución ácida. Vió que los -- valores de Amonio en la sangre de individuos normales eran constantes, y encontró que el nivel más alto de Amonio se hallaba en la sangre del sistema porta.

c).- MICRODIFUSION.- Esta técnica consiste en una destila-- ción a la temperatura ambiente, en la que por ser el Amonio una base-- volátil, pasa de una solución alcalina a una ácida.

1).- Conway.- Las demás técnicas de microdifusión están basadas en algunas variaciones de la técnica que el grupo de Conway hizo en 1933 -- (14). Se usan dos tipos de aparatos de microdifusión; el primero fué ideado por Conway: consiste en un pequeño vaso redondo, dividido a su vez en dos compartimentos: uno interior y otro exterior, el vaso lle-- va cubierta de vidrio. El ;roblema alcalinizado se encuentra en el -- compartimento exterior, desaloja el Amonio que pasa al compartimonto-- interior donde está el ácido.

2).- Seligson.- La técnica de Seligson, hecha en 1951 (15) está basa-- da, en la difusión del Amonio que se encuentra en una solución alcalil

na dentro de un frasco de vidrio, el cual lleva un tapón al que se le ha adaptado una varilla de vidrio la que está acidificada. Ya tapado el frasco de difusión, y para facilitar la liberación del Amonio, se agita este, evitando que la solución alcalina y el ácido se pongan en contacto. En el proceso el Amonio liberado es captado por la varilla acidificada, la que es lavada después, recuperando los líquidos de lavado para la dosificación.

Estos métodos para dosificar el Amonio deben ejecutarse con precaución para no dar resultados falsos, ya que:

1o.- Al usar un medio alcalino para su separación, hay que hacer la difusión exactamente en el tiempo indicado, pues si se deja demasiado tiempo puede ser la causa de la hidrólisis de algunas sustancias lábiles de la sangre, como la glutamina; por lo que es recomendable usar la técnica cuyo tiempo de difusión sea más corto.

2o.- Si no se opera rápidamente, la solución se puede contaminar con el aire del laboratorio, pues este casi siempre contiene Amonio; esto se puede evitar haciendo las determinaciones en un cuarto especial en el que el ambiente esté libre de ese ión.

3o.- Al hacer estas microtécnicas es necesario observar una rigurosa precisión al pipetear y en el manejo en general de las soluciones y reactivos para no caer en error.

MÉTODOS PARA LA ESTIMACION DEL AMONIO DESPRENDIDO.

a).- TITULACION.- El Amonio se puede titular con un ácido, o retitularse en un volumen conocido de ácido. Conway en 1947 (16), usa un volumen de ácido diluido y lo retitula con solución de hidróxido de bario. Abelin (17) usó después una solución amortiguadora de borato a un pH constante dentro del cual se difundía el Amonio. Este alteraba el pH del amortiguador, volviendo al pH original por adición

do ácido, comparandose el pH final con un control de titulación. -- Conway en 1947, también usó este método, pero su principal inconveniente es que no mide únicamente el Amonio, sino también algunas bases volátiles.

b).- REACTIVO DE NESSLER.- Seligson usó este reactivo con éxito en su técnica para medir el Amonio sanguíneo; Bessman y Bradley en 1955 (18), también lo aplicaron, encontrando que en presencia de bases volátiles desarrollaba una turbidez, mientras que en presencia de Amonio daba una coloración café.

c).- OTROS METODOS.- Barthelot (19) se basó en la coloración dada por el Amonio en presencia de fenol e hipoclorito de sodio. El color desarrollado es proporcional al Amonio contenido en la solución problema. Lubochinsky (20) hizo este reactivo más sensible al adicionarle nitroprusiato de sodio como catalizador.

En 1956, Stone utilizó el hipobromito de sodio para la microdeterminación del Amonio; se pone un exceso conocido de hipobromito alcalino y a continuación se determina el reactivo residual. Stone se basa en la decoloración completa de la fenosafranina, siendo la coloración residual inversamente proporcional al Amonio presente.

d).- NINHIDRINA.- Este reactivo se ha usado con el método de Conway y Seligson, pero principalmente, con el método de Nathan y Lee Rodkey en 1957 (21). Es muy sensible, en presencia de pequeñas cantidades de Amonio desarrollando una coloración violeta, siendo más exacto que el reactivo de Nessler. La ninhidrina en solución con agua no da coloración en presencia de pequeñas cantidades de Amonio, como son las encontradas en los líquidos orgánicos. Para mayor sensibilidad de este reactivo al cuantificar el Amonio sanguíneo, se hace una solución de este en metil celusolve a la que se le adiciona hidri

- - -

dantina y una vez que está en solución se le agrega un amortiguador de citrato de sodio 2N. De esta manera es uno de los reactivos de más -- precisión para la estimación del Amonio.

FUENTES DE AMONIO EN EL ORGANISMO.

a).- INTESTINO.- En 1919 Folín (22) descubrió que en la -- sangre del sistema porta, se encontraban los mayores niveles de Amonio del organismo. Este Amonio tiene origen en el intestino proveniente -- de dos fuentes:

1o.- La hidrólisis enzimática de las proteínas del contenido intestinal produce glutamina sobre la que actúan las glutaminasas bacterianas liberando Amonio.

2o.- También en el contenido intestinal, la hidrólisis de urea, bajo la acción de la ureasa libera Amonio. Dado a la fácil difusión de la urea, esta se encuentra presente en todos los líquidos del organismo, -- pero es en el intestino donde las bacterias que producen ureasa, deson cadenan una hidrólisis con producción de Amonio.

b).- RENAL.- Otra causa de Amonio en el organismo es el de la circulación de las venas renales. El Amonio urinario no deriva del Amonio sanguíneo, sino que proviene de la glutamina presente en el -- riñón y de la desaminación por oxidación de otros componentes transpor tados al riñón.

En 1952 White y Rolf (23), al hacer experimentos en anima-- los acidóticos, observaron que la actividad de la glutaminasa se en-- contraba aumentada en respuesta a la acidosis para mantener el pH en -- su normalidad; mientras que en estados de alcalosis esta actividad es-- taba disminuida, por lo que vieron que había una respuesta de la gluta-- minasa del riñón en estados de acidosis o alcalosis.

En 1954, Welt, Throuj y Burnett (24), estudiaron el efecto

tóxico de la administración de acetazolamida en los padecimientos - hepáticos, en los que vieron que inhibía la formación de Amonio por el riñón, que se ponía de manifiesto por la disminución de este en la orina, presentando los pacientes síntomas de un coma hepático y un aumento del Amonio sanguíneo. Se vió que este aumento era causado por la retención del Amonio formado en el riñón, debido a la actividad de la glutaminasa sobre la glutamina transportada a este órgano.

En 1955 Lipman, Jones y Spector (25) vieron que la síntesis del carbamil-fosfato, del Amonio y del ATP, dependían del bióxido de carbono contenido en el medio, siendo la enzima anhidrasa carbónica necesaria para liberar el bióxido de carbono del ión bicarbonato.

c).- MUSCULO.- El metabolismo del Amonio encontrado en el músculo, fué el que primeramente interesó a los fisiólogos. En 1928 Parnass y Embden notaron que en la contracción del músculo aparecían aumentos de Amonio en la sangre venosa. Sus experimentos demostraron que en las venas del brazo, los niveles de este podían aumentar de 0.5 γ /ml. de nitrógeno proveniente del Amonio a 2 ó 3 γ /ml. durante el ejercicio. En este tiempo, Schmidt descubrió que una enzima no específica desaminaba el ácido adenílico formando ácido inosínico en el músculo traumatizado. La cantidad de ácido inosínico correspondía a la cantidad de ácido adenílico desaparecido. En 1957 Clarke, Neidle, Seikar y Waelsh (26) encontraron que los grupos amida de las proteínas retornan a su estado anterior, después de la desaminación antes dicha.

ALTERACIONES EN EL METABOLISMO DEL AMONIO.

1).- INSUFICIENCIA HEPATICA.- Van Cauhaert fué el primero que experimentó en pacientes, el efecto tóxico del Amonio en las enfermedades, Gussal y Davidson, en 1949 (27) estudiaron la importancia del Amonio como factor en la producción de síntomas mentales en el --

padecimiento hepático. Vieron que el resultado de administrar una -- alimentación rica en urea y una dieta de altas proteínas, producía -- síntomas de coma en pacientes con insuficiencia hepática, quedando -- claro que el Amonio estaba asociado con el coma hepático. En 1954 -- Eiseman y Falcon (28), observaron la toxicidad del Amonio al ser ad-- ministrado en forma de sales oral o intravenosamente, produciendo un coma hepático.

2).- INSUFICIENCIA CARDIACA.- La importancia del Amonio - en los padecimientos clínicos sobresalió cuando se descubrió que un - envenenamiento por este, podía ser el mecanismo de los síntomas cerebrales asociados con el padecimiento crónico del corazón. En 1955, - Bessman y su grupo (29) demostraron que el Amonio contenido en la - - sangre estaba elevado en los padecimientos del corazón, debido a una congestión crónica pasiva del hígado, la cual impide que este desplace al Amonio que normalmente se forma en el sistema porta. Al disminuir el Amonio sanguíneo, los síntomas mentales del padecimiento del corazón estaban atenuados. En 1958, Calkins y Delph (30) lo confirmaron al estudiar 46 casos de padecimiento del corazón y encontraron que sólo en dos casos el Amonio estaba elevado.

3).- SHOCK.- En 1957 Hankins, Bessman, Esmond, Mansberger y Cowler (31) al hacer estudios en animales, encontraron un aumento del Amonio sanguíneo durante el shock hemorrágico, y esto era comparable a los niveles encontrados en los síntomas cerebrales. Si se ponía una retransfusión a este nivel, no descendía permaneciendo elevado hasta la muerte. Se creyó que la causa de este Amonio podía ser el tracto intestinal, por encontrarse altos niveles de este en el sistema porta.

4).- INTOXICACION POR ASPARAGINA.- En 1957 Van Buskirk (32),

al usar la asparagina por via oral en el tratamiento de la epilepsia, -
vió que en varios pacientes era causa de nauseas, vómitos y síntomas -
mentales debido a un envenenamiento por el Amonio sanguíneo. En indi-
viduos normales se vió que no les producía ningún efecto, pero Baldwin
y Bessman encontraron, que había un ligero descenso del Amonio, fenó--
mono que no se ha explicado aún en nuestros días. El efecto de la as-
paragina al facilitar la utilización del Amonio, podía ser interpreta-
do basándose en dos hechos experimentales:

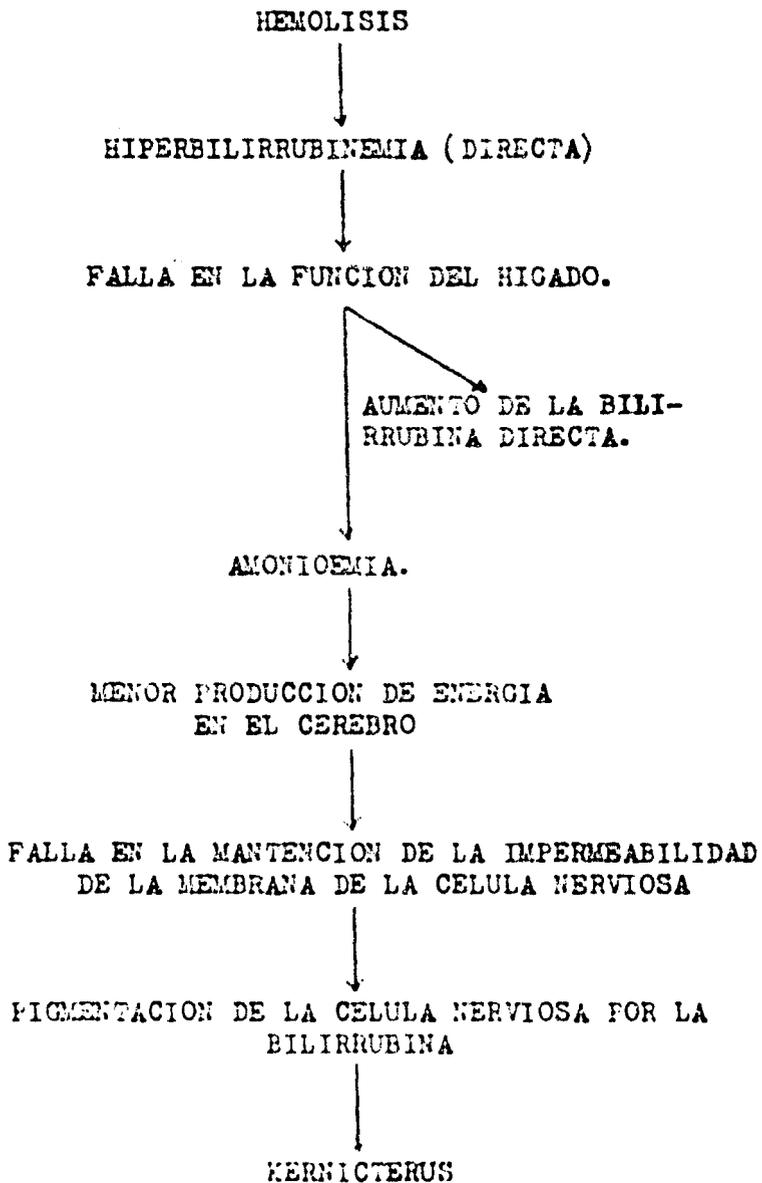
1o.- El ácido aspártico es el aminoácido resultante de la desaminación
de la asparagina y es esencial para la síntesis de urea.

2o.- La asparagina puede penetrar dentro de los tejidos más fácilmen-
te, que el ácido aspártico por si solo. La única dificultad para ex--
plicar esta teoría es que no sabemos que en los tejidos haya algún me-
canismo para la desaminación directa de estos.

5).- ANASTOMOSIS UTEROCOLICA.- En casos de una anastomosis-
uterocólica, el Amonio sanguíneo se encuentra aumentado, pues el flujo
urinario es desviado dentro del colon; consecuencia de esto es el regro
so al organismo de grandes cantidades de urea. Normalmente ésta es --
excretada en un sistema libre de bacterias sin que se convierta en --
Amonio. Como consecuencia a esa desviación, el organismo se inunda --
de Amonio que ha sido sintetizado a urea en el hígado y excretado en -
la orina; al pasar ésta al intestino se vuelve a iniciar el ciclo de -
la síntesis de urea. Esto fué estudiado por Bessman y MacDermott en -
1957, (33 y 34).

" PATOGENESIS DEL KERNICTERUS "

MECANISMO DEL AMONIO EN EL KERNICTERUS



ERITROBLASTOSIS FETAL.- Se sabe que el Amonio juega un papel importante en el padecimiento hemolítico del recién nacido. Este es el resultado de una autoinmunización de la madre, por existir una incompatibilidad entre su sangre y la del recién nacido; también puede resultar de una putrefacción infecciosa en los primeros días de vida. La ictericia que acompaña a la hemólisis de sangre es la que causa la coloración de la bilirrubina del cerebro, principalmente en el núcleo del ganglio basal y del asta de Amon, produciendo el estado patológico conocido como Kernicterus. Esta coloración está asociada con los síntomas nerviosos y la deficiencia mental. Al estudiar los niveles de bilirrubina en sangre y el desenvolvimiento del kernicterus, se vió que sólo existía entre estos una relación aproximada, pues pacientes con altos niveles de bilirrubina no tenían kernicterus, en cambio, pacientes con niveles relativamente bajos si lo tenían. Corton, en 1958, hizo una investigación en el metabolismo del Amonio de los recién nacidos con eritroblastosis fetal: a los niños que presentaban una eritroblastosis leve o severa, los sujetaron a un cambio de sangre, se les extraían 500 ml. y a continuación se les administraba 500 ml. Antes y durante el curso de la transfusión se les hizo determinaciones de Amonio en sangre venosa umbilical. En los niños que tenían kernicterus o que murieron con complicaciones cerebrales, el Amonio sanguíneo de la vena umbilical excedía de 2 γ /ml. Un paciente que presentó un nivel de Amonio de 2 gammas por ml. sobrevivió; tuvo gemelos, quienes murieron con kernicterus. Los demás pacientes que tenían normal o ligeramente aumentado el Amonio sanguíneo no tuvieron complicaciones. Un posible desenvolvimiento del kernicterus es el presentado en el cuadro relativo a este. (35).

TEORIA SOBRE EL MECANISMO DEL COMA HEPATICO.

1o.- INTOXICACION POR TIOL.- En 1949 Watson, en 1954 Sherlock y en 1957 Challenger (36), estudiaron el efecto tóxico de la metionina en los padecimientos hepáticos, viendo que podía ser la causa de un coma y demostraron que en el aliento de los pacientes con hedor hepático, existía metil-mercaptano. Se cree que la toxicidad de los mercaptanos deriva de la metionina y cistina, proponiéndolas como la causa del coma. En 1955, Walshe (37) encontró un nivel elevado de tiol en la sangre de estos mismos y vió que casi no utilizaban la cisteína. En 1954 Sherlock encontró, que el efecto tóxico que ejercía la metionina sobre pacientes con padecimiento hepático era muy grande y no provenía de una intoxicación por Amonio, el cual podía derivar de los grupos amino. Hay algunos inconvenientes en esta teoría de intoxicación: 1o.- Los tioles no son tóxicos por si mismos. 2o.- El hedor hepático se considera como el signo principal de la intoxicación por tiol y no es un signo constante de la insuficiencia hepática.

En 1955, Walshe (38) encontró que los pacientes con coma hepático no tenían un aumento importante de tiol en la sangre. En 1958, Webster (39) al hacer investigaciones sobre el Amonio, en el sistema porta de pacientes con cirrosis a los que se les había administrado dosis orales de metionina, vió que se encontraba bastante elevado, también estudió el efecto de la neomicina encontrando que destruía los organismos formadores de Amonio en el intestino.

2o. TEORIA DEL CONSUMO DEL ATP.- Esta hipótesis es una de las más específicas respecto al mecanismo del sitio de acción del coma hepático. En 1947, Speck y en 1957, Woll-Mallherbe (40), propusieron la utilización del ATP en la detoxicación del Amonio por el cerebro, en la síntesis de la glutamina. Este agotamiento de ATP dá-

como resultado una falta de uniones de fosfato de alta energía, que son necesarias para la síntesis de otros productos, como la acetilcolina. Ya desde 1939, Mann y Quastel (41) observaron que el glutamato más el Amonio, causaba una baja en la síntesis de acetilcolina -- en el tejido del cerebro, siendo reversible al adicionarle ATP. En 1953, Braganca, Faulkner y Quastel investigaron en cortes de cerebro, que no había una inhibición de la síntesis de acetilcolina por el Amonio, sino solamente una disminución en el nivel de esta. Encontraron que la adición de inhibidores a la síntesis de Glutamina, como el sulfóxido de metionina, de etionina y de sulfoximina de metionina podían invertir la inhibición del Amonio. Estas observaciones fueron confirmadas por Weil-Malherbe y Bearn en 1954, pero su interpretación ha quedado en duda.

COMA EXÓGENO Y ENDÓGENO

En 1954, McDermott y Adams (42) sugirieron como interpretación para la depresión mental en la insuficiencia hepática, que el coma exógeno, ó sea el causado por la administración de proteínas ó por una hemorragia dentro del tracto intestinal, responde más a la terapia, que el coma que termina la mayoría de las veces, con un serio padecimiento hepático, llamado coma endógeno. El agente terapéutico que era efectivo en casos de coma endógeno (ó espontáneo), fué el L(+) glutamato. Esta separación de los dos tipos de coma, basándose en la prueba terapéutica, hubiera sido válida, si el agente fuera realmente inefectivo, pero se encontró que en casos de coma exógeno, había un ligero descenso en el Amonio sanguíneo y un mejoramiento general. La diferencia entre las dos clases de coma no es cualitativa, pero sí cuantitativa ya que el coma exógeno es más sensible a la acción del glutamato que el coma endógeno.

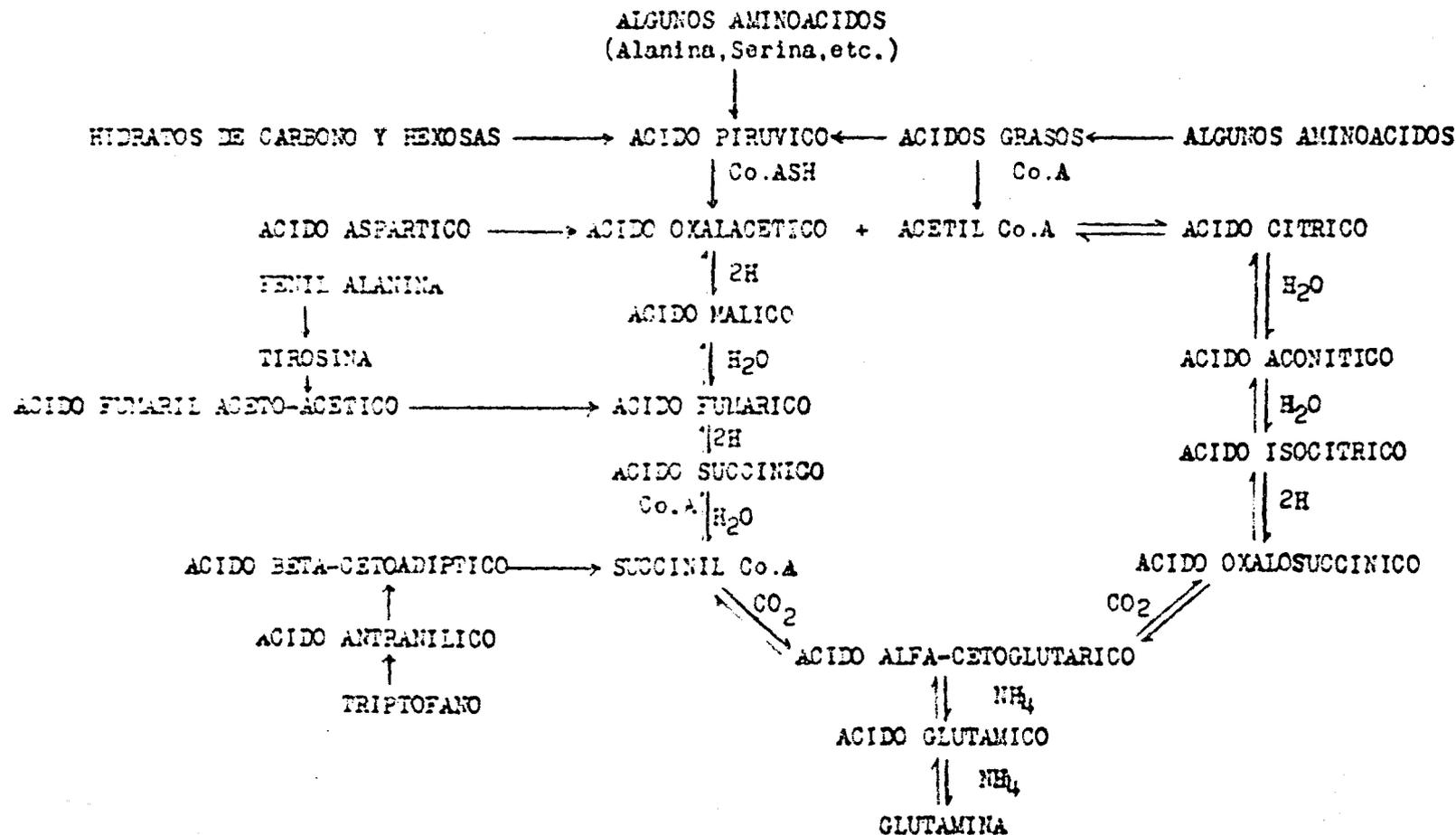
En 1957, Alice Bessman y Mirick (43) en su trabajo referente a la hemorragia dentro del tracto intestinal, vieron que al dar -- idénticos aumentos de nitrógeno, en forma de proteínas hidrolizadas -- ó de sangre completa, a los mismos pacientes, producían diferentes -- aumentos de Amonio en la sangre. En todos los casos el aumento fué -- mayor cuando se dió sangre completa, que cuando se administraron proteínas hidrolizadas. Esto puede explicar la diferencia en el coma -- producido por una hemorragia gastrointestinal, sin recurrir a un proceso diferente al del envenenamiento por Amonio. La causa de la diferencia en la formación de Amonio en una mezcla de proteínas como -- es la sangre y la mezcla de proteínas hidrolizadas, no es clara, pero se cree, que se debe al glutamato presente en estos casos.

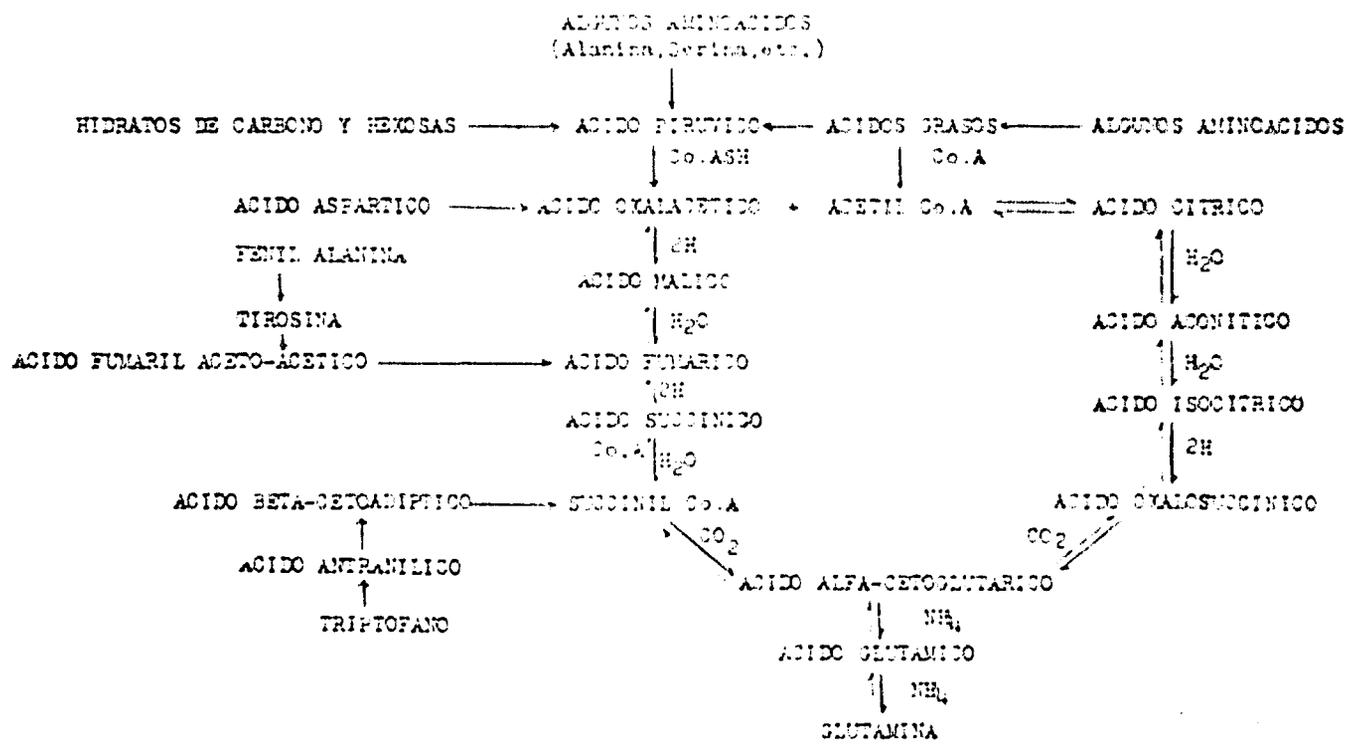
CICLO DE KREBS

El organismo forma un conjunto metabólico en el cual, todos los procesos están íntimamente relacionados entre sí. La transformación química que sufren las sustancias dentro del organismo, -- desde que entran a ésta hasta que son eliminadas, se denomina metabolismo; siendo los procesos de síntesis, los de carácter anabólico y -- los procesos de degradación, de carácter catabólico.

El estudio en particular de las reacciones químicas de las sustancias que son metabolizadas y forman estos dos procesos, se llama metabolismo intermedio; así los hidratos de carbono al seguir su -- metabolismo intermedio, llegan siempre a la producción de ácido pirúvico; en el metabolismo de los ácidos grasos, en sus etapas finales, -- se llega a la formación de ácido acético y ácido acetil-acético. Finalmente en el de las proteínas, de acuerdo con la naturaleza de cada uno de los aminoácidos, se producen diferentes ácidos alfa o beta cetónicos, como ácido pirúvico, oxalacético, ceto-glutarico, etc. Estos

"CICLO METABOLICO COMUN O CICLO DE KREBS"





ácidos se oxidan finalmente dando anhídrido carbónico y agua, por medio de una serie de reacciones comunes, en las cuales, no se distingue el origen del producto que se metaboliza. En esta serie de reacciones las sustancias lo hacen de tal manera, que después de pasar por todas las etapas, vuelven a la etapa inicial del ciclo.

Debido a la naturaleza de dichas sustancias, a este ciclo en el cual entran a formar parte, todos los productos de las diferentes sustancias metabolizadas en el organismo, se lo conoce con los nombres de: Ciclo de los Ácidos Tricarboxílicos, Ciclo del Ácido Cítrico y Ciclo de Krebs.

El Amonio tiene particular interés en el desarrollo del ciclo de Krebs, pues gracias a su presencia, el ácido alfa-cetoglutarico, se convierte en ácido glutámico y éste a su vez, también en presencia de Amonio, forma la glutamina.

El ácido glutámico es un aminoácido muy importante en el metabolismo de las proteínas, desempeñando diversos papeles: es indispensable en la transaminación, pues al reaccionar con diversos alfa-cetoácidos, pasa su grupo amínico al cetoácido, formando otros productos. También tiene un papel muy importante en la reserva del glucógeno en el hígado, pues el ácido glutámico junto con el aspártico, son los que hacen que se deposite este glucógeno en dicho órgano. También tiene una acción importante en el metabolismo del sistema nervioso, pues la corteza gris y la retina absorben Amonio, siempre que se encuentre presente este aminoácido, dando lugar a la formación de glutamina.

El Amonio se excreta en forma de sales amónicas, en cantidad adecuada para sostener el equilibrio ácido-básico del organismo. Si no hay Amonio disponible, los ácidos se fijan en las bases fuertes

(coma las de sodio y potasio), dañando la neutralidad de la sangre. Es
tu ajuste tiene lugar de un modo admirable, cuando penetran en nuestro
cuerpo ácidos o alimentos que los contengan. Por otra parte si se --
ingieren bases ó alimentos que las contengan, disminuye la excreción -
de Amonio. El peligro de acidosis hace que el organismo actúe, de ma-
nera que se combinen los radicales ácidos, con parte del Amonio presen-
te en el riñón, que había de originar la urea.

Como se sabe, tanto los riñones como el hígado, pueden de--
saminar los aminoácidos; de donde el Amonio urinario proviene de estos
cuerpos. Se cree hoy en día que la glutamina es la fuente principal -
del Amonio urinario, pues la proporción de esta en la sangre es sufi--
ciente para admitir esta suposición, ya que se transforma en ácido - -
glutámico y en Amonio.

TEORIA SOBRE EL MECANISMO DEL CICLO DE KREBS
EN UNA INTOXICACION POR AMONIO".

En 1955, Bossman y Bossman (44) propusieron una ruptura en
el ciclo de Krebs, causada por el Amonio, siendo este el mecanismo del
coma Amoniogénico. El sitio de ataque del Amonio, se cree que es la -
reacción de la dehidrogenasa glutámica, ya que por esta reacción el --
Amonio con el ácido alfa-cetoglutámico forma ácido glutámico del cual
es el cerebro, el órgano que lo contiene en mayor cantidad (100 Micro-
moles de este, por 100 gramos de cerebro).

El cuadro de la síntesis de ácido glutámico y de la gluta--
mina nos muestra que el ácido glutámico es constantemente regenerado -
en el ciclo de Krebs. Al estudiar varias teorías para la formación del
ácido glutámico en este ciclo se encontró que el único camino para su -
formación en el cerebro, es la reacción de la dehidrogenasa glutámica,
la cual es reversible por el Amonio y en un envenenamiento causado por
este, es la manera como se explica el exceso de ácido glutámico y gluta

mina. Esto se puede comprender al ver la alteración encontrada en los niveles de ácido alfa-cetoglutarico, como consecuencia de la formación de este exceso de ácido glutámico y glutamina en una intoxicación por Amonio.

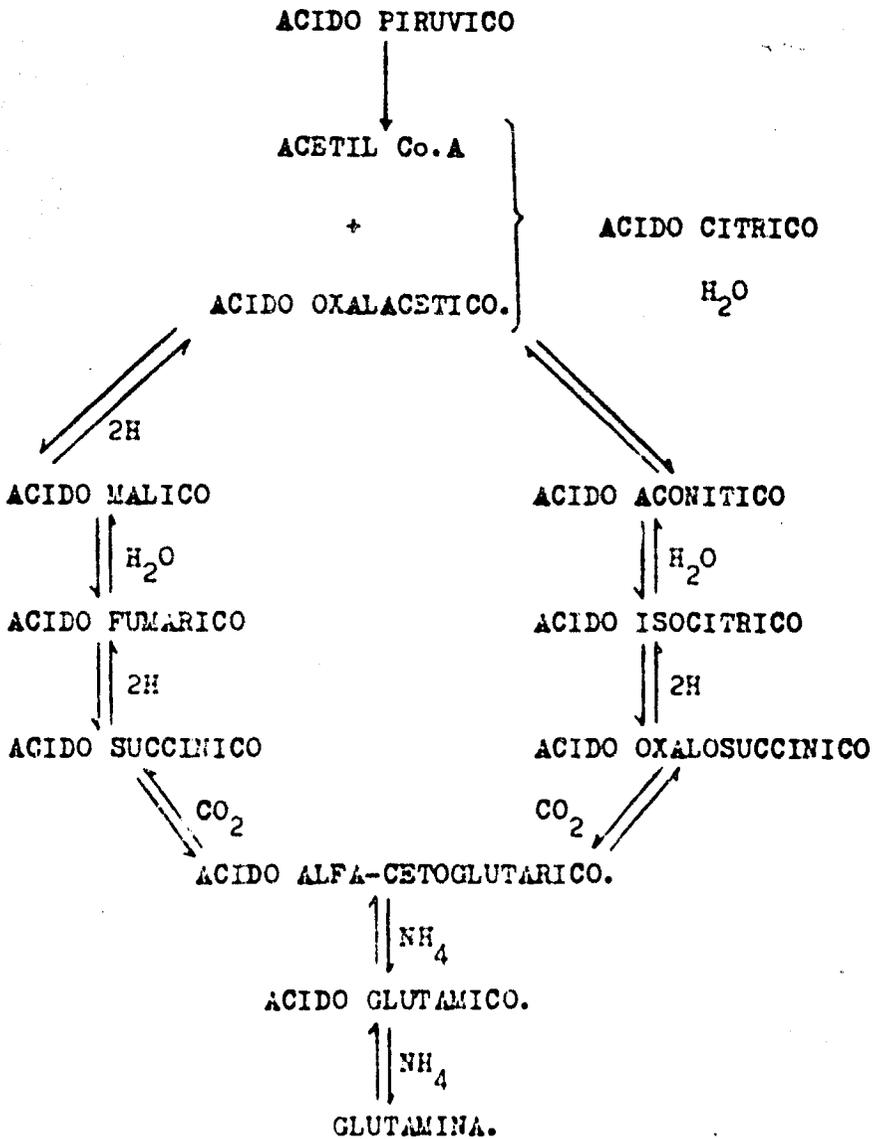
Eiseman confirmó esta teoría (45) pues demostró, que se -- producía una baja del 50% de ácido alfa-cetoglutarico contenido en el cerebro de animales a los que se les había administrado inyecciones -- intracarótideas de las sales de Amonio. Lo mismo se vió en experimentos hechos en ratones, después de inyecciones intraperitoneales de las sales de Amonio.

Una objeción a la teoría del desdoblamiento del ciclo de Krebs en un envenenamiento por Amonio se ha evidenciado en las bases de la observación clínica: que el nivel del Amonio sanguíneo no es directamente paralelo a la intensidad de insidencia del coma. A pesar de algunas discrepancias por el factor previamente reportado, que los niveles arteriales -- son los indicadores de más valor en las causas que afectan al cerebro, las objeciones propuestas para la teoría del desdoblamiento del ciclo -- de Krebs deben ser mejor examinadas; ya que al haber una ruptura como resultado al desdoblamiento de un sustrato, y solo remotamente en -- relación, con los factores causantes del desdoblamiento. Un pequeño -- aumento duradero del Amonio sanguíneo, puede ser más peligroso, que -- un aumento repentino y transitorio de este. El Amonio puede descender rápidamente a niveles normales, pero el proceso de reparación del ácido alfa-cetoglutarico en el cerebro, puede requerir varios días, lo -- mismo que el retorno a la normalidad de las funciones mentales.

MÉTODOS PARA DISMINUIR EL AMONIO SANGUINEO.

Hay dos clases de métodos para la disminución del Amonio -- sanguíneo: Los Métodos Directos y los Métodos Indirectos.

" SINTESIS DEL ACIDO GLUTAMICO Y DE LA GLUTAMINA
EN RELACION CON EL CICLO DE KREBS "



10.- MÉTODOS DIRECTOS.

Los métodos directos usados para la disminución de los niveles de Amonio sanguíneo, incluyen la Terapia Química y la Viviodiálisis.

La Terapia Química comprende:

a).- GLUTAMATO.- El primer tratamiento químico fué estudiado por Sapirstein en 1943 (46), pues al hacer experimentos en conejos demostró, que al administrarles glutamato de sodio, antes ó al momento de ponerles una inyección de cloruro de Amonio, les prevenía o les disminuía las convulsiones vistas generalmente en casos de conejos no tratados, ó sea a los que no se les administró glutamato de sodio. -- Walshe, en 1953 (47) sugirió el uso del glutamato de sodio para remover el Amonio durante el coma amoniogénico del padecimiento del hígado, porque, como ya se dijo antes, el Amonio se combina normalmente con el glutamato para formar glutamina. Los primeros reportes de esta terapia eran prometedores, pero la experiencia demostró que tenían un valor limitado. Bessman, en 1957, hizo un estudio controlado de el efecto del glutamato sobre el descenso de Amonio en la sangre de pacientes cirróticos, encontrando que había una mayor toma de Amonio por el músculo y esta era debida al Glutamato. Esto se interpretó -- como un mecanismo de adaptación en los cirróticos debido al padecimiento del hígado y a una moderada elevación del Amonio sanguíneo. -- El músculo se adapta a un aumento total de la síntesis de glutamina y sustituyendo con esto en pequeña parte, el descenso de la síntesis de urea por el hígado. De esto se deduce que la terapia del glutamato podría ser más efectiva en cirrosis con una moderada deficiencia hepática y menos efectiva en un desenvolvimiento agudo de la Amonioemia en individuos normales que presentaron un padecimiento del hígado.

b).- ARGININA.- Un segundo tipo de terapia fué sugerido -- por Greenstein y su grupo en 1955 (48), los cuales encontraron en sus experimentos, que la dosis altamente tóxica de aminoácidos y de Amonio podía volverse inocua, por estimulación del ciclo de la síntesis de urea en el hígado, por medio de la administración oral ó parenteral de arginina. Comparando el glutamato con la arginina, esta es mucho -- menos efectiva con los cirróticos y no tiene efecto sobre la utilización periférica del Amonio, pues los cirróticos que han tenido un largo período de elevación en el Amonio sanguíneo han adaptado sus músculos a la síntesis de glutamina.

Desde otro punto de vista, el uso de la arginina en una -- hepatitis aguda podría ser indicado, pues este tipo de pacientes ha -- adaptado su mecanismo periférico a utilizar el glutamato. Puede ser posible estimular el desdoblamiento de enzimas en el hígado con arginina, y al estudiar el efecto de esta en diversos pacientes, se encontró que era más efectiva en un padecimiento hepático agudo.

c).- GLUTAMATO DE ARGININA.- La arginina es un aminoácido -- básico fuerte y se puede administrar como una sal de ácido clorhídrico. El ácido glutámico es un aminoácido ácido fuerte y puede darse como -- una sal de sodio ó de potasio. Recientemente se ha hecho una combinación de estos dos aminoácidos, y al prepararse se utilizó la propiedad que tienen de neutralizarse el uno al otro. Estos aminoácidos se pueden administrar, siempre que no produzcan al paciente un desequilibrio electrolítico.

VIVIODIALISIS.

La viviodiálisis de pacientes con coma hepático y Amonioo-
mia, puede producir un descenso en el aumento del Amonio sanguíneo, -- pero esto es tan pequeño en proporción a la producción de Amonio, que

on la actualidad la viviodiálisis no tiene valor en el tratamiento del coma hepático (49).

20.- Métodos Directos.

Los métodos directos para la disminución del Amonio sanguíneo, son en su mayor parte más efectivos que las técnicas químicas. -- Estos incluyen la eliminación de las proteínas de la dieta (50) y la - terapia de los antibióticos (51); pues una dieta libre de proteínas, - únicamente suministra una pequeña cantidad de nitrógeno al intestino - para la acción bacteriana, y la terapia de los antibióticos principal- mente por vía oral, altera la flora intestinal disminuyendo el número- de los organismos formadores de Amonio. De donde debe tenerse en - -- cuenta que la urea siempre se encuentra presente en el intestino, como un sustrato para la formación de Amonio, aún sobre una dieta libre de proteínas.

II.-

"METODO DE DAVID G. NATHAN, M. D. Y F. LEE RODKEY, P.D.

PARA LA INVESTIGACION DEL AMONIO SANGUINEO".

PRINCIPIO.-

Conway y Seligson estudiaron las técnicas de microdifusión para el Amonio sanguíneo. Entre los métodos para la estimación del Amonio desprendido, se encuentra el método fotométrico de la Ninhidrina, estudiado por Moore y Stein.

El método de David G. Nathan y F. Lee Rodlkey, se basa en la medida del Amonio sanguíneo por medio de la microdifusión, a partir de una preparación de sangre total libre de proteínas.

El Amonio no libre de la sangre es volatilizado, por medio de una hidrólisis alcalina y fijado en una varilla de vidrio acidificada. Después se determina colorimétricamente este Amonio, por medio de la ninhidrina. Se hace notar que la determinación se efectúa en una preparación desproteinizada, porque al efectuarse la hidrólisis alcalina, las proteínas aumentan la cantidad del Amonio, debido a una hidrólisis enzimática de los alfa-aminoácidos.

REACTIVOS.-

1o.- Agua especial libre de Amonio. Esta se prepara: - -
a).- Tratando agua destilada con permutita. b).- Pasando agua destilada a través de una resina de cambio iónico c).- Destilando agua acidificada con ácido sulfúrico. El agua libre de Amonio se debe usar en la preparación de todos los reactivos y en el lavado del material. No nosotros obtuvimos el agua libre de Amonio, pasando agua destilada a través de una resina de cambio iónico.

2o.- Una solución tipo de Amonio, que contiene 0.472 g. de sulfato de Amonio anhidro por litro. (100 gammas de Amonio por ml.) --

30.- Solución molar de ácido cítrico.

40.- Solución saturada de carbonato de potasio; debe aerarse y agiarse para volatilizar el Amonio.

50.- Solución de ninhidrina, la que se prepara: 0.2 g. de ninhidrina se disuelven en 7.5 ml. de metil celusolve; una vez disuelta se agregan 0.03 g. de hidridantina, disolviéndose también, y por último se añaden 2.5 ml. de una solución amortiguadora de citrato. La ninhidrina debe prepararse al momento de usarse. Si se conserva debe guardarse en una atmósfera de nitrógeno.

60.- Solución amortiguadora de citrato 0.2 M (pH5). Se prepara con 21.008 g. de ácido cítrico y 200 ml. de hidróxido de sodio N. diluyendo con agua libre de Amonio a 500 ml. Esta cantidad después de añadir unos cristales de timol, puede conservarse en frío por tiempo indefinido.

70.- Acido tricloroacético al 20%, que se prepara diluyendo el reactivo en agua libre de Amonio.

80.- Etanol al 50%.

MATERIAL.

10.- La difusión se efectua en frascos de vidrio de 25 ml; de diámetro aproximado de 3 cm. y 6 cm. de altura, y una abertura con diámetro de 12 mm. Cada frasco es tapado con un tapón de hule #00, - llevando en el centro una varilla de vidrio con el borde final redondeado. La varilla debe extenderse hasta 15 mm. antes del fondo del frasco se deben cortar 10 mm. del tapón para simplificar las manipulaciones.

20.- Un agitador eléctrico que consta de un disco metálico - de 32 cm. de diámetro, con perforaciones situadas a una distancia de 9 cm. del centro, siendo todas equidistantes a este; las perforaciones sirven para recibir los frascos. El disco está inclinado sobre un - -

soporte que forma con la horizontal un ángulo de 87°. La velocidad de rotación de este disco debe ser de 10 a 12 r.p.m.

3o.- Celdillas de Coleman graduadas a 10 ml.

4o.- Tubos de centrifuga graduados a 12 ml.

5o.- Un baño de agua hirviente.

6o.- Papel de aluminio y papel parafilm.

PROTOCOLO DE LA TOMA DE SANGRE.

Para proceder a la toma de sangre al hacer la dosificación de Amonio, es indispensable lavar las jeringas y las agujas con agua libre de Amonio. Al tomar la sangre no se debe ligar la vena, y a su vez la sangre debe penetrar lentamente en la jeringa, evitando que - - haya éstasis.

Deben tomarse 3.5 ml. de sangre, pues gran cantidad produce una precipitación incompleta de las proteínas, y pequeña cantidad puede causar el desdoblamiento de un exceso de presión de bióxido de carbono, cuando el filtrado es tratado con carbonato de potasio.

TECNICA.

Se pipetea 3 ml. de ácido tricloroacético al 20%, en un tubo de centrifuga de 12 ml. Se tapa con un tapón limpio y se sumerge en un baño de hielo hasta el momento de la toma de sangre. Se pone inmediatamente después de la toma, 3 ml. de sangre en el tubo de centrifuga que contiene el ácido tricloroacético frío y se agita la mezcla vigorosamente cerca de 30 segundos; al cabo de este tiempo se sumerge la mezcla en el baño de hielo hasta el momento de hacer la determinación.

Una vez que se va a efectuar la técnica, se agitan de nuevo los tubos y se centrifugan 10 minutos a 2500 r.p.m. Inmediatamente después de centrifugarse, se anota el volumen total del tubo y el - -

volúmen del precipitado. Se decanta el sobrenadante líquido que se formó y se transfieren partes alícuotas de 1 ml. de filtrado en los frascos de vidrio.

La varilla de vidrio adaptada al tapón de hule se humedece previamente con una gota de ácido cítrico, distribuyendolo en una pequeña capa que cubra la superficie de la varilla, y sacudiendola cuidadosamente para quitar el exceso de ácido. A esta le llamaremos varilla acidificada.

Añadir al frasco de vidrio que contiene un ml. del problema, 1 ml. de solución saturada de carbonato de potasio, evitando que se mezclen las dos soluciones, inmediatamente poner el tapón con la varilla acidificada y cerrar el frasco herméticamente. Hay que tener mucho cuidado para evitar el contacto entre el contenido del frasco y la varilla acidificada.

La preparación de la varilla acidificada y la adición de la solución saturada de carbonato de potasio deben hacerse en unos cuantos segundos para cada frasco, evitando que haya escape de Amonio o una contaminación. Al hacer la determinación hay que preparar un blanco y un testigo, con un ml. de agua libre de Amonio y un ml. de solución de sulfato de Amonio, conteniendo una gamma de Amonio por ml, respectivamente, en lugar del filtrado.

Una vez hecho el blanco y el testigo, adicionados de carbonato de potasio y tapados con la varilla de vidrio, se ponen en el agitador por 30 minutos. Una vez pasados los 30 minutos de agitación, se quitan los tapones y la varilla acidificada del frasco y se pone dentro de los tubos de 10 ml. Cada varilla es lavada con 2 ml. de la solución de ninhidrina, preparada como antes se indicó. La varilla se puede lavar mejor, poniéndola sobre la boca del tubo, deteniéndola

con una mano y con una pipeta pasar la solución de nicotina a la varilla y de esta pasará al tubo.

Inmediatamente se tapan los tubos con papel de aluminio para evitar contaminaciones, y se ponen durante 10 minutos en un baño de agua hirviendo, que cubra las dos terceras partes de los tubos. Una vez pasado este tiempo, se sacan los tubos del baño y se enfrían a la temperatura ambiente. Ya fríos se les adiciona etanol al 50% hasta completar un volumen de 10 ml, se tapan con papel parafina y se agitan por inversión, leyéndose a continuación en un espectrocolorímetro, determinando la absorción a 550 m μ . Nosotros utilizamos el espectrocolorímetro de Coleman pero la lectura se puede hacer también en fotocolorímetro.

Al efectuar la lectura se establece el 100% de transmitancia con el blanco y basándose en este, se lee el problema y el testigo. Debido al uso de espectrocolorímetro, al calcular el Δ monio contenido en el problema, es necesario trazar una curva en papel semilogarítmico, valiéndose de la lectura obtenida con el testigo que contiene una gamma de Δ monio por ml.

La concentración del Δ monio sanguíneo es obtenida, del Δ monio existente en un ml. del filtrado, aplicando la siguiente fórmula:

$$(X)_s = \frac{(X)_f (V_t - 0.10 V_p)}{(V_t - V_{tca})}$$

V_t = Volumen total del líquido contenido en el tubo de centrifuga. (so-
brenadante más precipitado).

V_p = Volumen del precipitado.

V_{tca} = Volumen del ácido tricloroacético puesto en el tubo de centrifuga.

ca.

$(X)_f$ = Concentración de Δ monio en el líquido sobrenadante, expresado en gamma de Δ monio por ml. de líquido.

$(X)_s$ = Concentración de Amonio en sangre expresado, como gammas de Amonio por ml. de sangre.

$(V_t - V_{ca})$ = Volúmen de sangre usado para preparar el filtrado.

$(V_t - 0.10 V_p)$ = Volúmen total del líquido filtrado (suma del líquido sobrenadante más líquido retenido en el precipitado). - Se ha determinado que el filtrado de ác. tricloroacético retiene el $(99^+ - 1) \%$ de su volúmen de líquido; ó -- en otras palabras, el volúmen real del precipitado de -- ác. tricloroacético, es el 10% del volúmen aparente de este precipitado en el tubo. Este 10% se debe restar -- del volúmen total inicial (sangre más ác. tricloroacético) para obtener el volumen real del líquido filtrado que contiene Amonio.

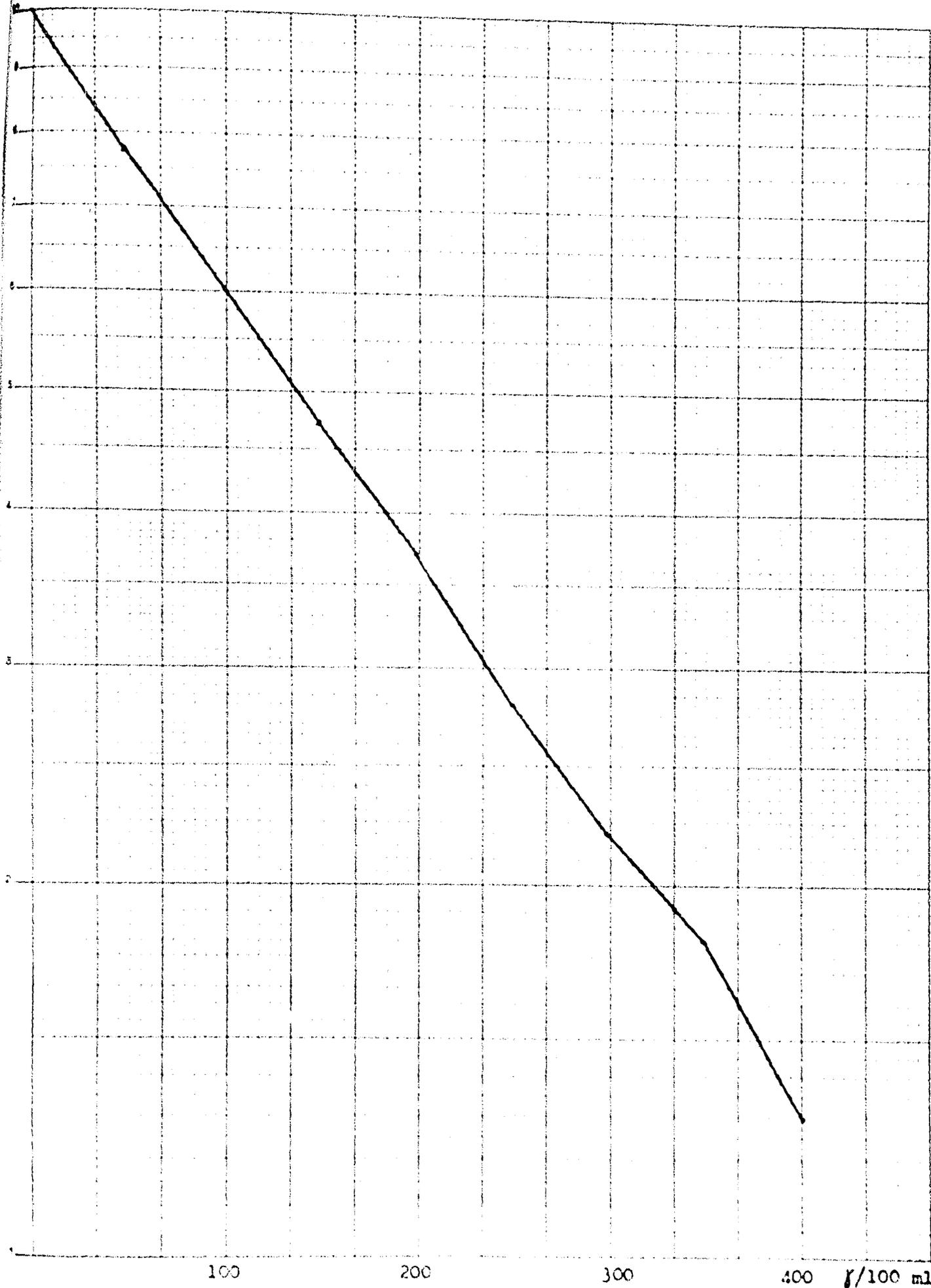
Al hacer la determinación del Amonio, es necesario hacer -- como en todas las reacciones de investigación, 3 ó 4 determinaciones -- simultáneas del mismo problema, para ver si los resultados encontrados son constantes.

CURVA TIPO DE AMONIO.

Se hicieron varias curvas tipo de Amonio para observar la -- sensibilidad del desprendimiento de este de una solución que lo contenía en cantidades conocidas, y la reproducibilidad del desdoblamiento de color en presencia de ninhidrina.

Las determinaciones de Amonio para hacer estas curvas fueron hechas tomando como base diferentes soluciones de Amonio que contenían estas cantidades:

- 10.- Solución de 50 gammas de Amonio por 100 ml.
- 20.- Solución de 100 gammas de Amonio por 100 ml.
- 30.- Solución de 150 gammas de Amonio por 100 ml.



40.- Solución de 200 gammas de Amonio por 100 ml.

50.- Solución de 250 gammas de Amonio por 100 ml.

60.- Solución de 300 gammas de Amonio por 100 ml.

70.- Solución de 350 gammas de Amonio por 100 ml.

80.- Solución de 400 gammas de Amonio por 100 ml.

Las lecturas obtenidas con cada cantidad de Amonio se llevan a una tabla de papel semilogarítmico, poniéndose la concentración de Amonio en el eje horizontal y la lectura obtenida en el espectro -- colorímetro en el eje vertical. Se obtuvo la siguiente gráfica. (ver -- la gráfica).

RECUPERACION DEL AMONIO

No es posible añadir sulfato de Amonio a una muestra de -- sangre y recuperar el Amonio añadido por el aumento de nitrógeno en -- contrato en la muestra, ya que hay una continua formación de Amonio -- sanguíneo después de haber hecho la adición del sulfato de Amonio.

Al hacer el análisis de una muestra a la que se le adicionó una cantidad conocida de Amonio, se vió que en el período de tiempo -- transcurrido desde que se le hizo la adición de Amonio a la muestra -- hasta que se hizo su análisis había un aumento de Amonio el cual no -- se puede determinar con exactitud.

OBSERVACIONES.

DIFICULTADES ENCONTRADAS.

10.- Al tomar la sangre se vió, que si esta era tomada con heparina y mezclada con el ácido tricloroacético hasta el momento de -- hacer la determinación, los resultados encontrados no eran los mismos, pues el Amonio se encontraba aumentado y se vió la necesidad de tomar la sangre sola y mezclarla con el ácido tricloroacético inmediatamente después de la toma.

20.- Se observó que para obtener resultados constantes en la dosificación del Amonio, la determinación debía ser hecha dentro de los 80 minutos después de la toma de sangre.

30.- Se ensayaron varios disolventes para aumentar la sensibilidad de la ninhidrina, viendo que al ser disuelta en metil celo-solve y al añadirsele hidridantina (ninhidrina reducida), aumentaba su sonssibilidad.

40.- Al usar diversos agitadores para agitar la solución alcalina se observó, que en aquellos en que los frascos se colocan en posición vertical y giran en posición horizontal, no son útiles y fué necesario construir el agitador mencionado en la técnica, en el cual, el frasco va colocado en posición horizontal y gira verticalmento.

CUADRO NO. 1

"DETERMINACIONES DE AMONIO A LOS 15, 60 Y 180
MINUTOS DESPUES DE LA TOMA DE SANGRE"

MUESTRA No.	CONCENTRACIONES DE AMONIO GAMMAS POR 100 ML. DE SANGRE TOTAL.		
	15 MIN.	60 MIN.	180 MIN.
1.-	50	52	84
2.-	50	53	75
3.-	52	55	77
4.-	78	78	93
5.-	82	85	102
6.-	97	97	123
7.-	75	77	92
8.-	75	75	95
9.-	77	80	92
10.-	79	81	98
11.-	73	73	90
12.-	68	69	88
13.-	70	71	91
14.-	70	70	93
15.-	79	80	95

CUADRO NO. 2.

"COMPARACION DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN SANGRE,
HEPARINIZADA Y NO HEPARINIZADA, CON ACIDO TRICLOROACETICO".

MUESTRA. No.	CONCENTRACION DE AMONIO GAMMAS POR 100 ML. DE SANGRE TOTAL.					
	SANGRE CON ACIDO TRICLOROACETICO			SANGRE HEPARINIZADA CON ACIDO TRICLOROACETICO		
	15 MIN.	60 MIN.	180 MIN.	15 MIN.	60 MIN.	180 MIN.
1.-	50	54	97	116	126	145
2.-	66	66	101	95	110	125
3.-	68	69	95	72	102	118
4.-	56	60	97	76	105	115
5.-	52	55	94	93	108	120
6.-	62	63	88	87	98	118
7.-	73	74	93	89	96	121
8.-	74	74	95	86	93	115
9.-	70	73	91	82	91	109
10.-	68	69	90	89	103	110
11.-	76	77	96	88	105	117
12.-	74	74	93	101	115	125
13.-	83	85	105	97	106	118
14.-	81	81	109	99	109	120
15.-	85	87	115	98	107	119

Aumenta mucho más en la primera que en la segunda por las causas antes mencionadas.

VALORES DEL AMONIO SANGUINEO ENCONTRADOS EN ADULTOS NORMALES.

Cifras estadísticas de comparación donde se muestran los resultados de: Promedio Aritmético, Desviación tipo, Error Tipo y Coeficiente de Variación.

1.- PROMEDIO ARITMETICO. (Z)

$$Z = \frac{\text{Sigma X}}{N} = \frac{2340}{30}$$

Sigma X = Suma de los valores encontrados.

N = Número de casos.

$$Z = \underline{78}$$

2.- DESVIACION TIPO. (Delta P)

$$\text{Delta P} = \frac{\text{Sigma (Z - X)}}{N - 1} = \frac{609}{29}$$

$$\text{Delta P} = \underline{21}$$

3.- ERROR TIPO. (E).

$$E = \frac{\text{Delta P}}{Z} = \frac{21}{30}$$

$$E = \underline{0.7}$$

4.- COEFICIENTE DE VARIACION. (V).

$$V = \frac{\text{Delta P}}{Z} = \frac{21}{78}$$

$$V = \underline{2.44\%}$$

Los valores del Amonio sanguíneo encontrados al hacer 50 determinaciones en adultos normales, oscilaron entre 49 y 105 gammas de Amonio por 100 ml. de sangre total; estas determinaciones se hicieron en personas que se encontraban en ayunas, y la centrifugación de la mezcla de sangre con el ácido tricloroacético se efectuó, hasta los 60

minutos después de haberse hecho la toma de sangre.

Al hacer los cálculos para obtener el valor normal con su -- desviación tipo, como se ve antes, este fué de 78 ± 28 gammas de -- Amonio por 100 ml. de sangre.

VALORES DEL AMONIO SANGUINEO ENCONTRADOS EN NIÑOS

RECIEN NACIDOS SIN PROBLEMA

Los valores del Amonio sanguíneo encontrados en niños recién nacidos sin problemas, fueron semejantes a los valores encontrados en adultos normales; siendo también iguales, los valores encontrados en -- sangre de cordón umbilical sin problema.

VALORES DEL AMONIO SANGUINEO ENCONTRADOS EN PERSONAS

CON PADECIMIENTO HEPATICO.

Se hicieron 40 determinaciones en personas que presentaban -- un padecimiento hepático, la mayoría de estas personas tenían hepa-- titis y el Amonio sanguíneo se encontró bastante elevado. En estas -- determinaciones se obtuvieron valores que oscilaron entre 180 a 360 -- gammas de Amonio por 100 ml. de sangre total. Entre estas 40 personas . 9 presentaron los niveles de Amonio sanguíneo superiores a 300 gammas por 100 ml. de sangre total.

III.-

"RELACION ENTRE LA AMONIOEMIA Y LA BILIRRUBINEMIA"

La bilirrubina encontrada en el organismo es el producto del desdoblamiento de la hemoglobina. Esta bilirrubina es llevada por la sangre al hígado, donde es excretada en la bilis. La cantidad de bilirrubina encontrada en la sangre no se debe únicamente al mayor desdoblamiento de la hemoglobina, sino también a la mayor o menor capacidad del hígado para excretar esta bilirrubina.

Como vimos anteriormente, las causas de Amonio en el organismo pueden ser: el intestino, el riñón, el músculo, etc. Los niveles de Amonio encontrados en la sangre dependen del estado del hígado para poder metabolizarlo. Si el hígado es incapaz de metabolizar este Amonio, este pasa a la sangre entrando en el ciclo de Krebs, donde va a aumentar la formación de ácido glutámico y posteriormente de la glutamina.

Como vemos, tanto una elevación en el nivel sanguíneo de la bilirrubina ó del Amonio, se deben a la capacidad del hígado para poder excretar a la primera y a la capacidad de este mismo para poder metabolizar al segundo.

LA AMONIOEMIA Y LA BILIRRUBINEMIA EN EL COMA HEPATICO.

En el coma hepático el hígado se encuentra imposibilitado para excretar la bilirrubina y para metabolizar al Amonio. Como consecuencia de esto, encontramos altos niveles de bilirrubina y de Amonio en la sangre. El Amonio interviene en el ciclo de Krebs en la formación de ácido glutámico y de glutamina. Al haber mayor cantidad de glutamina y de ácido glutámico en el cerebro, hay una mayor utilización del ácido alfa-cetoglutarico, disminuyendo la cantidad de este por hacerse irreversible la reacción por el aumento de Amonio. Este aumento

de Amonio en el cerebro influirá en la permeabilidad de las células nerviosas, las cuales fijarán a la bilirrubina produciendo un shock.

AMONIOEMIA Y BILIRRUBINEMIA EN EL KERNICTERUS Y ERITROBLASTOSIS.

En el kernicterus y en la eritroblastosis fetal, el Amonio y la bilirrubina también juegan un papel importante, ya que en los niños - principalmente, la bilirrubina, al estar bastante elevada, tiende a fijarse en las células nerviosas o neuronas, pudiéndolo hacer gracias -- al Amonio. Desde el comienzo de la hemólisis en los niños hasta la -- aparición del kernicterus, tanto el Amonio como la bilirrubina van a -- actuar, no de una manera similar, pero sí, ayudando la acción de uno -- al desarrollo del siguiente síntoma producido por el otro. Así vemos: la hemólisis se inicia al principio por un desdoblamiento de la hemo-- globina debido a los anticuerpos creados por la madre por incompatibili-- dad con la sangre del hijo. Este desdoblamiento es la causa de la -- formación de altos niveles de bilirrubina indirecta, los cuales no -- pueden ser excretados en su totalidad por el hígado, trayendo como -- consecuencia un aumento de la bilirrubina directa y una elevación del Amonio. El Amonio causa una desproporción en la producción de energía en el cerebro, seguida de una falla en la impermeabilidad de las células nerviosas. Al ser permeables las células nerviosas, la bilirrubina va a fijarse en estas, originándose en el organismo síntomas nervio-- sos y trastornos cerebrales, que son indicio del kernicterus.

IV.-

"VALORES DEL AMONIO Y DE LA BILIRRUBINA ENCONTRADOS
EN LOS NIÑOS ICTERICOS RECIEN NACIDOS".

TABLA NO. 1.

1.- VALORES DEL AMONIO CON BILIRRUBINA
DE 0 A 2 MG. POR 100 ML. DE SANGRE.

MUESTRA No.	BILIRRUBINA			AMONIO
	DIRECTA	INDIRECTA	TOTAL	GAMMAS FOR 100 ML.
1.-	Neg.	0.65	0.65	92
2.-	Neg.	0.65	0.65	82
3.-	Neg.	0.70	0.70	85
4.-	Neg.	0.90	0.90	87
5.-	Neg.	1.0	1.0	68
6.-	Neg.	1.4	1.4	75
7.-	Neg.	1.5	1.5	78
8.-	Neg.	1.9	1.9	102
9.-	Neg.	2.0	2.0	95
10.-	0.3	1.7	2.0	89

TABLA NO. 2.

2.- VALORES DEL AMONIO CON BILIRRUBINA

DE 2 A 5 MG. POR 100 ML. DE SANGRE.-

MUESTRA No.	BILIRRUBINA			AMONIO
	DIRECTA	INDIRECTA	TOTAL	GAMMAS POR 100 ML.
1.-	0.2	2.3	2.5	79
2.-	Neg.	3.0	3.0	102
3.-	0.7	2.3	3.0	75
4.-	0.3	2.7	3.0	83
5.-	0.5	2.7	3.2	77
6.-	0.7	2.7	3.4	80
7.-	0.5	3.0	3.5	79
8.-	0.5	3.0	3.5	64
9.-	0.8	2.7	3.5	100
10.-	0.2	3.5	3.7	86
11.-	0.7	3.0	3.7	96
12.-	0.7	3.0	3.7	58
13.-	0.8	3.0	3.8	63
14.-	0.5	3.5	4.0	100
15.-	0.5	3.5	4.0	60
16.-	0.3	3.7	4.0	83
17.-	0.7	3.5	4.2	105
18.-	0.3	4.0	4.3	101
19.-	2.0	2.3	4.3	96
20.-	1.5	2.5	4.3	62

TABLA NO. 2.

2.- VALORES DE AMONIO CON BILIRRUBINA
DE 2 A 5 MG. POR 100 ML. DE SANGRE.

MUESTRA No.	BILIRRUBINA			AMONIO
	DIRECTA.	INDIRECTA	TOTAL.	GAMMAS POR 100 ML.
21.-	0.2	4.3	4.5	53
22.-	0.2	4.3	4.5	81
23.-	0.5	4.0	4.5	63
24.-	0.7	4.0	4.7	75
25.-	0.5	4.3	4.8	96
26.-	0.5	4.3	4.8	80
27.-	0.7	4.3	5.0	81
28.-	0.7	4.3	5.0	84
29.-	0.7	4.3	5.0	97
30.-	0.7	4.3	5.0	88

TABLA NO. 3.

3.- VALORES DEL AMONIO CON BILIRRUBINA
DE 5 A 9 MG. POR 100 ML. DE SANGRE.

MUESTRA No.	BILIRRUBINA			AMONIO
	DIRECTA	INDIRECTA	TOTAL	GAMMAS POR 100 ML
1.-	0.3	4.8	5.1	92
2.-	0.5	4.6	5.1	108
3.-	0.5	4.6	5.1	59
4.-	0.5	4.6	5.1	92
5.-	0.5	4.6	5.1	80
6.-	0.4	4.7	5.1	90
7.-	0.5	4.7	5.2	91
8.-	0.7	4.6	5.3	53
9.-	0.3	5.0	5.3	60
10.-	0.3	5.0	5.3	65
11.-	0.7	4.6	5.3	86
12.-	0.5	5.0	5.5	76
13.-	0.7	4.9	5.6	79
14.-	0.7	5.0	5.7	54
15.-	0.8	5.0	5.8	104

TABLA NO. 3.

3.- VALORES DEL AMONIO CON BILIRRUBINA
DE 5 A 9 MG. POR 100 ML. DE SANGRE

MUESTRA No.	BILIRRUBINA			AMONIO
	DIRECTA	INDIRECTA	TOTAL	CAMMAS POR 100 ML.
16.-	0.2	6.0	6.2	86
17.-	0.2	6.0	6.2	75
18.-	0.2	6.0	6.2	79
19.-	0.2	6.0	6.2	56
20.-	0.2	6.0	6.2	96
21.-	0.5	6.0	6.5	64
22.-	0.5	6.0	6.5	91
23.-	0.2	6.5	6.7	103
24.-	1.0	6.0	7.0	97
25.-	0.3	6.8	7.1	106
26.-	1.5	5.7	7.2	85
27.-	0.7	6.5	7.2	99
28.-	0.5	6.7	7.2	81
29.-	0.7	6.7	7.4	90
30.-	0.5	7.3	7.8	58

TABLA NO. 3.

3.- VALORES DEL AMONIO CON BILIRRUBINA
DE 5 A 9 MG. POR 100 ML. DE SANGRE

MUESTRA No.	BILIRRUBINA			AMONIO
	DIRECTA	INDIRECTA	TOTAL	GAMMAS POR 100 ML.
31.-	0.5	7.3	7.8	65
32.-	0.5	7.7	8.2	70
33.-	1.0	7.3	8.3	65
34.-	1.5	6.8	8.3	102
35.-	4.56	3.84	8.4	120
36.-	0.5	8.2	8.7	67
37.-	0.5	8.2	8.7	89
38.-	0.2	8.6	8.8	67
39.-	0.2	8.6	8.8	111
40.-	0.3	8.7	9.0	99
41.-	0.5	8.5	9.0	103
42.-	0.7	8.3	9.0	95

TABLA NO. 4

4.- VALORES DEL AMONIO CON BILIRRUBINA

ARRIBA DE 9 MG. POR 100 ML. DE SANGRE

MUESTRA No.	BILIRRUBINA			AMONIO
	DIRECTA	INDIRECTA	TOTAL	GAMMAS POR 100 ML.
1.-	0.5	8.6	9.1	82
2.-	0.5	8.7	9.2	62
3.-	1.0	8.2	9.2	69
4.-	0.5	9.0	9.5	85
5.-	0.5	9.1	9.6	84
6.-	0.6	9.2	9.8	80
7.-	1.0	9.1	10.1	67
8.-	1.0	9.1	10.1	74
9.-	0.3	10.0	10.3	70
10.-	0.2	10.2	10.4	66
11.-	0.3	10.3	10.6	65
12.-	0.5	10.0	10.5	82
13.-	0.5	10.0	10.5	72
14.-	1.0	9.5	10.5	68
15.-	0.2	10.5	10.7	64

TABLA NO. 4.

4.- VALORES DEL AMONIO CON BILIRRUBINA
ARRIBA DE 9 MG. POR 100 ML. DE SANGRE

MUESTRA No.	BILIRRUBINA			AMONIO
	DIRECTA	INDIRECTA	TOTAL	GAMMAS POR 100 ML.
16.-	0.3	10.5	10.8	86
17.-	0.2	10.7	10.9	97
18.-	0.5	10.5	11.0	74
19.-	0.3	11.0	11.3	84
20.-	1.0	10.5	11.5	79
21.-	0.5	11.0	11.5	89
22.-	0.2	11.5	11.7	83
23.-	0.5	11.5	12.0	79
24.-	0.7	11.5	12.2	88
25.-	0.3	12.0	12.3	75
26.-	1.5	12.0	13.5	89
27.-	0.5	13.6	14.1	84
28.-	1.3	13.0	14.3	86
29.-	1.0	13.5	14.5	90
30.-	0.5	15.3	15.8	84

TABLA NO. 4.

4.- VALORES DE AMONIO CON BILIRRUBINA

ARRIBA DE 9 MG. POR 100 ML. DE SANGRE

MUESTRA No.	BILIRRUBINA			AMONIO
	DIRECTA	INDIRECTA	TOTAL	GAMMAS POR 100 ML
31.-	0.7	15.3	16.0	96
32.-	1.0	16.0	17.0	74
33.-	1.0	16.6	17.6	70
34.-	1.0	16.8	17.8	95
35.-	0.9	17.5	18.4	116
36.-	0.9	17.5	18.4	99
37.-	1.45	17.35	18.8	100
38.-	2.1	20.9	23.0	97
39.-	1.42	22.58	24.0	99
40.-	0.8	23.3	24.1	92
41.-	1.5	23.0	24.5	82
42.-	1.7	22.9	24.6	98
43.-	2.0	24.2	26.2	100
44.-	2.65	26.25	26.9	105

Se efectuaron 125 determinaciones de Amonio y de Bilirrubina en niños recién nacidos, cuya edad osciló entre 2 hr. y 5 días de nacidos. Estos niños en su mayoría estaban ictericos teniendo bastante elevada la bilirrubina indirecta y los valores de esta se encontraron entre 0.65 y 26.25 mg/100 ml., estando normal ó muy poco elevada la bilirrubina directa (los valores encontrados oscilaron entre 0 y 4.6 mg/100 ml.) y el nivel de Amonio sanguíneo permaneció dentro de los límites normales en casi todas las determinaciones.

" BIBLIOGRAFIA "

- 1.- Hahn, M., Masson, D., y Pawlow, I., Die Eck'sche Fistel zwischen -
der untersten Hohlvene und der Pfortader, und ihre Folgen für den-
organismus. Arch. Exptl. Pathol u. Pharmacol 32: 161 (1893).
- 2.- Balo, J., y Korpassy, B., The encophalitis of dogs with Eck Fistula
fed on meat. A.M.A. Arch. Pathol. 13: 80 (1932).
- 3.- Van Caulaert, C., y Deviller, C., Ammoniemie experimentale après -
in gestion de chlorure d'ammonium chez l'homme a l'etat normal et
pathologique. Compt. rend. soc. biol. 111: 50 (1932).
- 4.- Kirk, E., Amino acid and Ammonia metabolism in liver disease. Acta
Med. Scand. Suppl. 78: (1936).
- 5.- Bossman, S. P., The reduction of blood ammonia levels by certain
amino acids. J. Clin. Invest. 32: 622 (1955).
- 6.- Monguio, M., y Krause, F., Über die Bedeutung des Ammoniageshaltes
des blutes für Beurteilung der leberfunction. Klin Wochschr. 13: -
1142 (1934).
- 7.- Gabuzda, G. J., Jr., Phillips, G.E., y Davidson, C.S., Reversible
toxic manifestations in patients with cirrhosis of the liver gi-
ven cation exchange resins, New Engl. J. Med. 246: 124 (1952).
- 8.- Jacobs, H., y Farpart, A.K., Osmotic permeability of the erythro-
cyte. X. On the permeability of the erythrocyte to ammonia and --
the ammonium ion. J. Cellular Comp. Physiol. 11: 175 (1938).
- 9.- Vanamee, P., Poppell, J.W., Glicksman, A.F., Randall, H.T., y - -
Roberts K.E., Respiratory alkalosis in hepatic coma. A.M.A. Arch.
Internal. Med. 97: 742 (1956).
- 10.- Lawrence, W., Jr., Jaquez, J.A., Dienst, S.G., Poppell, J.W., Ran-
dall, H.T. y Roberts, K.E., The effect of changes in blood pH on -
the plasma total ammonia level. Surgery 42: 50 (1957).

- 11.- Warren, K.S., The differential toxicity of Ammonium salts. J. Clin. Invest. 37: 497 (1958).
- 12.- Parnass, I.K., y Holler, J., Über den Ammoniagehalt und über die - Ammoniakbildung im blute. Biochem. Z. 152: 1 (1924).
- 13.- Folin, O., The determination of Amonia in blood. J. Biol. Chem. 39: 259 (1924).
- 14.- Conway, E.J., y Byrne, R., Absorption apparatus for microdetermination of certain volatil substances; microdetermination of Ammonia. Bio chem. J. 27: 419 (1933).
- 15.- Seligson, D., y Seligson, H.A., A microdiffusion method for the - determination of nitrogen liberated as Ammonia. J. Lab. Clin. Med. 38: 324 (1951).
- 16.- Conway, E.J., Microdiffusion and volumetric error. C. Lockwood, - London 1947.
- 17.- Abelin, I., Über die Mikrobestimmung des Harnstoffes im blute ohne Destillation und ohne Nesslerisation. Biochem. Z. 297: 203 (1938).
- 18.- Bossman, S.P., y Bradley, J.E., The uptake of Ammonia by muscle, - its implications in ammoniagenic coma. New Engl. J. Med. 253: 1143 (1955).
- 19.- Van Slyke, D.D., Phillips, R.A., Hamilton, P.B., Archibald, R.M., Fatcher P.H., y Hiller, A., Determination of Ammonia in blood. J. Biol. Chem. 102: 499 (1933).
- 20.- Lubochinsky, B., y Zalta, J.P., Microdosage colorimetrique de l'azo te ammoniacal. Bull. Soc. chim. biol. 36: 1363 (1954).
- 21.- Nathan, D.G., y Dodkey, F.L., A colorimetric method for the determi nation of blood ammonia. J. Lab. Clin. Med. 1958: 5 (1957).
- 22.- Folin, C., y Denis, W., The origin and significance of Ammonia in the portal blood. J. Biol. Chem. 11: 161 (1912).

- 23.- White, H.L., Throup, O.A., y Rolf, D., Renal glutaminase in Ammonia excretion, *Am. J. Physiol.* 169: 174 (1952).
- 24.- Welt, L.G., Throup, O.A., Jr., y Burnett, C.H. A study of renal tubular phenomena under the influence of a carbonic anhydrase inhibitor. *Clin. Research. Proc.* 2: 63 (1954).
- 25.- Jones, M.E., Spector, L., y Lipman, F., Carbamyl phosphate, the carbamyl donor in citrulline synthesis. *J. Am. Chem. Soc.* 77: 821 (1955).
- 26.- Clarke, D.D., Neidle, A., Sarker, N.K., y Welsh, H., Metabolic activity of protein amide groups. *Arch. Biochem. Biophys.* 71: 277 (1957).
- 27.- Gustad, V., Transient hepatergy. *Acta Med. Scand.* 135: 354 (1949).
- 28.- Eiseman, B., Bakewell, J., Clarke, G., Studies in Ammonia metabolism. Ammonia metabolism and glutamate Therapy in hepatic coma. *Am. J. Med.* 20: 590 (1956).
- 29.- Bossman, A.M., y Evans, J.M., Blood Ammonia in congestive heart failure. *Ariz. Med.* 12: 470 (1956).
- 30.- Calkins, W.G., y Dolph, M., Blood Ammonia levels in congestive heart failure. *Ariz. Med.* 12: 470 (1956).
- 31.- Hankins, J., Bossman, D., Henki, M., y Pawlow, I., Die Eck'sche Fistel zwischen der untersten Hohlvene und der Pfortader, und ihre Folgen für den organismus. *Arch. Exptl. Pathol. u. Pharmacol.* 32: 161 (1893).
- 32.- Van Buskirk, C., Baldwin, R., y Bossman, S.P., Observations in the autor laboratory. Blood Ammonia, Samuel, P. Bossman., 1957.
- 33.- Bossman, S.P., Ammonia metabolism in animals. In nitrogen metabolism. (W. McElroy and G. Glass, eds). p. 433. Johns Hopkins, Baltimore, 1955.

- 34.- McDermott, W.V., Jr., Diversion of urine in the intestines as a factor in ammoniagenic coma. *New. Engl. J. Med.* 256: 460 (1957).
- 35.- Samuel, P. Bossman., Blood Ammonia. *Advances in Clinical Chemistry.* Vol. 2., p. 135-160. Sabotka y Stewart. Academic Press. Nueva York y Londres 1959.
- 36.- Watson, C.J., Prognosis and treatment of hepatic insufficiency. - *Ann. Internal Med.* 31: 405 (1949). Sherlock, S., Summerskill, W.H. Jr., White, L.P. y Phcar, E.A. Portal systemic encephalopathy; - - Neurological complications of liver disease. *Lancet*, ii. 453 (1954)
- 37.- Challenger, F., y Walsho, J.M., Footur hepaticus. *Lance* 91239 - - (1955).
- 38.- Walsho, J.M., y Senior, B., Disturbances of cystine metabolism in liver disease. *J. Clin. Invest.* 34: 302 (1955).
- 39.- Webster, L.T., Davidson, C.S., y Gabuzia, G.J., Jr., Effect on - - portal blood ammonium administered nitrogenous substances, etc. *J. Lab. Clin. Med.* 52: 501 (1959).
- 40.- Weil-Malherbe, H., In chemical environment of the brain. Ross -- Pediatric Conference, 24° symposium on physiological Implications. Baltimore Marzo de 1957.
- 41.- Mann, F.J.G., Tennebaum, M., y Quastel, J.H., Acetylcholine metabolism. in central nervous system; effects of potassium and other cations on liberations. *Biochem. J.* 33: 1363 (1939).
- 42.- McDermott, W.V., Jr. Wareham, J., Ridell, A.G., Ammonia metabolism in man. *Ann. Surg.* 140: 539 (1954).
- 43.- Bossman, A.N., Mirick, G.S., *J. Clin. Invest.* 37: 990 (1958).
- 44.- Bossman, S.P., y Bossman, A.N., The cerebral and peripheral uptake of ammonia in the liver disease with an hypothesis for the -- mechanism of hepatic coma. *J. Clin. Invest.* 32: 663 (1955).

- 45.- Eiseman, B., In the chemical environment of the brain. 24° Ross - symposium, Baltimore. Marzo de 1957.
- 46.- Sapirstein, M.R., The effect of glutamic acid on the cerebral action of ammonium ion. Proc. Soc. Explt. Biol. Med. 52: 334 (1943).
- 47.- Nathan, D.G., y Rodkey, F.L., A colorimetric procedure for the -- determination of blood Ammonia. J. Lab. Clin. Med. 49: 779 (1957).
- 48.- Gullino, P., Winitz, M., Birnbaum, S., Cornfield, J., Otey, M.C., y Greenstein, J.P., The toxicity of essential amino acids with - - special reference to the protective effect of l-arginine. Arch. -- Biochem. Biophys. 53: 225 (1955).
- 49.- Kiley, J.E., Welch, H.F., Pender, J.G., Welch, C.S., Removal of - blood ammonia by hemodialysis. Proc. Soc. Explt. Biol. Med. 91: - 487 (1956).
- 50.- McDermott, W.V., Jr., Adams, R.D., Episodic stupor associates with an Eck fistula in the human, with particular attention to ammonium metabolism. J. Clin. Invest. 33: 1 (1954).
- 51.- Fisher, C.J., y Faloon, W.W., Blood ammonia levels in hepatic - - cirrhosis, their control by the oral administration of neomycin. - New Engl. J. Med. 256: 1030 (1957).
- 52.- Conway, E.J., A microdiffusion analysis and volumetric error. Lon- dres 1947., C. Lockwood.
- 53.- Conway, E.J., y Cooke, R., Blood Ammonia. Biochem. J. 33: 457-478 (1939).
- 54.- Moore, S., y Stein, W.H., Photometric ninhidrin method for use in the chromatography of amino acids. J. Biol. Chem. 176: 367-388. (1948).
- 55.- Conway, E.J., The blood Ammonia with observations on normal human blood Biochem. J. 29: 2755-2772 (1935).