

00346



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

2
24

FACULTAD DE CIENCIAS

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

EFFECTO DEL BENZOATO DE SODIO Y
ORNITINA-ASPARTATO EN UN MODELO DE RATAS
CON HIPERAMONEMIA MEDIANTE LIGADURA
DEL CONDUCTO BILIAR

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRA EN CIENCIAS
(BIOLOGIA CELULAR)
P R E S E N T A :
MARIA DEL CARMEN MEJIA VAZQUEZ

DIRECTOR: DR. MISAEL URIBE ESQUIVEL



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 está 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.

**Este trabajo fue realizado en el Departamento
de Gastroenterología de la Clínica de Hígado
del Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán,
con la asesoría del Dr. Misael Uribe Esquivel.**

A mi esposo, el M.en C.Luis Gustavo Cabral Rosetti
A mis padres, Ma. del Carmen y Arturo
A mis abuelos, Raquel y Emilio
A mis hermanos, Adriana, Alejandrina y Arturo

**Al Dr. Misael Uribe Esquivel
Al Dr. José de Jesús Villalobos
A mis compañeros de Gastroenterología
A mis amigos.**

INDICE

RESUMEN	1
CAPITULO I: INTRODUCCION	
1. INTRODUCCION	3
2. CIRROSIS HEPATICA	3
2.1. Definición	3
2.2. Clasificación	3
3. CUADRO CLINICO DE LA CIRROSIS	5
3.1. Alteraciones Nutricias	5
3.2. Alteraciones Diversas Generalizadas	6
3.3. Alteraciones del Estado de Conciencia	6
3.4. Insuficiencia Hepática, Clasificación de Child-Pugh	6
4. PATOGENIA DE LA CIRROSIS	7
4.1. Alteraciones Histológicas	7
4.2. Síndrome de Hipertensión Portal y Hemorragia por Amplitud de Vasos	8
4.3. Síndrome de Encefalopatía Hepática	8
5. ESPECTRO DE LA ENCEFALOPATIA HEPATICA	9
5.1. Definición	9
5.2. Clasificación	10
5.3. Cuadro Clínico	12
5.4. Patogenia	13
5.5. Patología Celular	13
5.6. Alteraciones Neurometabólicas	14
5.7. Glutamina y EPS	14
5.8. Glicina y EPS	15

6. SUSTANCIAS IMPLICADAS EN LA PATOGENIA DE LA EPS	16
6.1. Amonio	16
6.2. Mercaptanos	17
6.3. Ácidos Grasos	18
6.4. Falsos Neurotransmisores	18
6.5. GABA	19
6.6. Zinc	19
7. AMONIO	20
7.1. Síntesis de Amonio	20
7.2. Metabolismo y Toxicidad del Amonio	22
7.3. Transporte de Amonio	23
7.4. Función Cerebral y Amonio	24
7.5. Ciclo de la Urea	25
8. METABOLISMO NITROGENADO E HIGADO	28
8.1. Heterogeneidad Funcional del Hígado	28
8.2. Heterogeneidad Enzimática en el Hígado	29
8.3. Metabolismo de Aminoácidos en el Hígado	30
9. SINDROMES HIPERAMONEMICOS HEREDITARIOS	31
10. DEFICIENCIAS ENZIMATICAS EN EL CICLO DE LA UREA	32
10.1. Deficiencia de Omitina Transcarbimalasa	32
10.2. Deficiencia de Argininosuccinasa	33
10.3. Deficiencia de Sintetasa Argininosuccínica	33
10.4. Deficiencia de Carbamilfosfato Sintetasa	34
10.5. Deficiencia de Arginasa	34

**11. ERRORES CONGENITOS DEL METABOLISMO
QUE CURSAN CON HIPERAMONEMIA 34**

12. MODELOS EXPERIMENTALES

EN CIRROSIS	35
12.1. Modelo por Intoxicación con Tetracloruro de Carbono	35
12.1.1. Limitaciones del Modelo Experimental con Tetracloruro de Carbono	36
12.2. Modelo Experimental de Cirrosis por Ligadura del Conducto Biliar	37
12.2.1. Alteraciones Histológicas de este Modelo	37
12.2.2. Alteraciones Bioquímicas del Modelo	38
12.2.3. Alteraciones Hemodinámicas del Modelo	38
12.2.4. Aplicaciones del Modelo de Ligadura del Conducto Biliar	38
12.2.5. Limitaciones del Modelo Experimental de Cirrosis por Ligadura del Conducto Biliar	39

**CAPITULO II: TRATAMIENTO DE LA ENCEFALOPATIA
HEPÁTICA**

1. MEDIDAS GENERALES	42
2. MEDIDAS ESPECIFICAS	42
2.1. Catárticos y Enemas	42
2.2. Antibióticos	43
2.3. Disacáridos	43
2.4. Lactulosa	43
2.5. Lactosa	44
2.5.1. Enemas de Lactosa	45
2.6. Lactitol	45
2.7. L-Dopa	45
2.8. Bromocriptina	46
2.9. Restricción Proteíca en la Dieta	46

2.10. Dietas Vegetales	46
2.11. Suplementación de Zinc	47
2.12. Antagonistas de las Benzodiazepinas	48
3. NUEVAS ALTERNATIVAS TERAPEUTICAS	48
3.1. Benzoato de Sodio	48
3.1.1. Estructura Química	49
3.1.2. Uso Habitual	49
3.1.3. Metabolismo	49
3.1.4. Mecanismo de Acción ..	52
3.1.5. Rango de Eliminación del Acido Hipúrico	54
3.2. Omitina-Aspartato	55
3.2.1. Estructura Química	55
3.2.2. Uso Habitual	56
3.2.3. Metabolismo	56
3.2.4. Mecanismo de Acción ..	57
3.3. Bases Teóricas de la Combinación BS+OA	59

CAPITULO III: JUSTIFICACION Y OBJETIVOS DEL ESTUDIO

1. JUSTIFICACION DEL ESTUDIO	61
2. OBJETIVO GENERAL	62
2.1. Objetivos Específicos	62
3. HIPOTESIS	62

CAPITULO IV: METODOLOGIA

1. MATERIALES	63
1.1. Reactivos	63
1.2. Material Biológico	
2. METODOS	
2.1. Método para Inducir Cirrosis	64
3. DISEÑO EXPERIMENTAL	65
4. METABOLISMO NITROGENADO	66
4.1. Determinación de Amonio Plasmático	66
4.2. Determinación de Hipurato en Orina	68
5. ESTUDIOS CONVENCIONALES	69
5.1. Determinación de Urea en Orina	69
5.2. Determinación de Bilirrubinas	70
5.3. Determinación de Transaminasas Séricas	71
5.4. Determinación de Fosfatasa Alcalina	73
6. ANALISIS ESTADISTICO	74
CAPITULO V: RESULTADOS	75
CAPITULO VI: DISCUSION	83
CAPITULO VII: CONCLUSIONES	90
BIBLIOGRAFIA	92

RESUMEN

Estudios previos en animales de experimentación y en ensayos clínicos en humanos, han sugerido la utilidad de la administración oral de benzoato de sodio (BS) u ornitina-aspartato (OA) para disminuir las concentraciones de amonio en sangre.

Ambas sustancias se han propuesto como formas de tratamiento para pacientes con encefalopatía portal sistémica (EPS). El mecanismo de acción postulado para el BS es la excreción de amonio en forma de hipurato urinario vía el efecto de las enzimas glicina-Co A sintetasa y glicina n-aciltransferasa. En el caso de la OA, estimulando la incorporación de amonio dentro del ciclo de los ácidos tricarbónicos vía el incremento de la actividad de la glutamil sintetasa. Siendo que ambos mecanismos no compiten, hipotéticamente se esperaría el efecto sinérgico de ambos fármacos para disminuir las concentraciones de amonio en sangre.

Para demostrar el efecto de la combinación de (BS+OA) sobre las concentraciones de amonio en sangre en un modelo de hiperamonemia se estudiaron un total de 45 ratas macho Wistar, a las cuales se les indujo cirrosis biliar mediante ligadura del conducto biliar por 4 semanas y se confirmó por biopsia hepática. Las ratas se dividieron en VIII grupos experimentales y un grupo adicional de ratas normales (sin operación ni tratamiento) fue considerado como control (Grupo I); el resto se dividieron en los siguientes grupos: II= Operación sin tratamiento; III= BS oral 0.2 mL (500 mg/kg); IV= OA oral 0.2 mL (20 mg/mL); V= BO oral 0.2 mL (BS 500 mg/kg + OA 20 mg/mL); VI= BO oral 0.4 mL (BS 500 mg/kg + OA 20 mg/mL); VII= BO oral 0.6 mL (BS 500 mg/kg + OA 20 mg/mL); VIII= OA intravenoso 0.15 mL (100 mg/mL); IX= OA intravenoso 0.30 mL (100 mg/L).

Los resultados sugieren que BS+ OA tiene efecto sinérgico para disminuir los niveles de amonio en sangre de ratas cirróticas hiperamonémicas. Sin embargo, el efecto sinérgico del BS+OA no supera al efecto aislado de OA

EFEECTO SINERGICO

intravenoso. Dado el efecto de OA i.v. esta podría ser una alternativa terapéutica en pacientes con encefalopatía hepática aguda.

Grupo	I (n=5)	II (n=9)	III (n=5)	IV (n=4)	V (n=4)	VI (n=5)	VII (n=5)	VIII (n=4)	IX (n=4)
Operación	-	+	+	+	+	+	+	+	+
BS	-	-	+	-	+	+	+	-	-
OA	-	-	-	+	+	+	+	+	+
NH ₄ ⁺ (μg/dL)	110±16*†§	300±101‡	270±60‡	352±60‡	145±17*†§	101±15*†§	127±45*†§	49±18*†§‡	79±17*†§
Hiponat (mg/vol)	0.3±0.05†§	0.3±0.05†§	4.8±1*§‡	0.3±0.2*†	2.3±0.5*†§	2.4±0.4*†§	2.2±0.6*†§	0.3±0.1*†‡	0.1±0.09*†
Urea (mg/dL)	45±10†§‡	49±18†§‡	71±36*§	184±23*†‡	120±41*†	108±16*§	115±36*†	130±23†‡	152±40*†

* (p<0.05) vs II, † (p<0.05) vs III, ‡ (p<0.05) vs IV, § (p<0.05) vs VI (U Mann-Whitney).

CAPITULO I

1. INTRODUCCION

La fase terminal de las enfermedades hepáticas crónicas es la cirrosis. Este es un padecimiento que en nuestro país causa 17,000 muertes al año y constituye la octava causa de mortalidad general (114).

Dentro de la evolución de las enfermedades hepáticas crónicas el paciente puede sufrir diversas complicaciones y una alteración metabólica muy frecuente en el estado terminal es la aparición de síntomas relacionados con la producción excesiva de amoníaco, conocida como hiperamonemia. Esta alteración metabólica generalmente se expresa con un cuadro clínico electroencefalográfico con deterioro del estado de conciencia de diversa amplitud conocido como síndrome de encefalopatía hepática.

En la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas se han estudiado los mecanismos de acumulación de diversos compuestos tóxicos en el plasma y de esta forma prevenirlos para mejorar las condiciones clínicas del paciente.

2. CIRROSIS HEPATICA.

2.1. Definición.

Cualquiera que sea la etiología, se trata de un proceso crónico y progresivo de fibrosis, en el cual el parénquima hepático se ve difusamente destruido y desorganizado por bandas de tejido conectivo de diferente espesor, que rodean y separan nódulos de regeneración del parénquima hepático anormales en estructura y función (40).

2.2. Clasificación.

La cirrosis se ha clasificado tomando en cuenta su etiología, estructura microscópica y hallazgos morfológicos.

EFEECTO SINERGICO

Etiología: la cirrosis hepática de acuerdo con su etiología (147), se clasifica de la siguiente manera:

I. Cirrosis por enfermedades genéticas: galactosemia, enfermedades por depósito de glucógeno (amilopeptinosis), tirosinosis, intolerancia hereditaria a la fructuosa, deficiencia de α -1 antitripsina, talasemia y otras anemias determinadas genéticamente (atransferrinemia y anemias dependientes de piridoxinas), enfermedad de Wilson, hemocromatosis, fibrosis quística, telangiectasias hereditarias hemorrágicas (Osler-Rendu-Weber), abetalipoproteinemia.

II. Cirrosis química: puede deberse al consumo de agentes tóxicos y de fármacos como la alfametilidopa, el metotrexato y la oxifenisatina.

III. Cirrosis alcohólica.

IV. Cirrosis infecciosa: por hepatitis virales B y C, sífilis congénita o infecciones parasitarias.

V. Cirrosis nutricional: después de cirugía intestinal para tratamiento de obesidad.

VI. Cirrosis biliar primaria.

VII. Cirrosis congestiva.

VIII. Cirrosis criptogénica.

IX. Cirrosis infantil de la India.

X. Cirrosis por sarcoides: granulomatosa.

Microscopía: las características histológicas que describen el proceso cirrótico son las siguientes:

1. Daño de las células hepáticas desde la degeneración hasta la necrosis.
2. Fibrosis delimitando los nódulos de regeneración por bandas de tejido conectivo.
3. Regeneración de las células hepáticas con producción de nódulos.
4. Pérdida de la arquitectura hepática y alteración de la relación entre espacios porta y venas centrolobulillares.

Morfología: en base a ésta la cirrosis puede clasificarse como:

EFECTO SINERGICO

- a) Micronodular: cuando hay nódulos de 3 mm o menos de diámetro.
- b) Macronodular: cuando los nódulos tienen un diámetro mayor de 3 mm.
- c) Mixta: con ambos tipos de nódulos.

3. CUADRO CLINICO DE LA CIRROSIS.

Los principales síntomas de la cirrosis en pacientes son:

1. Ictericia, atribuida a los elevados niveles de bilirrubinas en sangre lo que se manifiesta como la pigmentación amarillenta en piel, mucosas y conjuntiva. La pigmentación de la esclerótica se debe a la riqueza de elastina que muestra alta afinidad por la bilirrubina.
2. Prurito, por la acumulación de ácidos biliares en la piel y a menudo seguido por escoriaciones dermoepidérmicas (91).
3. Trastornos de la coagulación, debido a la incapacidad de las células hepáticas para producir una cantidad adecuada de proteínas involucradas en el proceso de coagulación.
4. Endotoxemia, por la disminución en la depuración hepática de toxinas (46, 159, 179).

3.1. Alteraciones Nutricias.

El paciente cirrótico a menudo sufre desnutrición por diversas causas, como disminución en la cantidad de alimentos ingeridos ya sea por anorexia, náusea o vómito inherentes a la enfermedad; por alteraciones en la digestión y absorción secundarios a la deficiencia de sales biliares y pancreáticas; y también por aumento del gasto energético en la degradación de proteínas y alteración en la síntesis de proteínas hepáticas.

3.2. Alteraciones Diversas Generalizadas.

Otro tipo de complicaciones que pueden presentarse son: anemia debida a la pérdida de sangre, deficiencia de hierro, hemólisis, hiperesplenismo por disminución en la producción de hematíes a nivel de la médula ósea, además de complicaciones endocrinológicas como feminización, hipogonadismo, diabetes caracterizada por hiperinsulinemia e hiperglucagonemia y en casos avanzados de insuficiencia hepatocelular grave puede haber hipoglucemia.

3.3. Alteraciones del Estado de Conciencia.

La presencia de síntomas relacionados con el sistema nervioso central (SNC) en pacientes que cursan con enfermedades hepáticas, es un signo pronóstico grave, ya que cuando el paciente progresa a coma hepático la muerte se presenta generalmente en un corto plazo.

Los hallazgos realizados en encefalopatía hepática y coma hepático incluyen:

- Evidencia clínica de daño hepático crónico.
- Cuadros previos de encefalopatía hepática.
- Condiciones clínicas de estupor y coma.
- Electroencefalograma compatible con coma profundo.

3.4. Insuficiencia Hepática, Clasificación de Child-Pugh.

La insuficiencia hepática de acuerdo a su gravedad se puede clasificar en tres niveles.

I. Insuficiencia hepática leve: no hay encefalopatía hepática ni ascitis, las pruebas de laboratorio (BT mg/dL <2, Alb g/dL >3.5, TP (seg) <5) caen dentro de los valores normales y la nutrición del paciente es buena.

II. Insuficiencia hepática moderada: se presentan encefalopatía hepática

EFECTO SINERGICO

y ascitis, las pruebas de laboratorio (BT mg/dL 2-3, Alb g/dL 2.8-3.5, TP (seg) 6-9) muestran cierta desviación de lo normal pero la alimentación del paciente continúa siendo satisfactoria.

III. Insuficiencia hepática grave: se presentan los grados extremos de la encefalopatía hepática como el estupor y el coma, la ascitis es difícil de controlar, las pruebas de laboratorio (BT mg/dL >3, Alb g/dL 2.8, TP (seg) >10) son marcadamente anormales y la nutrición del enfermo es deficiente.

4. PATOGENIA DE LA CIRROSIS.

Los factores patogénicos más importantes son la disfunción hepatocelular intensa y el corto-circuito intra o extrahepático de sangre venosa portal hacia la circulación sistémica (59). Como consecuencia de estos trastornos diversas sustancias tóxicas absorbidas en el intestino no pueden ser eliminadas por el hígado originando alteraciones metabólicas que llegan a interferir y alterar el funcionamiento del Sistema Nervioso Central.

4.1. Alteraciones Histológicas.

Histológicamente se observa fibrosis y formación de nódulos regenerativos; el flujo biliar canalicular se ve disminuido originando una reducción en la secreción hepática tanto de agua como de aniones orgánicos (bilirrubina-ácidos biliares). Todo esto se traduce en una incapacidad del hepatocito para excretar bilis (21), la cual se acompaña de disminución en el gradiente de producción de bilis, lo que altera la polaridad, la permeabilidad y la fluidez de las membranas sinusoidal y canalicular así como los sistemas de transporte. Existen también alteraciones en la función de los organelos intracelulares y en la función del citoesqueleto.

4.2. Síndrome de Hipertensión Portal y Hemorragia por Amplitud de Vasos.

Las enfermedades que originan la cirrosis producen depósitos de tejido conectivo el cual rodea áreas perivenosas, periportales, las venas hepáticas y los conductos portales, formando puentes. Lo que origina que el flujo portal pase directamente al sistema venoso hepático sin pasar por los acinos.

Este cortocircuito aunado a la alteración de la arquitectura de los vasos como resultado de la compresión, además de la colagenización de los sinusoides, contribuyen a la hipertensión portal, que en pacientes cirróticos es la principal causa de ascitis. Otros factores son también coadyuvantes en este padecimiento como la disminución en la producción de albúmina, la retención de agua y sodio.

En la cirrosis hepática además de las alteraciones del hígado, el tracto gastrointestinal es otro blanco que también se ve afectado. Las várices del tracto gastrointestinal se desarrollan como una consecuencia de la hipertensión portal en los dos extremos del tracto intestinal: várices esofágicas en el extremo superior y várices rectales en el otro.

Las várices sangrantes en cirrosis tienen efecto dañino en los hepatocitos lo que puede deberse a anemia, disminución del oxígeno hepático, o a las elevadas demandas metabólicas que resultan del catabolismo que sigue a la hemorragia (40).

4.3. Síndrome de Encefalopatía Hepática (EH).

Se da el nombre de encefalopatía hepática a un grupo de alteraciones neuropsiquiátricas de naturaleza inespecífica, que se presentan habitualmente en pacientes con insuficiencia hepática moderada o leve e incluso en pacientes sin lesión hepática pero que presentan corto-circuitos portosistémicos (168).

EFEECTO SINERGICO

La encefalopatía portal sistémica (EPS) constituye un síndrome neuropsiquiátrico que puede complicar casi todas las enfermedades hepáticas y si las alteraciones persisten, puede originar coma profundo e incluso la muerte (168).

5. ESPECTRO DE LA ENCEFALOPATIA HEPATICA.

A pesar de que frecuentemente a la encefalopatía hepática se le denomina coma hepático, se debe tener en cuenta que no siempre las alteraciones neuropsiquiátricas se acompañan de pérdida de la conciencia. El coma es el estado más avanzado de la encefalopatía.

5.1. Definición.

Es un complejo síndrome neuropsiquiátrico que se desarrolla como consecuencia de insuficiencia hepática y de la aparición de corto-circuito portosistémico. Se caracteriza por alteraciones de la conducta y la conciencia, trastornos de la personalidad, asterixis o temblor en aleteo y alteraciones electroencefalográficas. La encefalopatía hepática se manifiesta principalmente en la cirrosis hepática o en forma secundaria a cirugía derivativa portosistémica, hepatitis alcohólica y muy raramente en el transcurso de neoplasias del hígado (47).

La causa de la encefalopatía hepática es probablemente multifactorial y su aparición se relaciona con la acción de diversas sustancias presumiblemente tóxicas tales como amonio, mercaptanos, ácidos grasos de cadena corta y aminoácidos de cadena aromática entre otros, provenientes del tubo digestivo y que son absorbidos en el intestino pasando a la circulación portal. Una parte de ellas se desvía a la circulación general por los corto-circuitos portosistémicos aumentando sus concentraciones en la circulación general favoreciendo así su paso a través de la barrera hematoencefálica donde actúan como agentes tóxicos sobre el SNC.

EFEECTO SINERGICO

Otras alteraciones metabólicas como la deficiencia de zinc, también se han implicado en la patogenia de la encefalopatía hepática por su participación como cofactor de ornitina transcarbamilasa que actúa en la conversión del amonio a sustancias menos tóxicas para el SNC, como la urea (59).

El desequilibrio electrolítico que ocasiona hipokalemia, alcalosis, hipoxia o hipovolemia, además de infecciones, intervenciones quirúrgicas, enfermedades hepáticas agudas, enfermedades hepáticas progresivas y obstrucción extrahepática de las vías biliares, son también causas desencadenantes de la encefalopatía hepática (47).

Otros síndromes hiperamonémicos asociados a encefalopatía portal sistémica son: síndromes por deficiencias en el ciclo de la urea, acidemias orgánicas heredadas (55), hiperamonemia transitoria en infantes prematuros (10, 144), síndrome de Reye (140, 152) e hiperamonemia inducida por ácido valproico (43).

5.2. Clasificación.

La encefalopatía hepática se puede presentar en diferentes formas: subclínica, crónica recurrente, aguda, fulminante, por alteraciones enzimáticas, síndrome de Reye.

Excepto los casos de alteraciones enzimáticas del ciclo de la urea que cursan sin daño hepático estructural, el resto de las encefalopatías cursan con daño hepático agudo (hepatitis fulminante) o crónico (cirrosis).

I. Subclínica: se define como la presencia de funcionamiento neurofisiológico anormal, en el que los pacientes pueden descompensarse rápidamente por factores precipitantes como la ingestión aguda de proteínas o la toma de sedantes, y en los que se puede inducir los signos y síntomas característicos de la encefalopatía.

EFEECTO SINERGICO

Las manifestaciones clínicas son: aliento hepático, originado por sustancias derivadas de los mercaptanos como el dimetil-sulfóxido, el etanetiol y el metanetiol (33); asterixis o presencia de temblor de aleteo en las muñecas, que se produce por fatiga neuromuscular (158); otros signos crónicos de hepatopatía pre-existente son atrofia muscular, telangiectasias, red venosa colateral, cambios en la piel y en ocasiones ictericia, ascitis y edema.

II. Aguda: se presenta en forma brusca y severa deterioro del estado de conciencia (estupor o coma profundo), habitualmente asociado a necrosis masiva hepática por infecciones virales, agentes tóxicos o drogas; puede presentarse también en casos de degeneración grasosa aguda, como la observada durante el embarazo, por exceso de tetraciclina y en el síndrome de Reye.

Este tipo de encefalopatía es de instalación rápida y de curso fulminante. Se caracteriza por delirio, convulsiones, rigidez de descerebración ocasional y frecuentemente la muerte, aunque puede ser reversible en el 20-40% de los casos.

III. Crónica Recurrente: se trata de un tipo de encefalopatía cuya instalación es más incidiosa y con un curso menos violento. Los trastornos que a menudo son totalmente reversibles, son precipitados por factores exógenos.

Las manifestaciones clínicas de esta encefalopatía son: hedor hepático, debido a la eliminación por vía respiratoria de derivados de los mercaptanos, principalmente el dimetilsulfóxido y el etanetiol (183); asterixis (158).

IV. Fulminante: se presenta en pacientes con falla hepática aguda y tiene la progresión más rápida de la enfermedad, comunmente se desarrolla encefalopatía dentro de las 8 semanas del inicio de los síntomas, la mortalidad alcanza el 80%. La mayoría de los casos se deben a hepatitis viral o son inducidas por drogas (119).

EFEECTO SINERGICO

V. Por Alteración Enzimática: ocurre principalmente en recién nacidos, varones después de que ha comenzado la lactancia (38).

VI. Síndrome de Reye: es una alteración de causa desconocida que afecta a infantes y adolescentes. Generalmente es precedida de la infección del árbol respiratorio, vómito, letargia y estupor. Existe hepatomegalia y aumenta la consistencia de la glándula hepática. Entre las causas se cuentan: una infección viral aun desconocida, una toxina exógena, intoxicación endógena y errores genéticos metabólicos (140).

VII. Otras:

- Aguda recurrente: que ocurre como episodios simples pero recurrentes.
- Crónica irreversible: los desórdenes crónicos pueden variar de intensidad, y evolucionar hasta un grado en que sea irreversible.
- Mielopatía: se trata de un síndrome con una frecuencia muy baja y que casi siempre es irreversible (38).

5.3. Cuadro Clínico.

De acuerdo con su evolución la encefalopatía hepática puede dividirse en dos etapas: 1) etapa inicial o "precoma" y 2) etapa tardía o "coma"; esta última con tres estadios: estupor, coma superficial y coma profundo.

Inicialmente se observan alteraciones de la conducta en ocasiones imperceptibles, como trastornos muy discretos de la conducta emocional, alteraciones o inversión del ritmo del sueño, alteraciones del apetito, alucinaciones, apatía, confusión mental y excitación o agitación sicomotora.

Los trastornos motores son del tipo de temblor en aleteo o asterixis, marcha atáxica, exaltación de reflejos osteotendinosos, aumento del tono muscular, clonos aquileo o clonos rotuliano y reflejo de succión y prehensión.

En la mayoría de los casos se observan solo algunas de las alteraciones mencionadas, en diversas combinaciones de síntomas y signos.

En etapas tardías, el estado de estupor se caracteriza por un deterioro acentuado de las facultades intelectuales, aunque el enfermo conserva la capacidad de obedecer órdenes. En el coma superficial se observa pérdida de la conciencia con respuesta a estímulos dolorosos, pero cuando el enfermo se encuentra en coma profundo hay pérdida total de la conciencia e incapacidad para responder ante cualquier clase de estímulos.

5.4. Patogenia.

En humanos los estudios del metabolismo de áreas cerebrales específicas son limitados pero se ha observado que en la mayoría de los casos, la alteración es totalmente reversible y por lo general no crea secuelas. Las investigaciones neuroquímicas realizadas en animales de experimentación, se basan en un coma inducido por medio de la extirpación, desvascularización del hígado o por la inyección de una o varias hepatotoxinas.

5.5. Patología Celular.

No se encuentran definidos aún los posibles mecanismos celulares que pueden inducir la encefalopatía hepática, pero la atención se ha enfocado en tres procesos cerebrales, cuyos mecanismos serían:

1. Deterioro de la transmisión sináptica (3).
2. Alteraciones funcionales de la membrana neuronal (30).
3. Alteraciones en el metabolismo energético cerebral (31).

5.6. Alteraciones Neurometabólicas.

En la mayoría de los casos con encefalopatía portal crónica la alteración es reversible del todo, usualmente no quedan secuelas y no se observan lesiones estructurales importantes en el cerebro.

Pero hay casos menos frecuentes en los que se presentan alteraciones neurológicas estructurales como:

a) desmielinización en el cerebro, médula espinal y degeneración hepatocerebral (paraparesis espástica).

b) cambios en los astrocitos cerebrales y edema (son reversibles en parte), lo que representa el estadio más avanzado de una encefalopatía metabólica previamente reversible.

5.7. Glutamina y EPS.

La glutamina se transporta por vía sanguínea hasta el hígado en donde se transforma en glutamato y amoníaco por acción de la glutaminasa, lo que constituye una reacción importante en el metabolismo de los aminoácidos, ya que es la principal ruta para convertir al amoníaco libre que es tóxico, en glutamina que no lo es y poderlo transportar en la sangre (93).

La glutamina así formada, puede atravesar fácilmente las membranas celulares en tanto que el glutamato que es portador de una carga negativa, no puede hacerlo. El amoníaco por su parte, puede recuperarse y volverse a emplear en la síntesis de los aminoácidos. En este caso, la glutamato deshidrogenasa actúa en sentido inverso, reduciendo al amoníaco y al α -cetoglutaratato para formar glutamato. Esta reacción está promovida por la reacción ligada a la nicotina-adenín difosfato (NADP) y es de importancia fundamental en la biosíntesis de todos los aminoácidos, ya que el glutamato es el dador del grupo amino en la síntesis de otros aminoácidos por reacciones de transaminación (93).

EFECTO SINERGICO

El glutamato, que se halla presente en la sangre que fluye al cerebro se transforma en glutamina por medio de la glutamina sintetasa y aparece en la sangre que abandona al tejido. Se ha supuesto que el amonio disminuye la cantidad de glutamato en el cerebro (53). Luego de su liberación dentro del espacio sináptico, el glutamato se liga a su receptor llegando a tener una prolongada exposición a éste si la cantidad de glutamato es elevada.

En encefalopatía hepática la neurotoxicidad mediada por el receptor de glutamato, originará cambios proliferativos y quizá degenerativos en el cerebro. En este padecimiento hay disminución celular cerebral observada por la reducción de oxígeno y el consumo de glucosa (74). Los probables mecanismos involucrados son inhibición de ATPasa Na^+/K^+ neuronal y disturbios en la integridad de la barrera hemato-encefálica (95, 181).

Recientemente se ha propuesto que la acumulación de aminoácidos osmogénicos como la glutamina que aumenta durante la hiperamonemia, contribuye al desarrollo de edema cerebral y falla hepática (157). Algunos investigadores han propuesto que el hinchamiento de la célula debe ser el resultado de la activación de una vía calcio-dependiente (116).

5.8. Glicina y EPS.

La glicina durante su síntesis puede seguir dos rutas:

a) convertirse en serina, un aminoácido de 3-carbonos por adición de un grupo hidroximetilo mediante la serina hidroximetil transferasa que contiene la coenzima tetrahidrofolato, cuyo papel es transportar fragmentos de 1-carbono como los grupos metilo, formilo, formimino e hidroximetilo. La serina, es el precursor de los 2-carbonos de la glicina, por eliminación de un átomo de carbono, en la posición β (93).

b) en el hígado de los vertebrados la glicina puede generarse por otra ruta catalizada por la glicina sintetasa.

EFEECTO SINERGICO

Sin embargo, la ruta principal de degradación de la glicina es una reacción diferente, que necesita tetrahidrofolato y lleva a cabo la ruptura por oxidación de la glicina en CO_2 y NH_3 y un grupo de metileno ($-\text{CH}_2-$) que es aceptado por el tetrahidrofolato. Esta reacción que se invierte fácilmente está catalizada por la glicina sintetasa.

Bajo condiciones normales los neurotransmisores inhibidores GABA y glicina abren los canales de cloro de las neuronas luego de unirse a una corriente de cloro y la neurona pierde su habilidad para prender (103). El amonio inactiva la salida del cloro de las neuronas (99), aboliendo el gradiente de concentración del cloro a través de la membrana neuronal. Como una consecuencia, la abertura de canales de cloro de la neurona por GABA o glicina se encuentra seguida por una entrada de cloro dentro de las neuronas. Así el amonio altera la inhibición post-sináptica en corteza cerebral, tálamo, tallo del cerebro y cordón espinal (136).

6. SUSTANCIAS IMPLICADAS EN LA PATOGENIA DE LA ENCEFALOPATIA PORTAL SISTEMICA.

El conocimiento actual respecto a la patogenia de la encefalopatía hepática, enfatiza la importancia de las alteraciones del metabolismo cerebral por influjo de diversos productos metabólicos de origen intestinal, los que normalmente son eliminados de la sangre por la vena porta cuando el hígado está sano. Estos productos son identificados como toxinas.

6.1. Amonio.

Esta sustancia es la que con mayor frecuencia se encuentra implicada en el desarrollo de encefalopatía hepática. Algunos investigadores han señalado que ante una lesión hepática, el cerebro es más sensible a los efectos tóxicos del amonio. Debido al efecto fisiopatogénico del amonio, teóricamente se puede

EFEECTO SINERGICO

decir que el desencadenamiento de la encefalopatía hepática se debe a que (160):

a) Interfiere con el metabolismo energético cerebral (mediante la disminución de la síntesis de adenín-trifosfato (ATP) y acetil-coenzima A (acetil-Co A)) reduciendo los enlaces fosfato, lo que favorece la depresión del sistema reticular ascendente, propiciando aparición de cambios mentales.

b) Aumenta la síntesis de glutamina, la cual teóricamente actúa como un neurotransmisor.

c) Aumenta la acumulación del ácido gama aminobutírico (GABA), que es un inhibidor de la neurotransmisión.

d) Tiene efecto directo sobre la membrana neuronal, disminuyendo la frecuencia de los potenciales de espiga y alterando la transferencia de electrolitos y agua a través de la membrana.

e) Produce alteraciones en la relación mitocondria-citoplasma de nicotinamida-adenín-dinucleótido reducido / nicotinamida-adenín-dinucleótido (NADH/NAD) y del cambio malato/aspartato, dando por resultado la acumulación del lactato en el citoplasma y disminución de los neurotransmisores excitadores como aspartato y glutamato.

6.2. Mercaptanos.

Otra toxina involucrada en el síndrome de la encefalopatía hepática es la metionina. Se trata de un aminoácido sulfurado que al ser metabolizado por el hígado y las bacterias intestinales, produce metabolitos (mercaptanos) como el dimetilsulfóxido y el metanetiol (34).

6.3. **Acidos Grasos.**

Los ácidos grasos de cadena corta y mediana con longitudes de C5 a C8 (butarato, valerato, octanato y ácido hexanoico) pueden desempeñar un papel importante en la encefalopatía hepática (185, 187). Estos ácidos grasos se han encontrado elevados en la sangre y el líquido cefalorraquídeo de pacientes con encefalopatía hepática.

A pesar de que no se han establecido del todo los mecanismos de acción de los ácidos grasos de cadena corta en cuanto al desarrollo de encefalopatía hepática, la acción tóxica puede deberse a:

- a) Acción sinérgica con otras toxinas como amonio y mercaptanos.
- b) Inhibición de la detoxificación del amonio mediante la disminución de la síntesis de urea y la formación de glutamato.
- c) Acción directa sobre las membranas neuronales y las terminaciones sinápticas, interfiriendo con el flujo iónico y la propagación de los impulsos nerviosos.
- d) Debido a que los ácidos se transportan unidos a albúmina, competencia por los medios de transporte intravascular con otras toxinas.

6.4. **Falsos Neurotransmisores.**

Fischer y cols. trataron de explicar la encefalopatía hepática postulando una disminución de transmisores neuroquímicos verdaderos como la noradrenalina y la dopamina, en ciertas áreas vitales del SNC o la presencia de neurotransmisores falsos que desplazan a los transmisores neuroquímicos biológicamente activos a nivel del receptor neuronal, o ambas.

EFECTO SINERGICO

Estos falsos neurotransmisores son aminas biogénicas betahidroxiadas y serotonina que pueden producirse en el colon por acción de las enzimas bacterianas que actúan como descarboxilasas que atacan los aminoácidos aromáticos lumenales, principalmente fenilalanina, tirosina y triptofano.

Cuando la sangre se desvía de la vena porta sin pasar por el hígado, las aminas que normalmente son metabolizadas por éste órgano aparecen en la circulación general y se pueden acumular en las terminaciones nerviosas presinápticas y en el SNC y periférico desplazando a los verdaderos neurotransmisores (noradrenalina y dopamina).

6.5. GABA.

El ácido gama aminobutírico (GABA), es el neurotransmisor y neurodepresor más abundante del sistema nervioso central; aunque en la mayoría de las zonas actúa como neurodepresor, hay zonas en las que funciona como neuroexcitador.

El GABA puede producirse en el colon por los mecanismos involucrados en la putrefacción colónica en la que intervienen bacterias colónicas como *E. coli* y *B. fragilis*. Para algunos autores, el GABA es la principal toxina involucrada con la patogénesis de la encefalopatía hepática (13).

6.6. Zinc.

El metabolismo de algunos metales como el zinc, el cobre o el hierro, se encuentra alterado en la cirrosis hepática. La alteración de metabolismo del zinc tiene particular interés en la patogénesis de la encefalopatía hepática, ya que es necesario para la activación normal de la ornitina transcarbamilasa, enzima que participa en el ciclo de la urea (28) y de la glutamina sintetasa, que incorpora amonio al glutamato (131). De esta forma afecta dos vías metabólicas de eliminación del amonio.

La mayoría de los pacientes cirróticos alcohólicos presentan zincuria además de absorber cantidades subnormales de zinc. Esta alteración se pone de manifiesto en los niveles sanguíneos subnormales del metal. Como la mayoría de las enzimas del ciclo de la urea son zinc-dependientes, algunos investigadores han especulado que la deficiencia de zinc podría entorpecer esa vía metabólica para la eliminación del amonio. De hecho, estudios preliminares sugieren que la suplementación de zinc mejora la encefalopatía hepática subclínica y la crónica recurrente (138, 159).

7. AMONIO.

El amonio (NH_3) es un producto del catabolismo de las proteínas en los mamíferos. Se forma en el tubo intestinal por la acción de las ureasas bacterianas sobre las proteínas de la dieta y la urea, llegando al hígado por la vena porta. Una cantidad importante (25%) de amonio se absorbe a partir del tubo intestinal .

7.1 Síntesis de Amonio.

En el hígado se forman grandes cantidades de amonio (75%) por desaminación oxidativa de los aminoácidos, principalmente por transaminación de aminoácidos más α -cetoglutarato lo que origina glutamato, el que posteriormente por desaminación pasa a α -cetoglutarato por oxidación aerobia de algunas aminas fisiológicas como la adrenalina y la dopamina. También por hidrólisis de las bases de nucleótidos.

En la sangre solo el 1% del amoníaco total se halla en forma de NH_3 libre a pH 7,4 el resto aparece como ión amonio (NH_4^+). En muchos tejidos el amoníaco se combina con el glutamato para dar glutamina en una reacción que es catalizada por la glutamina sintetasa (93).

EFEECTO SINERGICO

- **Amonio en el Tubo Digestivo:** se forma a partir del material nitrogenado de la dieta y de la descamación epitelial de la pared intestinal, tiene también como sustratos: péptidos y aminoácidos que son secretados de la circulación a la mucosa y a la luz intestinal, además de compuestos más pequeños como la urea, que son fácilmente difusibles.

En la flora bacteriana normal y en la mucosa intestinal (155) existen enzimas que pueden liberar amonio de estas sustancias. Las bacterias que producen ureasa son aeróbicas como las enterobacterias o anaeróbicas (*Proteus*, *Clostridia* y *Bacteroides*) (48).

- **Amonio en el Estómago e Intestino Delgado:** en presencia de hiperamonemia y encefalopatía hepática la hidrólisis de la urea es sumamente importante ya que es una sustancia fácilmente difusible que pasa libremente de la circulación a la luz intestinal tanto en el estómago como en el intestino delgado.

La localización de la actividad de ureasa en el tubo digestivo del hombre ha sido ampliamente estudiada en forma directa e indirecta. El grado y el sitio de contacto entre la enzima y el sustrato probablemente difieren en forma regional tanto porque existen diferencias locales en el transporte de urea entre la circulación y la luz intestinal como por la localización propiamente de las ureasas bacterianas (154).

- **Amonio en el Colon:** el intestino grueso es casi impermeable a la urea cuyo diámetro es de 2.3 \AA (angstrom), debido al tamaño de los poros de su membrana (22, 180).

En humanos se ha estudiado la hidrólisis de la urea de la sangre circulante luego de la administración de diferentes cantidades de urea por vía endovenosa (180). Los datos muestran que el colon es poco permeable a la urea y que la hidrólisis de la urea circulante se lleva a cabo probablemente en la

mucosa o yuxtamucosa, permitiendo que la mayor parte del amonio formado se absorba a la circulación portal, en donde el amonio va a ser parcialmente resintetizado a urea en el hígado. Una parte de esta urea se va a distribuir nuevamente al tubo digestivo para degradarse a amonio y su consecuente recirculación enterohepática. Estos eventos ocurren sin pérdida de nitrógeno para el organismo.

7.2. Metabolismo y Toxicidad del Amonio.

Desde 1932, se sabe que el amonio es una sustancia tóxica (11), pero su papel en la encefalopatía hepática se conoció en 1952 cuando por primera vez Gabuzda y cols. (57) observaron coma hepático en enfermos con cirrosis al administrarles sustancias nitrogenadas (cloruro de amonio, urea o dietas ricas en proteínas). Algunos estudios clínicos muestran una clara correlación del incremento de los niveles de amonio plasmático y glutamina de líquido cefalorraquídeo con la presencia de encefalopatía hepática, sugiriendo una relación entre los niveles de amonio y el estado mental. Otros estudios muestran la existencia de hiperamonemia y alteraciones del estado mental en trastornos congénitos enzimáticos del ciclo de la urea (14).

Los individuos con síndromes hiperamonémicos, por alteraciones genéticas hereditarias en alguna enzima del ciclo de la urea o como consecuencia de daño hepático (cirrosis, hepatitis fulminante, etc.), muestran incapacidad para formar urea a partir de amoníaco. No pueden tolerar una dieta rica en proteínas ya que los aminoácidos (AA) ingeridos en exceso sobre las necesidades diarias mínimas para la síntesis de proteínas se desaminarían en el hígado y provocarían la aparición de amoníaco libre en la sangre, lo que lleva a alteraciones mentales, retraso en el desarrollo y si la cantidad es elevada, coma hepático y la muerte (34, 41, 70, 126).

7.3. Transporte de Amonio.

El transporte de amonio *in vitro*, a través de una membrana se lleva a cabo por difusión no iónica. El amoníaco (NH_3) que funciona como una base libre, se difunde rápidamente porque es una molécula que no está cargada y que es soluble en lípidos; en cambio, el ión amonio (NH_4^+) atraviesa difícilmente la membrana, pues está hidratado, tiene carga y es poco soluble en lípidos; el pH de este sistema es de aproximadamente 9,1. La constante de disociación del ión amonio en condiciones fisiológicas, es tal que solo hay 10 moléculas a pH 8, 100 a pH 7 y 1,000 a pH 6 como base libre rápidamente difusible (157). En el hombre, tales estimaciones se encuentran sujetas a las diversas características de la mucosa intestinal en los diferentes segmentos del tubo digestivo.

Aunque *in vivo* no se ha podido cuantificar la capacidad del estómago para absorber amonio, se sabe que la secreción del amonio está directamente relacionada a la concentración en la sangre. En el yeyuno se ha observado que la absorción de amonio se lleva a cabo mediante transporte pasivo; en tanto que la secreción o paso del amonio de la sangre a la luz intestinal, se realiza por transporte activo, en donde intervienen factores de difusión como ocurre en animales (154). En el ileon en humanos, no se ha investigado el transporte del amonio, pero en animales se sugiere que la absorción del amonio a este nivel requiere un proceso activo unido a la secreción de bicarbonato. En estudios realizados en colon humano, se ha demostrado que el amonio se absorbe por gradientes de pH, eléctricos y de concentración (22,29, 154, 155, 157).

Por todo lo anterior, el transporte de amonio puede definirse como un fenómeno bidireccional que se lleva a cabo de acuerdo con la concentración relativa de la sustancia en ambos sitios de la membrana intestinal. No se conocen con exactitud los principales factores que afectan el transporte de amonio en el hombre, pero se sabe que no son los mismos para todos los sitios del intestino.

7.4. Función Cerebral y Amonio.

No se conoce del todo el efecto que el amonio pueda tener a nivel cerebral (184) ya que no se comprenden aún los problemas neuroquímicos y neurofisiológicos de las diferentes estructuras del cerebro responsables de la regulación de las diversas estructuras que componen el SNC, dificultando la definición de los procesos metabólicos nerviosos regionales (148).

Se sabe, sin embargo, que para mantener el adecuado funcionamiento cerebral y por tanto el estado de conciencia es necesario conservar la integridad anatómica de las estructuras nerviosas, la producción adecuada de energía y la transmisión sináptica normal.

En la encefalopatía hepática, histológicamente existe hipertrofia o hiperplasia de los astrocitos o células de Alzheimer tipo II de la neuroglia. En el astrocito se encuentra la glutamina sintetasa que en conjunto con la glutamato deshidrogenasa son las responsables de extraer el amonio cerebral.

En los pacientes cirróticos la actividad de estas enzimas se ve disminuída lo que ocasiona daño a la integridad del astrocito y como consecuencia se reduce la capacidad de extraer amonio por estas enzimas (24), además de que también regulan la función sináptica por medio del glutamato. Algunos estudios experimentales de encefalopatía hepática muestran cambios sinápticos al ser modificados los niveles de glutamato por deterioro de la función hepática (72).

El amoníaco es tan tóxico que la inyección de soluciones aún muy diluídas en la corriente sanguínea desencadena la aparición de estados comatosos. La toxicidad del amoníaco respecto al cerebro no se conoce bien, pero pueden identificarse básicamente dos hechos:

1) Al pH de la sangre el amoníaco aparece casi completamente como ión amonio (NH_4^+) el cual no puede atravesar fácilmente las membranas del plasma o de las mitocondrias. Sin embargo, el amoníaco libre (NH_3) que es una

EFECTO SINERGICO

molécula neutra, circula libremente y aunque en la sangre solo el 1% del amoníaco total se halla en forma de NH_3 libre a pH 7,4 esta pequeña cantidad puede penetrar a través de las membranas y entrar en las células cerebrales y sus mitocondrias.

2) La entrada del amoníaco en las mitocondrias cerebrales conduce a la formación de glutamato a partir del amoníaco y del α -cetoglutarato, mediante la reacción de la glutamato deshidrogenasa. El resultado neto es que el α -cetoglutarato desaparece del ciclo del ácido cítrico en las mitocondrias del cerebro, disminuyendo la velocidad de oxidación de la glucosa.

7.5. Ciclo de la Urea.

El amoníaco procedente de la desaminación de los AA, se convierte en urea en el hígado por el ciclo de la **urea**. La síntesis de la urea químicamente es una reacción de neutralización de una base fuerte (HCO_3^-) por un ácido débil (NH_4^+). La excreción diaria de 30 g de urea corresponde a la neutralización de aproximadamente 1 mol de HCO_3^- (73).

Una molécula de ornitina se combina con una molécula de NH_3 en forma de **CARBAMIL FOSFATO** para formar **CITRULINA**, la cual capta una segunda molécula de amoníaco en forma de **ASPARTATO** y forma **ARGININASUCCINATO**, que originará **ARGININA**; esta última se hidroliza dando **UREA** y regenerando una molécula de **ORNITINA**, la que puede comenzar nuevamente el ciclo (Figura 1).

El producto del ciclo es la **urea**, la cual es neutra, no tóxica y soluble en agua, por la vía sanguínea llega a los riñones y se excreta por la orina. En un individuo normal, la mayor parte del amonio formado acaba siendo eliminado en forma de urea, que es la principal ruta de excreción de nitrógeno en los mamíferos. En el ciclo de la urea se eliminan dos moléculas de amonio: una de amonio libre y otra cedida por el aspartato.

EFEECTO SINERGICO

De acuerdo a Galambos (58), la determinación de la síntesis diaria de urea es una buena medida para confirmar la capacidad del hígado para metabolizar nitrógeno y por lo tanto es muy importante para la función cerebral. Señaló también que una disminución de la síntesis de urea del hígado es causada por la disminución en la función de enzimas específicas del ciclo de Krebs.

Un paciente sano excreta 90% del N-proteico que toma por la orina y 10% por excremento. Noventa por ciento de N-urinario es N-urea, el 10% es amonio, creatinina, ácido úrico y péptidos (112). Los elevados niveles de glutamina plasmática son el resultado de una disminución en la síntesis de urea (61).

EFFECTO SINERGICO

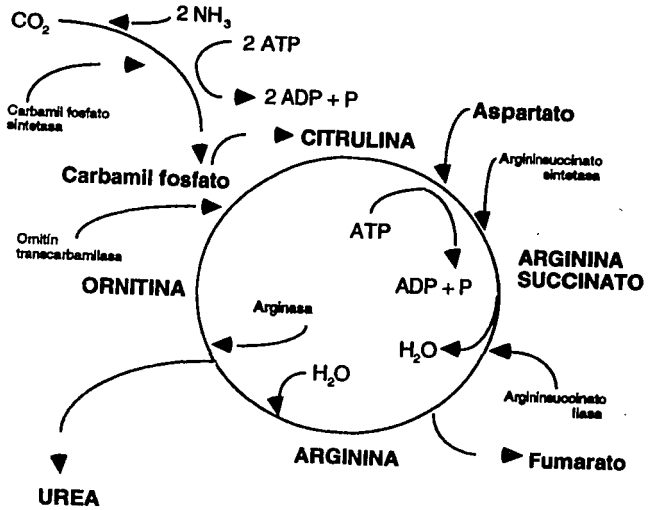


Figura 1: CICLO DE LA UREA

8. METABOLISMO NITROGENADO E HIGADO.

En el parénquima hepático existe una marcada heterogeneidad celular que origina dos zonas funcionalmente diferentes: una periportal y otra perivenosa, las que muestran marcadas diferencias en su contenido enzimático y en las estructuras subcelulares que las componen, lo que trae como consecuencia que ambas regiones difieran en las funciones que llevan a cabo, principalmente con respecto al metabolismo del nitrógeno, lo que se traduce en importantes implicaciones funcionales para la homeostasis del amonio (83).

8.1. Heterogeneidad Funcional del Hígado.

Los procesos metabólicos que se llevan a cabo en el hígado son:

<u>Zona Periportal</u>	<u>Zona Perivenosa</u>
<p>1) Liberación de glucosa</p> <ul style="list-style-type: none"> - degradación del glucógeno a glucosa. - gluconeogénesis. 	<p>1) Incorporación de glucosa</p> <ul style="list-style-type: none"> - síntesis de glucógeno desde glucosa - glucolisis - liponeogénesis
<p>2) Metabolismo energético oxidativo</p> <ul style="list-style-type: none"> - oxidación de ácidos grasos. - ciclo del ácido cítrico. - cadena respiratoria. 	
<p>3) Utilización de aminoácidos.</p> <ul style="list-style-type: none"> - conversión de aminoácidos a glucosa. - degradación de aminoácidos. - ureagénesis desde el N_2 del amonio. 	<p>3) Destoxificación del Amonio</p> <ul style="list-style-type: none"> - ureagénesis desde el N_2 de los aminoácidos
<p>4) Protección oxidativa.</p>	<p>4) Biotransformación</p>
<p>5) Excreción del ácido cólico.</p>	
<p>6) Excreción de bilirrubina.</p>	

Tabla 1. Heterogeneidad funcional de los cordones de hepatocitos.

8.2. Heterogeneidad Enzimática en el Hígado.

Las enzimas que actúan en las dos zonas hepáticas (83) son:

Zona Periportal	Zona Perivenosa
1) Liberación de glucosa - glucosa 6-fosfatasa - fructuosa 1,6-difosfatasa - fosfoenolpiruvato carboxinasa - lactato deshidrogenasa	1) Incorporación de glucosa - glucocinasa - piruvato cinasa - glucosa6-fosfato deshidrogenasa
2) Metabolismo energético oxidativo - succinato deshidrogenasa - malato deshidrogenasa - citocromo deshidrogenasa	
3) Utilización de aminoácidos. - alanino aminotransferasa - tirosina aminotransferasa - ornitina carbamittransferasa	3) Destoxificación del Amonio - glutamato deshidrogenasa - isocitrato deshidrogenasa (NADP ⁺)
4) Protección oxidativa. - glutatión peroxidasa	4) Biotransformación - NADPH-citocromo c reductasa - citocromo P450 - citocromo b ₅ - NADH-tetrazolium reductasa - alcohol deshidrogenasa
5) Excreción del ácido cólico. - ATPasa canalicular	
6) Excreción de bilirrubina.	

Tabla 2. Heterogeneidad enzimática de los cordones de hepatocitos.

8.3. Metabolismo de Aminoácidos en el Hígado.

Las proteínas provenientes de la dieta pueden ser utilizadas completamente solo si ésta contiene la cantidad necesaria de cada AA esencial, el resto debe ser degradado para proporcionar energía y su nitrógeno deberá ser eliminado.

Las proteínas de la dieta son hidrolizadas dentro de la luz intestinal y los AA y oligopéptidos resultantes son captados por la mucosa del intestino delgado. En la mucosa se produce una hidrólisis adicional de los oligopéptidos y puede producirse un cierto grado de metabolismo de los AA de la dieta, pero la mayor parte son transportados desde el intestino a través de la vena porta (79).

Después de una comida, los AA alcanzan el hígado en concentraciones relativamente elevadas. Una parte de estos AA exógenos es utilizada por el hígado para sintetizar proteínas para su propia estructura y función, y el resto pueden ser eliminados en la primera circulación portal o pueden pasar a la circulación sistémica donde se encuentran disponibles para su captación por los tejidos periféricos (49).

Los AA que no son utilizados inmediatamente para la síntesis de proteínas y otras biomoléculas, no pueden almacenarse en la célula como los ácidos grasos y la glucosa, ni pueden ser excretados. Este excedente de AA se utiliza como combustible metabólico. El grupo α -amino se separa para convertirse en urea y el esqueleto carbonado origina intermediarios metabólicos importantes tales como: acetil-CoA, acetacetil-CoA, α -cetoglutarato, piruvato, succinil-CoA, fumarato u oxaloacetato (153).

En condiciones normales, el hígado cataboliza más de la mitad de los AA exógenos provenientes de la hidrólisis de las proteínas y de los péptidos alimentarios y los transforma en urea.

EFFECTO SINERGICO

En tres diferentes circunstancias metabólicas, los AA sufren una degradación por oxidación:

1) al ingerir AA en exceso respecto a las necesidades del cuerpo para la síntesis de proteínas, pues los aa no pueden almacenarse.

2) durante el recambio normal de proteínas del cuerpo, en la cual se liberan los AA.

3) durante la cetosis post-ayuno prolongada o indicada por diabetes mellitus, cuando los carbohidratos no están disponibles o no se emplean de manera adecuada.

En estas condiciones, los AA pierden su grupo amino por medio de las transaminasas (93), enzimas cuya función consiste en trasladar los grupos amino de un α -aminoácido hasta un α -cetoácido (173), los que mediante reacciones de oxidación llegan a dióxido de carbono y agua.

Los grupos α -amino de los 20 aminoácidos de las proteínas se eliminan por degradación oxidativa. Si no se emplean para la síntesis de nuevos AA, estos grupos amino se convierten en un producto de excreción: la urea.

9. SINDROMES HIPERAMONEMICOS HEREDITARIOS.

Estos síndromes se presentan casi exclusivamente en niños que no tienen cirrosis. Comparten con la encefalopatía hepática: la hiperamonemia, encefalopatía y cierto grado de intolerancia a las proteínas de la dieta. Estos síndromes son producidos por deficiencias enzimáticas del ciclo de la urea (26, 41).

EFEECTO SINERGICO

Las manifestaciones clínicas varían de acuerdo con la enzima que se encuentre involucrada y con el grado de deficiencia de la misma. Las deficiencias enzimáticas pueden ocurrir en cualquiera de los cinco pasos enzimáticos del ciclo de Krebs.

Los recién nacidos con deficiencias enzimáticas en el ciclo de la urea se encuentran asintomáticos y al comenzar a alimentarlos con leche, se deteriora su estado de conciencia. Antes de llegar al coma se observa que el niño rechaza el alimento y puede presentar vómito y letargia, y finalmente pueden llegar a morir con encefalopatía en unos cuantos días e incluso horas. Otras alteraciones que pueden presentarse en estos niños antes de morir son posturas bizarras, alteraciones respiratorias con hiperventilación y alcalosis respiratoria. En algunos casos hay convulsiones y rigidez de decerebración antes de morir (26, 41).

10. DEFICIENCIAS ENZIMATICAS EN EL CICLO DE LA UREA.

Las deficiencias en el ciclo de la urea se presentan con una frecuencia de 1 en 25,000 neonatos. Los cinco defectos se han identificado clínicamente; cuatro de ellos son autosómicos recesivos, el quinto que afecta a la ornitina transcarbamilasa, es un defecto que involucra un gen recesivo ligado al sexo localizado en el brazo corto del cromosoma X.

10.1. Deficiencia de Ornitina Transcarbamilasa

La manifestación de los síntomas será proporcional a la deficiencia de la enzima. En los hombres homocigotos la expresión de la enfermedad es total y con una sola excepción todos han muerto en la primera infancia. Las mujeres son heterocigotas y la enfermedad tiene una expresión variable, el cuadro clínico se caracteriza por vómito y estupor en episodios y en los casos más graves, atrofia cerebral y coma.

La inactivación aleatoria de un cromosoma en etapas tempranas del desarrollo embrionario (ionización), podría explicar porque las pacientes femeninas con un defecto en ornitina transcarbamilasa tienen un amplio espectro de síntomas, dependiendo de la proporción de células hepáticas afectadas, mientras que en varones la enfermedad siempre es severa (23).

Bioquímicamente la deficiencia de ornitina-transcarbamilasa provoca acumulación de carbamilo-fosfato antes del bloqueo enzimático, con paso al citoplasma en donde sirve como sustrato para la biosíntesis de pirimidina. Al mismo tiempo se observa aumento en la secreción urinaria de ácido orótico e hiperamonemia (26, 150).

10.2. Deficiencia de Argininosuccinasa

En estos pacientes se presenta aciduria argininosuccínica y aunque las manifestaciones clínicas en los casos graves son similares a las anteriormente mencionadas, hay formas menos graves en donde los síntomas se presentan inmediatamente después del nacimiento y los niños pueden sobrevivir y llegar a la edad adulta con secuelas crónicas de encefalopatía y retraso mental.

A nivel bioquímico existe acumulación de ácido argininosuccínico en la sangre, en la orina y en el líquido cefalorraquídeo, además de hiperamonemia. En términos generales la síntesis de urea en todos estos síndromes está disminuida y a pesar de los defectos enzimáticos la síntesis de urea continúa, probablemente por la formación de la urea por caminos metabólicos alternos como podría ser la acción de arginasa en la arginina liberada de las proteínas de los tejidos (41).

10.3. Deficiencia de Sintetasa Argininosuccínica.

También se conoce con el nombre de citrulinemia y hasta la fecha se han

descrito 6 casos. Generalmente los enfermos se mueren en la primera infancia. A nivel clínico se observan concentraciones elevadas de citrulina en el plasma, orina y líquido cefalorraquídeo así como hiperamonemia. El diagnóstico igual que con las otras deficiencias enzimáticas, puede confirmarse determinando la actividad específica de la enzima en el tejido hepático (41).

10.4. Deficiencia de Carbamilfosfato Sintetasa.

La carbamilfosfato sintetasa es una enzima exclusiva de mitocondria que se activa por la acetil-glutamato para participar en el ciclo de la urea. Se han descrito tres formas clínicas de este padecimiento, en las que la actividad de carbamilfosfato-sintetasa I y carbamilfosfato sintetasa II se encuentran disminuídas (41).

10.5. Deficiencia de Arginasa.

Este padecimiento se caracteriza por argininemia y al igual que en los otros síndromes, los síntomas se agravan por la ingestión de proteínas. Se han descrito dos variedades de esta enfermedad que clínicamente presentan elevados niveles de arginina en sangre, orina y líquido cefalorraquídeo así como hiperamonemia. Los niveles de urea en sangre están disminuídos también. Este síndrome se hereda en forma autosómica recesiva (41).

11. ERRORES CONGENITOS DEL METABOLISMO QUE CURSAN CON HIPERAMONEMIA.

Un número variable de alteraciones genéticas se expresan como síndromes hiperamonémicos. Las manifestaciones clínicas y bioquímicas son características de la encefalopatía hepática. Los enfermos estudiados son pocos y en ellos no se ha determinado claramente la transmisión hereditaria. Ciertos casos presentan deficiencia de cocarboxilasa A (acidemia propiónica); en otros

EFEECTO SINERGICO

se observan aminoaciduria y niveles elevados de ornitina en el plasma; un grupo de pacientes más, presentan niveles elevados de lisina y arginina en el plasma; en tanto que otros muestran cetoacidosis e hiperamonemia.

En todos los enfermos con síndromes hiperamonémicas congénitos el ciclo de la urea no se abate completamente, sino que se encuentran niveles disminuídos de urea en sangre.

12. MODELOS EXPERIMENTALES EN CIRROSIS.

Se han propuesto diversos modelos para inducir cirrosis experimental pero solo dos han sido ampliamente usados. Uno es el modelo de cirrosis micronodular inducido por medio de la exposición crónica al tetracloruro de carbono (CCl_4) y el otro es el modelo de cirrosis biliar por ligadura del conducto biliar (colédoco) (119, 132,133).

12.1. Modelo por Intoxicación con Tetracloruro de Carbono.

Este modelo de cirrosis experimental se lleva a cabo por medio de la administración de múltiples dosis de tetracloruro de carbono (CCl_4) por vía subcutánea, intramuscular, inhalada, intraperitoneal o mediante tubo gástrico (132,133). El efecto tóxico del agente depende de la dosis administrada, en la rata adulta la dosis mínima es de 0.02 mL/kg por vía intraperitoneal (i.p.) u oral con el suministro de pentobarbital que sirve como agente inductor. La dosis i.p. es de 0.1 mL administrada 2 veces por semana (125), con la administración de pentobarbital en el agua de beber (0.5 g/L). La administración por vía intragástrica mediante cánula se realiza en dosis progresivas una vez por semana (de 0.04 mL a 0.2 mL por 8 semanas) (132, 133).

La inducción de cirrosis hepática se debe al daño de la membrana plasmática, las membranas del retículo endoplásmico y otros organelos por el

CCl_4 no metabolizado, así como por radicales libres (CCl_3) generados por el citocromo P-450 y por radicales libres secundarios. En este proceso se forman lipoperóxidos en las membranas, dando como resultado una pérdida de potasio, enzimas y coenzimas y una ganancia celular de sodio y calcio, causando así la necrosis (188).

El desarrollo de cirrosis se asocia con disminución en la excreción urinaria de sodio, la cual precede a la aparición de ascitis (97, 125), cuya formación varía entre 10 y 100 mL (52, 96, 125).

Macroscópicamente se observa esplenomegalia (hasta 5 veces del volumen normal); histológicamente se observa fibrosis y la formación de nódulos de regeneración y proliferación ductular además de aumento de las bandas de tejido conectivo.

A nivel bioquímico se presentan aumento de transaminasas y fosfatasa alcalina (178), formación excesiva de colágena tipo I (se encuentra formando los haces fibrosos delgados del tracto portal y paredes venosas así como la cápsula) y tipo II (característica de cartílago) y a partir de la 4a-6a semana hay síntesis de colágena tipo IV (forma las membranas basales) (143).

Dentro de las alteraciones hemodinámicas se observa disminución en la presión arterial media e incremento en la presión portal, originando hipercinecia circulatoria que se caracteriza por un aumento en el ritmo cardíaco y una disminución de la resistencia vascular periférica.

12.1.1. Limitaciones del Modelo Experimental con CCl_4 .

Las limitaciones de este modelo son:

1. Susceptibilidad individual de cada animal al CCl_4 , lo que origina intensa cirrosis en algunos animales y solo cambios mínimos en los tejidos de otros.

2. Mortalidad del 50 al 70% entre las 10 a 12 semanas de la intoxicación.
3. Toma largo tiempo para desarrollar cirrosis: 10 a 13 semanas después de la inhalación de CCl_4 (7, 52, 109, 149).

12.2. Modelo Experimental de Cirrosis por Ligadura del Conducto Biliar (Colédoco):

Los primeros estudios que datan de hace 14 años (89), cuando Acatino L., describió en sus estudios de colerésis poscolestática (obstrucción por 2 o más semanas), la técnica para la obstrucción del colédoco, lo que permite que el flujo biliar sea restablecido (1,2).

La técnica que se utiliza consiste en la ligadura y posterior sección del conducto biliar (colédoco). El tiempo para el desarrollo de cirrosis después de la ligadura aún no ha sido bien establecido, aunque algunos autores han encontrado que se desarrolla cirrosis después de 3 a 5 semanas (25) de obstrucción en tanto que otros han encontrado evidencias de cirrosis a partir de los 14 días de obstrucción total en ratas (56, 77, 89, 100, 129).

12.2.1. Alteraciones Histológicas de este Modelo.

En un estudio reciente, se confirmó histológicamente la presencia de cirrosis a los 28 días de obstrucción biliar en ratas (Figura 3). El peso corporal de las ratas disminuye progresivamente entre el 20 al 25 %, lo que puede atribuirse a la cirugía para la inducción de la cirrosis así como a la propia colestasis que favorece hiporexia y disminución en la ingesta alimentaria (51).

Los cambios morfológicos que se presentan en este modelo, principalmente en perros y ratas son: infiltrado neutrófilo, proliferación marginal de conductillos, edema y fibrosis, que se asemejan a lo reportado en humanos con cirrosis biliar extrahepática (42, 77, 124, 128, 178).

12.2.2. Alteraciones Bioquímicas del Modelo.

Durante las primeras semanas de ligadura, se ha encontrado reproducción de las alteraciones bioquímicas tales como elevación de bilirrubinas, que tiende a estabilizarse en valores comprendidos entre 40 a 70 mg/L. Comparado con ratas normales, se ha observado elevación de amonio, aspartato aminotransferasa (AAT) y fosfatasa alcalina (FA) (178) así como ascitis que generalmente se acompaña con hipoalbuminemia.

12.2.3. Alteraciones Hemodinámicas del Modelo.

Se ha informado que después de un mes de la ligadura del conducto común, las ratas presentan cirrosis asociada a hipertensión portal y alteraciones hemodinámicas. Observándose también una hipercinesia circulatoria caracterizada por elevación del ritmo cardiaco y disminución de la resistencia vascular periférica. La resistencia vascular esplánica se encuentra disminuída, el flujo sanguíneo esplánico elevado y la presión arterial media no se modifica (20, 56).

12.2.4. Aplicaciones del Modelo de Ligadura del Conducto Biliar.

Este modelo es fácilmente reproducible por lo que puede realizarse en cualquier laboratorio. Con este modelo se han realizado estudios de:

1. Fisiopatología en hipertensión portal (9, 19, 128, 130, 133).
2. Secreción de bilis en diferentes estadios de cirrosis biliar secundaria (89).
3. Evaluación de fármacos (42), tales como tauroursodesoxicolato (90), furosemide, espironolactona (124, 128), colchicina, pentoxifilina y ácido ursodesoxicólico (129).

12.2.5. Limitaciones del Modelo Experimental de Cirrosis por Ligadura del Conducto Biliar (Colédoco).

Las limitaciones encontradas en este modelo, son básicamente las relacionadas al proceso de la cirugía:

- Sobredosis de anestesia.
- Complicaciones durante el desarrollo de la cirugía
- Infecciones provocadas por la cama del animal.
- Mortalidad mayor del 60 % después de la cirugía.

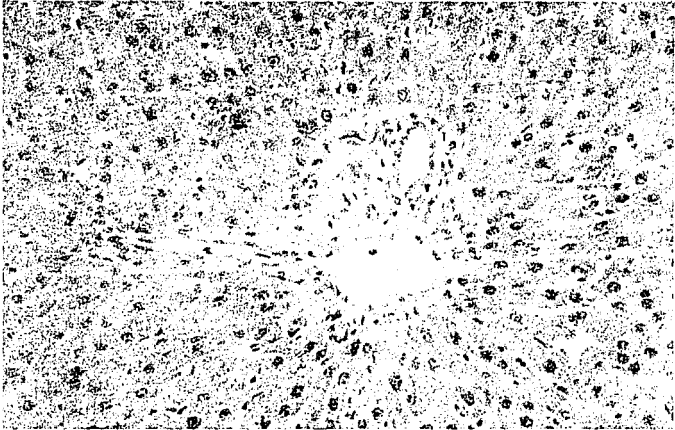


Figura 2. Histología normal del hígado: un espacio porta, una vena centrolobulillar y el lobulillo hepático.

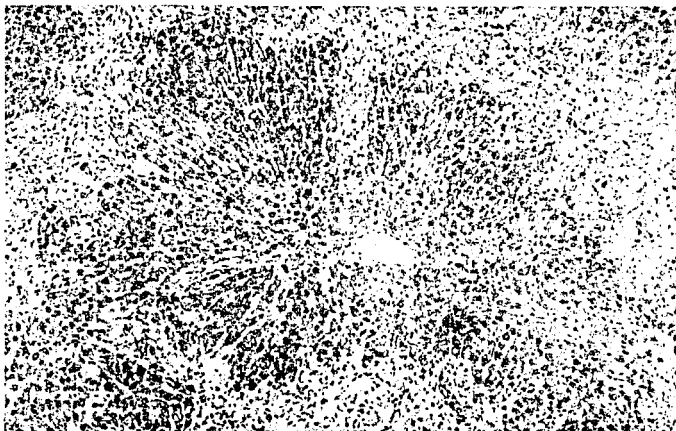


Figura 3. Imagen histológica de cirrosis biliar a 28 días de obstrucción.

CAPITULO II.
TRATAMIENTO DE LA ENCEFALOPATIA HEPATICA.

Las medidas terapéuticas en la encefalopatía hepática se dividen en generales y específicas.

1. MEDIDAS GENERALES: están destinadas a evitar factores precipitantes de la EH.

- 1.- Evitar el uso inadecuado de tranquilizantes y anestésicos (55, 182).
- 2.- Corrección del desequilibrio hidroelectrolítico (122).
- 3.- Corrección de la hemorragia gastrointestinal
- 4.- Evitar azotemia e ingestión excesiva de proteínas (156).
- 5.- Prevenir la infección (39, 44, 50).

2. MEDIDAS ESPECIFICAS: están diseñadas para reducir la absorción de sustancias nitrogenadas a nivel intestinal, o bien, corregir la neurotransmisión.

2.1. CATARTICOS Y ENEMAS.

El catártico más usado es la leche de magnesia $Mg(OH)_2$ y su objetivo es producir catarsis para disminuir la presencia de sustratos y productos nitrogenados a nivel colónico, producidos por la flora bacteriana. Aunque es efectivo tiene la desventaja de que su principal utilidad radica en pacientes con encefalopatía hepática grado I-II, ya que para utilizarse en pacientes con encefalopatía más avanzada, se requiere colocar una sonda nasogástrica (176).

2.2. ANTIBIOTICOS.

El objetivo de la administración de antibióticos es esterilizar el colon, para disminuir la cantidad de patógenos anaerobios principalmente y reducir la producción de amonio y sustancias nitrogenadas. Los antibióticos inabsorbibles como la neomicina, el metronidazol (111) y la kanamicina son los más recomendables ya que el efecto que se busca es local (151). Sin embargo, la neomicina y la kanamicina poseen efectos indeseables que pueden llegar a ser graves: ototoxicidad, nefropatía y malabsorción intestinal (66, 80)

2.3. DISACARIDOS.

Su principal acción es la de producir una diarrea ácido-osmótica y consecuentemente una disminución en la absorción de NH_3 . Entre estos se incluye la lactulosa, lactitol y en nuestro país la lactosa, dada la gran cantidad de habitantes que son intolerantes a la misma (172).

Los disacáridos no absorbibles como el lactitol, la lactulosa y la lactosa acidifican el contenido intracolónico permitiendo quelar el amonio en su forma ionizada y contribuyen a su excreción en las heces, de esta forma puede alterar la producción de toxinas que afectan al SNC del encefalópata. Sin embargo, son pobremente tolerados debido a que la diarrea es parte de su mecanismo de acción al aumentar el tránsito intestinal (170).

2.4. LACTULOSA.

La lactulosa (4-O-B-D-galactopirano-D-fructofuranosa) cuyo peso molecular es de 342 kD, se puede obtener como un derivado de la lactosa (azúcar de la leche) luego de calentarla en un medio alcalino. Debido a que es un producto sintético no existen en el intestino enzimas capaces de desdoblarla, sin embargo, una pequeña parte puede ser absorbida (27).

EFECTO SINERGICO

La lactulosa puede ser metabolizado por las bacterias colónicas y producir ácidos orgánicos que reducen el pH colónico y disminuyen el amonio que puede ser absorbido. Modifica la flora colónica reduciendo la cantidad de gérmenes anaerobios, principales productores de amonio.

La administración de lactulosa puede realizarse en forma de enemas o mediante sonda nasogástrica (86). La lactulosa presenta la ventaja de que su toxicidad clínica es muy reducida, sin embargo, no se encuentra disponible en México, además de que su costo es elevado.

2.5. LACTOSA.

La lactosa (4-O-B-D-galactopiranososa-D-glucopiranososa) es un componente normal de la leche. Es un monosacáridos de glucosa y otro de galactosa unidos por un enlace β -glicosídico. Antes de ser absorbida por el intestino, la lactosa debe ser hidrolizada por la lactasa, enzima que se localiza en el borde de cepillo del epitelio intestinal (82).

La leche de casi todos los mamíferos contiene lactosa, sin embargo, la mayoría de la población mundial es deficiente en lactasa. La ingestión de este azúcar produce intolerancia que se caracteriza por dolor abdominal, flatulencia y diarrea ácida (15), síntoma que semeja al inducido por la lactulosa y constituye la base teórica para utilizarlo en pacientes con encefalopatía hepática e intolerancia a la lactosa.

Se ha demostrado la efectividad terapéutica de la lactosa en pacientes con encefalopatía hepática crónica. En estudios realizados en el INN SZ (62) se encontró que la lactosa tuvo un efecto similar al de la lactulosa al reducir la generación de amonio y disminuir en orden de magnitud de dos logaritmos la flora anaeróbica de las heces. No es necesario que el paciente sea intolerante a la lactosa para suministrarle enemas de este compuesto, ya que en esta forma

de administración el disacárido alcanza el colon en forma directa.

Como efectos secundarios del uso de lactosa se presenta dilatación excesiva del colon, en algunas ocasiones hipernatremia (115) e hipomagnesemia y escoriación de la piel en la zona perianal debido al pH ácido producido por el metabolismo bacteriano de la lactosa.

2.5.1. Enemas de Lactosa.

El uso de lactosa en enemas no requiere que el paciente sea intolerante ya que mediante esta vía de administración alcanza directamente el colon. La lactosa en enemas ha demostrado ser tan eficaz como la neomicina en pacientes con coma hepático profundo. Los enemas con lactosa producen acidificación fecal (161).

2.6. LACTITOL.

Se trata de un disacárido de segunda generación (beta-galactósido-sorbitol). Este azúcar se produce fácilmente en forma químicamente cristalina y puede ser usado en forma de polvo por vía oral o en enemas. No es degradado ni absorbido en el intestino delgado, pero es metabolizado por bacterias del colon. Se ha demostrado su eficacia en el tratamiento de la EH crónica y aguda (164) y parece ser mejor tolerado que la lactulosa y la lactosa.

2.7. L-DOPA.

Su uso tiene como base la teoría de los falsos neurotransmisores (98, 108). Teóricamente L-Dopa puede corregir la inadecuada neurotransmisión y reducir las alteraciones mentales y motoras presentes en la encefalopatía hepática.

2.8. BROMOCRIPTINA.

Teniendo como hipótesis que los trastornos neurosiquiátricos presentes en la encefalopatía hepática, pueden deberse al menos en parte, a la interferencia de los falsos neurotransmisores, se ha pensado que la bromocriptina que es un agonista de la dopamina, puede mejorar la neurotransmisión dopaminérgica y por tanto restaurar el estado mental de los pacientes con encefalopatía hepática (110, 165, 166).

2.9. RESTRICCIÓN PROTEICA EN LA DIETA.

El exceso de proteínas de origen exógeno puede ocurrir cuando se consume una dieta rica en proteínas. La intoxicación endógena se puede presentar cuando hay hemorragia gastrointestinal, la cual favorece el depósito de grandes cantidades de proteínas dentro de la luz intestinal. Existe un gran número de investigaciones que demuestran que la elevación de proteínas produce aumento del amonio sanguíneo en pacientes con cirrosis hepática (18, 36, 156, 189). La restricción de proteínas animales ha mostrado mejorar el grado de encefalopatía hepática (172), por la disminución de los productos nitrogenados como el amonio, mercaptanos y AA aromáticos.

La eliminación de las proteínas de la dieta se realiza principalmente en el hígado, riñones, tubo digestivo y pulmones. El hígado, lleva a cabo la desaminación oxidativa de los aminoácidos, proceso que produce la mayor cantidad de amonio (105, 141).

2.10. DIETAS VEGETALES.

En diversos estudios se ha demostrado que las dietas con base en proteínas vegetales son mejor toleradas por los pacientes cirróticos. En estudios realizados en el Departamento de Gastroenterología del INN SZ (171) se ha

EFECTO SINERGICO

observado tolerancia de hasta 80 g/día de proteínas vegetales, con suplementos de soya, en pacientes cirróticos con EH crónica y mejoría de las manifestaciones de la EH (estado mental, EEG, asterixis y pruebas de conexión numérica).

Aunque no se conoce con precisión el mecanismo del efecto terapéutico de las dietas vegetales, se han propuesto los siguientes (65):

- Menor contenido de aminoácidos aromáticos: fenilalanina, tirosina, triptofano.
- Menor contenido de metionina y sus derivados: metanetiol, etanetiol y dimetilsulfóxido.
- Menor contenido de los aminoácidos con mayor capacidad de aumentar niveles de amonio en sangre ya que se metabolizan por procesos de desaminación: glicina, serina, treonina, glutamina, histidina, lisina y arginina.
- Capacidad de la dietas vegetarianas de alterar la flora bacteriana intestinal.
- Mayor contenido de fibra, la cual tiene efecto catártico disminuyendo el tiempo de permanencia fecal en el colon, evitando así la absorción de sustancias tóxicas.

Las desventajas de las dietas vegetarianas aunque pocas son importantes: son voluminosas y en ocasiones no agradables al gusto, lo que dificulta el cumplimiento de la dieta a largo plazo.

2.11.SUPLEMENTACION DE ZINC.

Una de las causas de daño en el ciclo de la urea se debe a que alguna de las enzimas involucradas en éste no funciona adecuadamente, por lo que el suministrar una sustancia que estimule estas enzimas como el zinc, puede ser

de gran utilidad para restablecer el ciclo de la urea (142).

2.12. ANTAGONISTAS DE LAS BENZODIACEPINAS.

Clínicamente se reportan casos anecdóticos y un estudio experimental en animales (67, 68, 88, 174) con el uso de flumazenil en encefalopatía hepática. Actualmente se están llevando a cabo múltiples estudios para demostrar su utilidad (104). Este fármaco tiene afinidad específica por el receptor de GABA/Benzodiacepina (BZ), desplazando al agonista del mismo y actuando como antagonista de las BZ. Sin embargo, como no se ha encontrado la cifra elevada de GABA en forma constante, se piensa que la actividad inhibitoria pudiera estar mediada por alguno de los otros péptidos mencionados que comparten la afinidad por el receptor GABA/BZ (101).

3. NUEVAS ALTERNATIVAS TERAPEUTICAS.

Entre los nuevos tratamientos empleados para mejorar los síndromes hiperamonémicos y la encefalopatía hepática, se encuentran el benzoato de sodio (BS) y la Ornitina-Aspartato (OA).

3.1. Benzoato de Sodio.

El BS ha sido exitosamente usado en niños con síndromes hiperamonémicos debidos a errores congénitos del ciclo de la urea o en pacientes cirróticos con encefalopatía portal sistémica.

La razón teórica para usar BS en hiperamonemia es promover la excreción del nitrógeno por una vía alterna considerando deficiente el ciclo de la urea en la cirrosis. El metabolismo del benzoato en mamíferos es mediante la conjugación con glicina para formar hipurato el cual es eficientemente eliminado por excreción urinaria.

3.1.1. Estructura Química.

El BS ($C_7H_5NaO_2$) es la sal sódica del ácido benzoico, tiene un peso molecular de 144.11. Es un polvo granular, cristalino, blanco, estable, inoloro, de sabor dulce y algo astringente (6).

El ácido benzoico se genera a nivel intestinal por bacterias que metabolizan al ácido quínico presente en frutas como la cereza, ciruela, arándano, chabacano, durazno, canela y clavo (4).

3.1.2. Uso Habitual.

El BS, se emplea en la industria alimenticia y farmacéutica como conservador y se encuentra ampliamente difundido en productos que van desde helados, gelatinas, conservas, carnes frías, bebidas y jarabes. Su pH es de 2.5 a 4.0, cuando se usa como conservador, la concentración varía entre 0.05% a 0.1%, equivalente a 3-7 mM/L de BS. Su uso actual es tan amplio que podría afirmarse que una persona que habita en zonas urbanas consume de 0.5 a 1 g de benzoato de sodio al día (35).

3.1.3. Metabolismo.

La principal vía de metabolismo del BS, es la conjugación con glicina que da lugar a la formación de hipurato el cual se excreta en la orina.

La formación de hipurato a partir de ácido benzoico más glicina, se realiza básicamente en la matriz mitocondrial de los hepatocitos. Por cada molécula de hipurato se consumen dos moléculas de ATP. El proceso requiere además de consumo de oxígeno exógeno. Las enzimas que participan en la síntesis de hipurato son: la benzoil-Co A sintetasa, la glicina-n-acetil-transferasa y la benzoil-Co A hidrolasa. El paso limitante es la disponibilidad de Co A, que depende de la actividad de la vía de la β -oxidación (60) y de glicina.

EFECTO SINERGICO

Como se observa en la figura 4, el BS se combina con la Co A formando benzoyl-Co A. La adición de la glicina a la benzoyl-Co A da lugar al ácido hipúrico, el cual sale de la mitocondria para ser eliminado por vía renal.

El BS por vía oral se ha utilizado en pacientes con encefalopatía hepática (106). En el Departamento de Gastroenterología del INN SZ se llevó a cabo un estudio para valorar la eficacia y tolerancia de este producto en pacientes con encefalopatía hepática grado I-II ambulatorios, por vía oral. Los resultados fueron muy satisfactorios al compararlo contra lactulosa, mostrando mejoría significativa en el índice de encefalopatía. Se observó como era de esperarse de acuerdo al mecanismo sugerido, disminución de las cifras de amonio con eliminación de hipurato en orina. Sin embargo, los valores de glicina se mantuvieron normales (167).

En estudios realizados en pacientes con síndromes hiperamonémicos (14), el único efecto colateral fue el de náuseas y vómitos. Estudios llevados a cabo en ratas empleando dosis de más de 400 mg/kg disminuyen el crecimiento por utilización de glicina, este efecto es reversible con la administración de la misma (16). La administración de dosis superiores a 500 mg/kg produce paradójicamente elevación del amonio, con una mortalidad incluso del 90 % (117, 118). Este efecto se ha explicado por la excesiva formación de benzoyl-Co A con la consiguiente depleción de acetyl-Co A, de la formación de n-acetilglutamato y por lo tanto de la activación del ciclo de la urea.

In vitro, se ha observado que el benzoato puede desplazar a la bilirrubina de la albúmina, por lo cual es un riesgo en niños pequeños al producir kernicterus, aunque nunca se ha visto *in vivo* (64).

Hasta el momento se puede concluir que el BS es un medicamento eficaz y seguro por vía parenteral, siempre y cuando no se sobrepase la dosis de 100 mg/kg ó 10 g/día.

EFEECTO SINERGICO

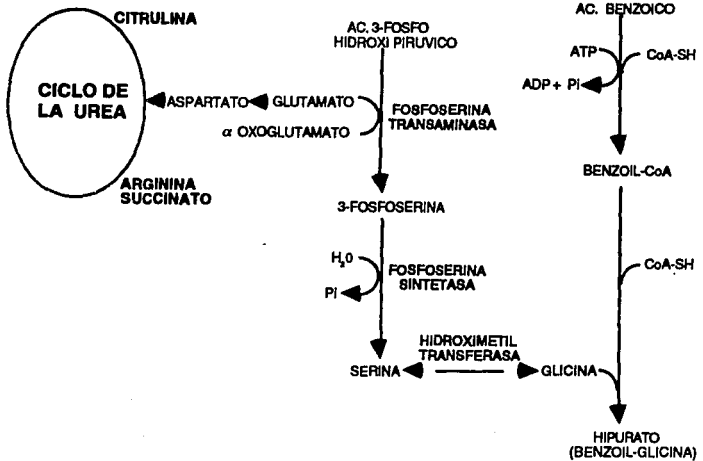
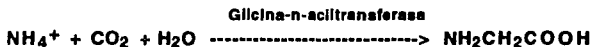


Figura 4. Vía Hipotética de Metabolismo del Benzoato de Sodio.

3.1.4. Mecanismo de Acción.

El BS al conjugarse con la glicina se une al átomo de nitrógeno de la glicina y se excreta como hipurato en orina. Se elimina así una cantidad equimolar de nitrógeno por cada molécula de BS administrada (127) y esto a su vez disminuye la poza metabólica de glicina que para aumentar su síntesis utiliza el amonio circulante a través de la reacción:



disminuyendo así la concentración de amonio circulante y las manifestaciones clínicas de la encefalopatía hepática (71).

Así, el BS permite la utilización de una vía alterna de excreción de nitrógeno urinario diferente a la de la urea, mediante la conjugación de la glicina al ácido benzoico y su excreción en forma de hipurato (Figura 5).

EFEECTO SINERGICO

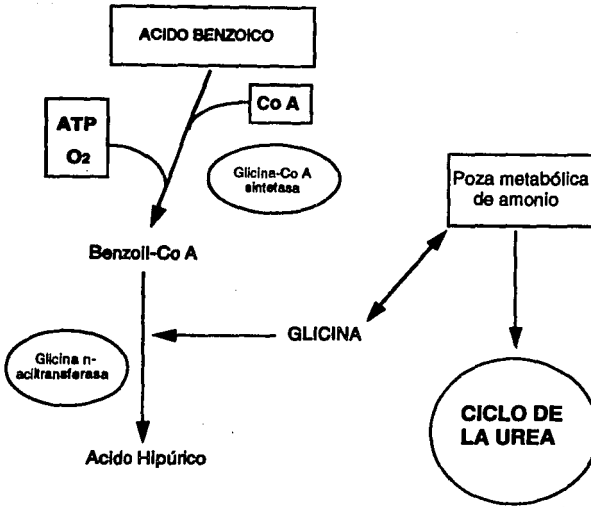


Figura 5. Mecanismo de acción del Benzoato de Sodio

3.1.5. Rango de Eliminación del Acido Hipúrico.

El hipurato es un compuesto que se elimina fácilmente por orina ya que su depuración renal es de 5 veces el promedio de filtración glomerular. Se ha reportado que en sujetos sanos después de la administración oral de 10 g de BS, el 23.9 % se convierte en hipurato luego de las dos primeras horas, el 59.9% a las cuatro horas y el 86.8 % a las seis horas (94).

En estudios realizados por Quick en 1933 (134, 135), se encontró que el ácido hipúrico se elimina por orina en forma constante aunque se tengan concentraciones elevadas de BS, lo que demuestra que la reacción no depende de la concentración de sustrato endógeno, pues cuando se administran 2 g en forma i.v., la eliminación dentro de la primera hora es de aproximadamente el 75% y a las dos horas, se elimina el 25 % restante. Es decir, que la eliminación de hipurato se realiza en forma constante aunque se tengan concentraciones mayores de BS, sugiriendo un sistema saturable.

En un estudio donde se administraron 6 gr de BS (135) a diferentes personas con hepatopatías, se midió durante 4 horas la eliminación de ácido hipúrico y se observó que en pacientes con cirrosis e insuficiencia hepática, la eliminación fue de únicamente 37-40% y en personas normales con la misma dosis, se eliminaron de hasta 5 g de ácido hipúrico, es decir, por lo menos el 75% de las dosis administradas como BS. Recientemente se ha vuelto a utilizar como prueba de funcionamiento hepático en forma intravenosa (5).

En otro estudio realizado en el INN SZ (32) se encontró que aquellos pacientes con mayor deterioro de la función hepática en base a la clasificación Child, tenían una menor excreción de hipurato en orina. Por lo tanto, en base a los anteriores estudios se requeriría de aproximadamente 2.5 g en forma i.v. cada 6 horas para mantener el sistema enzimático de síntesis de hipurato saturado en pacientes con insuficiencia hepática, lo que equivaldría aproximadamente a una concentración de 2-4 nM, que representa los niveles

terapéuticos en plasma.

3.2. Ornitina-Aspartato.

Ornitina-Aspartato estimula la eliminación de amoníaco incrementando la síntesis de urea. Aumenta la capacidad de desintoxicación tanto en el hígado como en tejido extrahepático, mejorando el equilibrio energético, normalizando la función alterada del hígado y promoviendo la regeneración de las células hepáticas.

3.2.1. Estructura Química.

La ornitina-aspartato ($C_9H_{19}N_3O_6$) cuyo nombre químico es (S)-2,5-ácido diaminovalerianico-(S)-2-aminosuccinato, es la sal estable de los aminoácidos naturales ornitina y ácido aspártico. Tiene un peso molecular de 265,3 KDa y una apariencia blanca cristalina, es inolora y posee un sabor metálico.

La ornitina es un aminoácido no proteico que funciona como transportador de los átomos de carbono y nitrógeno en el ciclo de la urea, puede ser sustrato o producto de 5 reacciones enzimáticas y es el ligando del transporte proteico mitocondrial. Proviene principalmente de la arginina en las proteínas de la dieta, pero en circunstancias especiales puede sintetizarse de novo.

El aspartato es un aminoácido no esencial de cuatro carbonos, sirve como puente para unir el ciclo de la urea con el ciclo de los ácidos tricarbónicos (CAT), se activa metabólicamente por transaminación con los ácidos dicarboxílicos tetracarbonados del CAT. Interviene en reacciones en la síntesis de urea y de purinas como donador de grupos amino además de funcionar

EFEECTO SINERGICO

como precursor de anillos pirimidínicos a través de la formación de carbamil-aspartato en el citosol .

3.2.2. Uso Habitual.

Este compuesto interviene en cuatro eventos: en el ciclo de la urea, en la biosíntesis de las poliaminas, en la síntesis de creatina y en la reacción de ornitina- α -aminotransferasa (173).

Dentro de las contraindicaciones se encuentran trastornos acentuados de la función renal (insuficiencia renal), tomándose como valor de referencia un nivel de creatinina sérica superior a 3 mg/100 mL. Los efectos secundarios debido a la administración de este medicamento, se desconocen hasta ahora (107).

3.2.3. Metabolismo.

Los dicarboxilatos solos y combinados con ornitina, se han implicado en la patogénesis de estados hiperamonémicos. Ornitina, aspartato y sus sales estables ornitina-aspartato (OA) han mostrado un efecto benéfico al disminuir la concentración de amonio plasmático en animales (12, 145, 186) y ensayos clínicos (76, 78, 113). Funciona como un sustrato crítico para que se lleve a cabo la ureagénesis y la síntesis de glutamina, que pueden actuar como vías alternas de eliminación del amonio (87).

El efecto de la OA en la eliminación del amonio se mejora en el hígado donde hay formación diaria de 1.5 kg de urea mediante el ciclo de Krebs, en cerebro se forma 1.0 kg y en músculo 25 kg. Existe acoplamiento de amoníaco con ácido α -cetoglutámico a partir del ácido glutámico hasta glutamina por medio de la glutamina sintetasa. Una posible explicación para la efectividad de la terapia de largo término con OA es el posible retorno del funcionamiento de la

masa sin aumentar el tamaño hepático (111).

3.2.4. Mecanismo de Acción.

La acción de la OA en la encefalopatía hepática está basada hipotéticamente en dos mecanismos. Por un lado, los compuestos dicarboxilados como el aspartato estimulan a la glutamina sintetasa, enzima que se encuentra en los hepatocitos perivenosos y cuya actividad en enfermedades hepáticas agudas y crónicas solo trabaja a un 20% de su capacidad (84). Alternativamente, la ornitina junto con la carbamilfosfato sintetasa estimulan la síntesis de urea en los hepatocitos periportales. Ambas rutas contribuyen a la eliminación del amonio, aunque también participan para el mismo fin los mecanismos extrahepáticos (músculo, etc.) que dependen del volumen del flujo de sangre porto caval (Figura 6) (87).

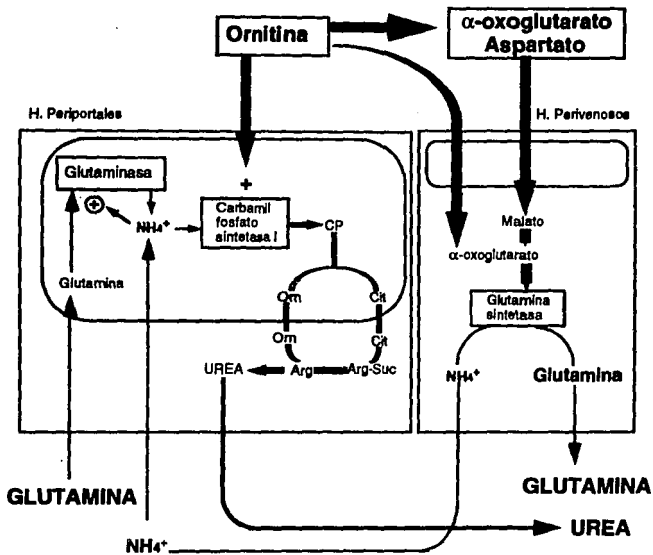


Figura 6. Mecanismo de acción de Ornitina-Aspartato

3.3. Bases Teóricas de la Combinación BS + OA.

La forma de acción del Benzoato de sodio para reducir los niveles de amonio sanguíneo en mamíferos, se origina por su capacidad de conjugación con compuestos nitrogenados como la glicina o el glutamato que inducen la excreción urinaria como ácido hipúrico. Por cada molécula de Benzoato de sodio que se administre, se elimina una cantidad equimolar de nitrógeno, lo que disminuye la poza metabólica de glicina, que para restablecer su síntesis utiliza amonio circulante, lo que reduce los niveles de la hiperamonemia y por tanto las manifestaciones clínicas de la encefalopatía hepática (71).

Häussinger et al (61), han especulado que el benzoato de sodio puede activar una vía alterna de eliminación del amonio en células perivenosas, tal vez mediante la formación y liberación de glutamato en lugar de glutamina, lo que puede estimular el intercambio glutamato/benzoato.

La Ornitina-Aspartato estimula la incorporación del amonio dentro del ciclo del ácido cítrico, disminuyendo los niveles del amonio circulante. Este medicamento funciona como un sustrato crítico tanto para la ureogénesis y la síntesis de glutamina, que pueden actuar como vías alternas de eliminación del amonio (87). Hipotéticamente podría existir una vía más de excreción amoniaca que pueda potenciar el incremento en las concentraciones de hipurato, mediante una vía alterna en la formación de orotato o de glicina.

Este compuesto estimula dos vías más: la ornitina se combina con la carbamilo fosfato sintetasa I, que en conjunto con la captación del amonio circulante, promueven la síntesis de urea en los hepatocitos periportales y en menor grado en los perivenosos.

En los hepatocitos perivenosos, la ornitina sufre transaminación y como α -cetoglutarato, puede combinarse con sustancias dicarboxiladas como el

EFEECTO SINERGICO

aspartato, el malato o el benzoato para estimular a la glutamina sintetasa, que durante las enfermedades hepáticas agudas y crónicas se encuentra trabajando a un 20% de su capacidad, para formar glutamina (87).

CAPITULO III
JUSTIFICACION Y OBJETIVOS DEL ESTUDIO.

1. JUSTIFICACION DEL ESTUDIO.

La elevada cantidad de enfermos con encefalopatía hepática y en general con cirrosis hepática son un grave problema de salud pública en nuestro país. Se ha calculado que en la República Mexicana existen de 100,000 a 200,000 pacientes cirróticos de los cuales 17,000 mueren cada año. Aproximadamente una tercera parte de ellos presenta encefalopatía hepática y el resto la desarrollará en el curso de la enfermedad. En nuestro país la causa más frecuente de cirrosis hepática es la ingesta de alcohol, seguida de las infecciones de origen viral.

Se han desarrollado diversos tratamientos enfocados a combatir la cirrosis y la encefalopatía hepática, ya sea disminuyendo los factores que se encuentran elevados (amonio, principalmente) o incrementando aquellos que estén disminuidos (zinc). El problema es que no todos los pacientes responden adecuadamente a los tratamientos convencionales, por esta razón es deseable contar con alternativas útiles y seguras para uso clínico.

El benzoato de sodio es una buena opción de tratamiento. Sin embargo, la intolerancia a su sabor y los informes de toxicidad observados en algunos modelos experimentales (117) nos obligan a evaluar la seguridad de la administración a dosis bajas (similares a las utilizadas en pacientes) tanto en ratas control como en ratas cirróticas hiperamonémicas (118).

Por otro lado, algunos datos tanto clínicos (76, 78, 113) como experimentales (12, 145, 186) muestran que el uso de ornitina-aspartato representa una forma alterna de excreción de amonio que clínicamente es fácilmente aceptable.

EFEECTO SINERGICO

Dado que ambos fármacos por si solos no presentan efectos secundarios cuando se usan en dosis bajas, creemos que la combinación de ambos podría presentar un efecto sinérgico dando como resultado una fórmula más adecuada para el tratamiento de la encefalopatía hepática.

2. OBJETIVO GENERAL.

Conocer la eficacia de la combinación de benzoato de sodio y ornitina-aspartato administrados a ratas con cirrosis hepática para disminuir los niveles de hiperamonemia.

2.1 Objetivos Específicos.

-Mejorar los esquemas terapéuticos empleados para disminuir la posible hiperamonemia en ratas cirróticas.

-Evaluar el efecto de la administración simultánea de benzoato de sodio y ornitina-aspartato sobre las concentraciones de amonio plasmático e hipurato urinario en un modelo animal de cirrosis hepática.

-Investigar los posibles efectos que la administración conjunta de benzoato de sodio y ornitina-aspartato pudieran presentar sobre las concentraciones de amonio plasmático e hipurato urinario en ratas cirróticas.

-Cuantificar el grado de eliminación de benzoato de sodio y ornitina-aspartato, de acuerdo a la función hepática.

3. HIPOTESIS.

La combinación benzoato de sodio/ornitina-aspartato, es una opción terapéutica que puede potenciar su efecto sobre las concentraciones de NH_4^+ plasmático y puede disminuir en forma más efectiva los niveles de amonio sanguíneo en un modelo animal de cirrosis.

CAPITULO IV METODOLOGIA

Este trabajo fue realizado en la Clínica de Hígado del Departamento de Gastroenterología, en el Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán.

Las ratas fueron adquiridas del Bioterio del Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán.

1. MATERIALES

1.1. Reactivos.

Los reactivos empleados en este trabajo fueron los siguientes: alcohol absoluto (Merck), benzoato de sodio (Merck), ornitina-aspartato granulado (Hepa-Merz), ornitina-aspartato ampollitas (Hepa-Merz), éter anhidro (Merck), p-Dimetil-Amino-Benzaldehído (DAB), piridina (Sigma Chemical Co), cloruro de sodio (JT Baker), ácido clorhídrico 6N, acetato de etilo (Sigma de México), ácido acético (JT Baker), ácido hipúrico (Sigma de México), anhídrido acético (Sigma de México), equipo de bilirrubina Merckotest (Merck México No. de cat. 3333), kit reactivo comercial de amonio (Sigma Diagnostics No. de Cat 170-3), kit de reactivos para amonio (Sigma Diagnostics No. de Cat 170-10), solución de reactivo de L-Glutamato deshidrogenasa (Sigma Diagnostics No. de Cat 170-4), solución de reactivo de controles de amonio (Sigma Diagnostics No. de Cat 170-5).

1.2. Material Biológico.

Se usaron ratas macho de la cepa Wistar con un peso promedio de 200 ± 20 g. Se dividieron en dos grupos experimentales:

- a) Ratas con ligadura del conducto biliar.
- b) Ratas control.

El material de microcirugía utilizado incluyó seda 2-0, pinzas Addson, tijeras Metzenbaum, tijeras tenotomía, pinzas iris rectas, pinzas iris curvas, pinzas de joyero, pinzas de mosquito, pinzas de Satinsky y portaguas Castroviejo.

2. METODOS.

2.1. Método para Inducir Cirrosis.

Se estudiaron 45 ratas macho de la cepa Wistar, a 40 de ellas se les realizó ligadura del conducto biliar y 5 fueron utilizadas como controles normales. La ligadura de conducto biliar se realizó por el modelo modificado de Lee S.S. (92).

Las ratas se anestesiaron con éter anhidro, realizando una laparotomía media, el conducto biliar fue expuesto y ocluido por debajo de la unión de los ductos hepáticos (distal) y por encima de la entrada del conducto pancreático (proximal). El conducto biliar fue seccionado entre las dos ligaduras y la incisión abdominal fue cerrada con sutura quirúrgica absorbible (catgut crómico 00).

Las ratas se mantuvieron en jaulas metabólicas durante cinco días previos al tratamiento. Los animales se mantuvieron con agua y alimento Laboratory rodent diet 5001.

Para la evaluación de orina se colectaron muestras de 8 horas. Las variables de interés fueron: volumen urinario, pH urinario, urea e hipurato urinario.

El peso de los animales fue medido antes y después del estudio. Al término de éste, las ratas se sacrificaron por exanguinación mediante punción cardíaca y la sangre se colectó en dos tubos de ensayo: uno con heparina sódica para determinación de amonio y otro sin anticoagulante para obtención

EFFECTO SINERGICO

de suero. Las pruebas de funcionamiento hepático fueron: transaminasa glutámico oxaloacética, transaminasa glutámico pirúvica, bilirrubinas totales, bilirrubinas directas y fosfatasa alcalina.

3. DISEÑO EXPERIMENTAL.

El estudio se realizó con 45 ratas macho tipo Wistar que se distribuyeron en diversos grupos (ver Tabla 3).

Las ratas se dividieron al azar en 8 grupos experimentales que recibieron una sola dosis de los diferentes tratamientos, por dos vías: oral o intravenosa. grupo adicional de ratas normales (sin operación ni tratamiento), fue considerado como control (Grupo I); el resto se dividieron como sigue: Grupo II= fue operado y no recibió tratamiento. Grupo III= fue operado y recibió una dosis oral (mediante cánula) de 0.2 mL de Benzoato de sodio (500 mg/kg). Grupo IV= fue operado y recibió una dosis oral de 0.2 mL de Ornitina-Aspartato (20 mg/mL). Grupo V= fue operado y recibió una dosis oral de 0.2 mL de la combinación Benzoato de sodio/Ornitina-Aspartato (500 mg/kg + 20 mg/mL). Grupo VI= fue operado y recibió una dosis de 0.4 mL de la combinación Benzoato de sodio/Ornitina-Aspartato (500 mg/kg + 20 mg/mL). Grupo VII= fue operado y recibió una dosis de 0.6 mL de la combinación Benzoato de sodio/Ornitina-Aspartato (500 mg/kg + 20 mg/mL). Grupo VIII= fue operado y recibió una dosis intravenosa de 0.15 mL de Ornitina-Aspartato (100 mg/mL). Grupo IX= fue operado y recibió una dosis intravenosa (en la vena lateral de la cola), de 0.30 mL de Ornitina-Aspartato (100 mg/mL).

Grupo	oral							i.v.	
	I n=5	II n=9 S/Tx	III n=5 (0.2mL)	IV n=4 (0.2mL)	V n=4 (0.2mL)	VI n=5 (0.4mL)	VII n=5 (0.6mL)	VIII n=4 (0.15mL)	IX n=4 (0.30mL)
Operación	-	+	+	+	+	+	+	+	+
BS	-	-	+	-	+	+	+	-	-
OA	-	-	-	+	+	+	+	+	+

Tabla 3. Grupos experimentales

EFFECTO SINERGICO

Las ratas control permanecieron el mismo tiempo que las ratas con cirrosis en jaulas metabólicas.

Para evaluar el efecto del benzoato de sodio y ornitina-aspartato, se administró uno u otro medicamento a los grupos III y IV respectivamente. Para probar nuestra hipótesis, fueron empleadas tres diferentes dosis de la combinación de ambos medicamentos a los grupos V, VI y VII, buscando además un efecto dosis-dependiente. Finalmente, para evaluar la vía de administración del medicamento, se suministró ornitina-aspartato a los grupos VII y IX, también esperando observar una respuesta dosis-dependiente. No se empleó benzoato de sodio en forma i.v. por no tener este fármaco en tal presentación.

4. METABOLISMO NITROGENADO.

4.1. Determinación de Amonio Plasmático.

Se empleó un método enzimático, utilizando un equipo comercial completo para la determinación de amonio (Sigma Diagnostics).

Fundamento: se basa en la aminación reductiva de 2-oxoglutarato, empleando deshidrogenasa glutamina (GLDH) y nicotinamida adenina dinucleótida reducida (NADH) de la siguiente forma:



La oxidación del NADH produce una disminución en la absorbancia a 340 nm que es proporcional a la cantidad de amonio presente en la muestra. Una mol de NADH se oxida por cada molécula de amoníaco presente en el plasma (137).

EFFECTO SINERGICO

Se empleó un equipo comercial completo para la determinación de amonio (Beckman Instruments). El método se basa en los siguientes puntos:

1. Leer la absorbancia inicial a 340 nm de cada una de las celdillas contra blanco de agua o solución de dicromato de potasio como referencia.
2. Agregar 0.02 mL de la enzima (L-Glutamato Deshidrogenasa)
3. Mezclar por inversión y contar 5 minutos con el cronómetro
4. Hacer una segunda lectura

Cálculos

BLANCO = DOB inicial - DOB final

CONTROL = DOC inicial - DOC final

PRUEBA = DOP inicial - DOP final

$$\text{AMONIO (ug/dL)} = (\text{PRUEBA} - \text{BLANCO}) \times 44 \times 100$$

$$\text{Factor 44} = \frac{3.22 \times 17}{6.22 \times 0.2}$$

3.22 = Volumen del líquido en la celdilla

17 = Peso en ug de 1 umol de amonio

6.22 = Absorbancia milimolar de NADH a 340 nm

0.2 = Volumen (mL) de la muestra

En la determinación de amonio se utilizó plasma a 4°C, las muestras se trabajaron dentro de la primera hora después de la extracción. Previo a las determinaciones se realizó una curva de calibración con diferentes concentraciones de amonio desde 10 µg/dL hasta 1000 µg/dL hallando una buena linealidad en este rango (10-1000 µg/dL) con una buena correlación de $r^2 = 0.98$.

EFEECTO SINERGICO

4.2. Determinación de Hipurato en Orina.

Se realizó mediante un método colorimétrico en el cual se extrae el ácido hipúrico de la orina con acetato de etilo.

Fundamento: el ácido hipúrico reacciona con la p-dimetilaminobenzaldehído (DAB), produciendo un color amarillo verdoso que es proporcional a la concentración de ácido hipúrico en la orina, con un pico de absorción a 458 nm.

La extracción del ácido hipúrico en la orina se realiza de la siguiente manera:

1. Agregar a cada tubo 20 mg de cloruro de sodio.
2. Colocar 100 μ l de orina.
3. Añadir 10 μ l de ácido clorhídrico 6N.
4. Agregar 1 ml de acetato de etilo.
5. Agitar por 60 segundos.
6. Dejar en reposo por 15 minutos.
7. Tomar una alícuota de 0.1 mL de acetato de etilo.
8. Transferir a un tubo de prueba de 20 mL y evaporar hasta secar bajo reducción de presión.

Posteriormente se desarrollará el color:

9. Tomar 100 μ l de sobrenadante.
10. Añadir 1 ml de anhídrido acético
11. Agregar 2 ml de p-dimetilaminobenzaldehído al 5% en piridina.
12. Colocar el tubo con la muestra en baño María de 40°C por una hora.
13. Realizar lecturas de absorbancia a 458 nm contra un blanco con anhídrido acético, DAB y piridina.

Cálculos:

Utilizando una curva de calibración de absorbancia de ácido hipúrico contra concentración (mg/dL) se calculó la concentración del ácido hipúrico en

EFEECTO SINERGICO

cada muestra, por interpolación de la absorbancia de los experimentales en la curva de calibración.

Para la determinación de hipurato urinario se colectó orina de 8 horas. Las orinas se conservaron a -10°C y se utilizó ácido acético concentrado, como conservador. La curva de calibración se realizó usando concentraciones desde 10 hasta 100 mg/dL que se prepararon a partir de una solución madre de hipurato de 100 mg/dL en acetato de etilo. A estos tubos se les desarrolló solamente el segundo paso (desarrollo de color, como lo describe la técnica). Por el método de color hubo una recuperación del 85 al 97% de hipurato que se adicionó a una orina seleccionada al azar con una concentración de hipurato conocida. Los resultados se expresan como mg/vol (121, 135, 163).

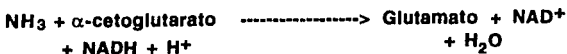
5. ESTUDIOS CONVENCIONALES.

5.1. Determinación de Urea en Orina.

La determinación de urea en orina se realizó por un método enzimático.

Fundamento: en esta reacción la urea es hidrolizada por la ureasa a amonio y dióxido de carbono. La glutamato deshidrogenasa (GDH), cataliza la condensación de amonio y α -cetoglutarato a glutamato con la concomitante oxidación de β -nicotinamida adenina dinucleótido reducido (NADH) a β -nicotinamida adenina dinucleótido (NAD). Los resultados se expresan en mg/dL.

La reacción que se lleva a cabo es la siguiente:



Flujo urinario:

El flujo urinario (mL/min) se calculó por medio de la siguiente fórmula:

$$\text{Flujo Urinario} = \frac{\text{volumen urinario (mL)}}{1440}$$

Donde:

Volumen urinario = 8 horas de recolección de orina.

1440 = constante (min/día).

5.2. Determinación de Bilirrubinas (Total y Directa).

La bilirrubina forma con el ácido sulfanílico diazotado un clorato azoico que en solución neutra es rojo y en solución alcalina azul. El glucurónido de bilirrubina hidrosoluble reacciona directamente, mientras que la bilirrubina indirecta libre reacciona tan solo en presencia de un catalizador.

Fundamento: la bilirrubina total en suero o plasma se determina mediante su reacción con ácido sulfanílico diazotado tras la adición de cafeína, benzoato de sodio y acetato de sodio. Con la solución II alcalina de Fehling se forma azobilirrubina azul, cuyo contenido puede determinarse también en presencia de subproductos amarillos (coloración mixta verde) de manera selectiva por fotometría a 578 nm. La bilirrubina directa se mide sin adición de álcali como colorante azoico rojo a 546 nm. La bilirrubina indirecta se obtiene de la diferencia entre bilirrubina directa (81, 146).

Técnica de la Bilirrubina Total:

1. Pipetear en un tubo de ensaye: 0.2 mL de ácido sulfanílico, una gota de nitrito de sodio, 1.0 mL de acelerador y 0.2 mL de suero.
2. Mezclar y dejar reposar 10 a 60 minutos a temperatura entre 15 y 25°C.
3. Añadir la solución II de Fehling 1.0 mL.

4. Mezclar y medir las extinciones de los problemas al cabo de 5 a 30 minutos contra agua destilada y en caso necesario contra blanco, filtro de 578 nm. Para el tubo blanco se añade lo mismo excepto el nitrito de sodio.
5. Si las extinciones exceden de 1 debe diluirse el suero (1:6) con solución salina fisiológica y multiplicarse por 6 el resultado obtenido.

Cálculos:

Medición sin blanco: concentración de bilirrubina total
(E - 0.015) x 10.5 mg/100 mL

Medición frente a un blanco:

E x 10.5 mg/100 mL

E x 180 umg/L

Técnica de la Bilirrubina Directa:

1. Pipetear en un tubo de ensaye: 0.2 mL de ácido sulfanílico, una gota de nitrito de sodio, 2.0 mL de solución salina fisiológica y 0.2 mL de suero. El blanco lleva lo mismo excepto el nitrito de sodio.
2. Mezclar inmediatamente y dejar reposar a temperatura ambiente entre 15 y 25°C. A los 5 minutos exactos, tras la adición del suero, medir las extinciones de los problemas contra el blanco.

Cálculos:

Concentración de bilirrubina directa :

E x 14.0 mg/100 mL

E x 240 umol/L

5.3. Determinación de Transaminasas Séricas.

Ambas transaminasas normalmente son detectadas en el suero mediante espectrofotometría (8, 139).

EFEECTO SINERGICO

Técnica para la Transaminasa Glutámico Oxaloacética (TGO):

1. Reconstituir el reactivo con agua destilada, mezclando suavemente para obtener una solución completa. No agitar para disolver.
2. Agregar agua destilada a una cubeta limpia. Colocar la cubeta en el espectrofotómetro y ajustar la lectura de la absorbancia a 0.
3. Agregar 3 mL del reactivo a la cubeta limpia y seca, calentar a temperatura de reacción.
4. Agregar 0.20 mL de la muestra a la cubeta y mezclar completamente. Incubar la solución durante 90 segundos exactamente.
5. Leer la absorbancia y registrarla.
6. Continuar la incubación y registrar la lectura cada minuto exactamente en un período de 2 minutos para establecer el cambio de absorbancia por minuto.

Técnica para la Transaminasa Glutámico Pirúvica (TGP):

1. Agregar agua destilada a una cubeta limpia. Colocar la cubeta en el espectrofotómetro y ajustar la lectura de la absorbancia a 0.
2. Agregar 0.2 mL de la muestra a la cubeta y mezclar completamente. Incubar la solución durante 30 a 60 segundos exactamente.
3. Hacer la lectura inicial de la absorbancia y registrarla.
4. Continuar la incubación y registrar la lectura cada minuto exactamente, para establecer el cambio de absorbancia por minuto.

Cálculos:

Una unidad de actividad es la cantidad de enzima que produce un micromol de NAD por minuto bajo las condiciones que se especifican en el procedimiento de ensayo. La actividad tanto de TGO como de TGP, se calculan de la siguiente manera:

$$\text{TGO o TGP (U/L)} = \frac{A/\text{min} \cdot V_t \times 100}{\text{Absorb} \cdot V_s}$$

Donde: V_t = Volumen total = 3.2 mL

V_s = Volumen de la muestra = 0.2 mL

Absorbancia = Coeficiente de absorción milimolar de NADH a 340 nm = 6.22

$$\text{TGO/TGP(U/L)} = \frac{A/\text{min} \times 3.2 \times 1000}{6.2 \quad 0.2} = A/\text{min} \times 2572$$

5.4. Determinación de Fosfatasa Alcalina (FA).

Las fosfatasas alcalinas catalizan la hidrólisis de una amplia variedad de ésteres de ácido fosfórico fisiológicos y no fisiológicos en medio alcalino. Su detección se lleva cabo mediante un método espectrofotométrico.

Fundamento: utilizando el β -glicerolfosfato como sustrato, en sangre. Este método requiere que se mida el ritmo de liberación del fosfato endógeno. La presencia del grupo hidroxil-alcohol que funciona como un aceptor de fosfatos, acelera la reacción de FA. El reactivo de FA (amortiguador CO_3) se formula como reactivo de un solo componente y contiene Monitol como aceptor de fosfatos (85, 177).

Técnica:

1. Agregar agua destilada a una cubeta limpia. Colocar la cubeta en el espectrofotómetro y ajustar la lectura de la absorbancia a 0.
2. Agregar 3.0 mL del reactivo a la cubeta limpia, seca y calentar a temperatura de reacción.
3. Agregar 0.100 mL de la muestra a la cubeta y mezclar completamente.
4. Colocar la cubeta en el espectrofotómetro inmediatamente.
5. Hacer la lectura de absorbancia al minuto 1, 2 y 3.

EFFECTO SINERGICO

6. Determinar el cambio de absorbancia por minuto, el cual deberá mantenerse por lo menos 2 minutos.

Cálculos:

La actividad de FA se calcula como sigue:

$$FA (UL/1) = \frac{A/\text{min} \times V_t \times 100}{\text{Absorbancia } V_s}$$

Donde: V_t = Volumen total = 3.10 mL

V_s = Volumen de la muestra = 0.10 mL

Absorbancia = Coeficiente de absorción milimolar de p-nitrofenol a 4 nm = 18.8

$$FA (UL/1) = \frac{A/\text{min}}{18.8} \times \frac{3.10}{0.10} \times 100 = A/\text{min} \times 1649$$

6. ANALISIS ESTADISTICO.

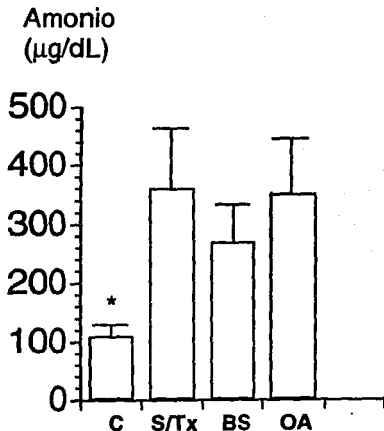
Los resultados se analizaron en una computadora Macintosh Classic usando un programa Stat View. Se utilizaron pruebas de análisis de varianza (ANOVA) para comprobar si se presentaban diferencias entre los grupos. Debido a que este análisis reveló diferencia significativa entre los grupos, fue necesario realizar otro análisis, por lo que se utilizó el método de U-Mann Withney. Mediante estos valores se puede observar que los grupos experimental difieren del grupo control. Los datos obtenidos son expresados como el Promedio \pm Desviación Estándar tomando un valor de $p < 0.05$ como significativo (175).

CAPITULO V

RESULTADOS

1. Efecto del Benzoato de sodio 0.2 mL y Ornitina-Aspartato 0.2 mL oral, sobre los niveles de amonio sanguíneo.

La administración del Benzoato de sodio en dosis bajas, mostró disminución no significativa en los niveles de amonio plasmático cuando se comparó con el grupo que no fue tratado (270 ± 60 vs 360 ± 101 , $p > 0.05$). Cuando se analizó el grupo que recibió Ornitina-Aspartato 0.2 mL con respecto al grupo sin tratamiento, tampoco se observó disminución significativa en las concentraciones de amonio en sangre (352 ± 90 vs 360 ± 101 , $p > 0.05$).



C = Control

S/Tx = Sin Tratamiento

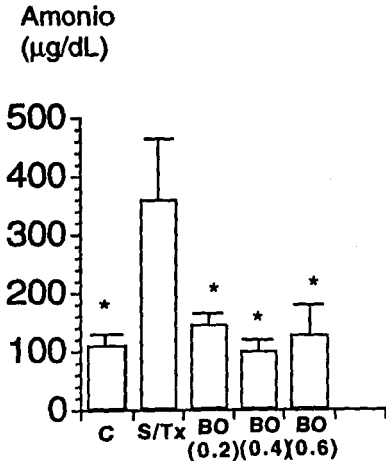
BO = Benzoato de sodio/Ornitina-Aspartato
(500 mg/kg + 20 mg/mL) oral.

* Estadísticamente significativo
($p < 0.003$) respecto al grupo S/Tx.
Prueba U Mann-Whitney.

Gráfica 1. BS y OA 0.2 mL oral, sobre amonio sanguíneo.

2. Efecto de la combinación Benzoato de sodio /Ornitina-Aspartato 0.2 mL, 0.4 mL y 0.6 mL oral, sobre los niveles de amonio sanguíneo.

Al comparar los resultados de administrar la combinación de ambos fármacos comparados contra el grupo que no fue tratado, se observó disminución significativa en las concentraciones de amonio para el grupo que recibió la combinación en dosis baja (0.2 mL) (145 ± 17 vs 360 ± 101 , $p < 0.007$) al igual que para los animales tratados con la dosis media (0.4 mL) (101 ± 17 vs 360 ± 101 , $p < 0.003$), así como para el grupo que fue tratado con la dosis alta (0.6 mL) (127 ± 45 vs 360 ± 101 , $p < 0.005$).



C = Control
S/Tx = Sin Tratamiento
BO = Benzoato de sodio/Ornitina-Aspartato
(500 mg/kg + 20 mg/mL) oral.

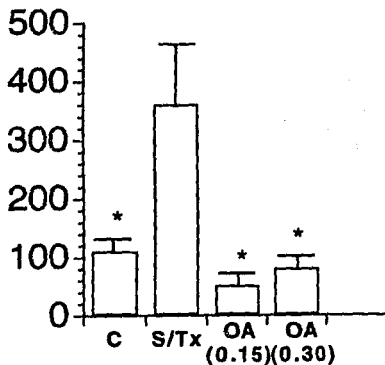
* Estadísticamente significativo
($p < 0.05$) respecto al grupo S/Tx.
Prueba U Mann-Whitney.

Gráfica 2. BO 0.2 , 0.4 y 0.6 mL oral, sobre amonio sanguíneo.

3. Efecto de dos dosis i.v. de Ornitina-Aspartato (0.15 mL y 0.30 mL), sobre los niveles de amonio sanguíneo.

Al comparar el tratamiento de Ornitina-Aspartato intravenosa contra el grupo que no recibió tratamiento, se observó disminución significativa en las concentraciones de amonio sanguíneo para el grupo que fue tratado con la dosis de 0.15 mL (49 ± 18 vs 360 ± 101 , $p < 0.007$), al igual que para el grupo que recibió la dosis de 0.30 mL (79 ± 17 vs 360 ± 101 , $p < 0.007$).

Amonio
($\mu\text{g/dL}$)



C = Control

S/Tx = Sin Tratamiento

OA = Ornitina-Aspartato (100 mg/mL) i.v.

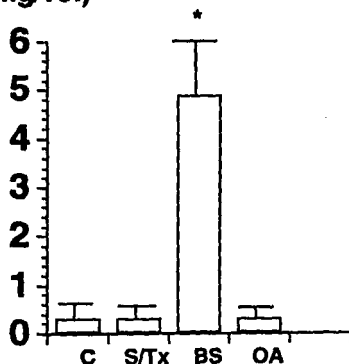
* Estadísticamente significativo
($p < 0.05$) respecto al grupo S/Tx.
Prueba U Mann-Whitney.

Gráfica 3. OA 0.15 y 0.30 mL i.v., sobre amonio sanguíneo.

4. Efecto del Benzoato de sodio 0.2 mL y Ornitina-Aspartato 0.2 mL oral, sobre los niveles de hipurato urinario.

Cuando se analizó el grupo que recibió Benzoato de sodio en dosis bajas contra el grupo sin tratamiento, se observó un aumento significativo en las concentraciones de hipurato urinario (4.9 ± 1 vs 0.3 ± 0.05 , $p < 0.003$). Los niveles de hipurato urinario no aumentaron significativamente cuando las ratas cirróticas fueron tratadas con OA en la dosis de 0.2 mL (0.3 ± 0.2 vs 0.3 ± 0.05 , $p > 0.05$).

Hipurato (mg/vol)



C = Control
 S/Tx = Sin Tratamiento
 BO = Benzoato de sodio/Ornitina-Aspartato
 (500 mg/kg + 20 mg/mL) oral.

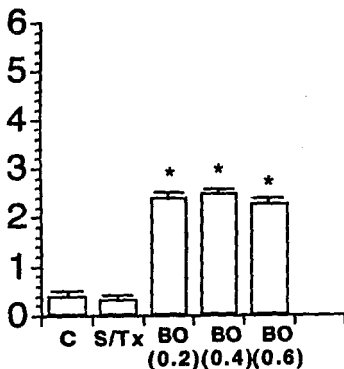
* Estadísticamente significativo
 ($p < 0.05$) respecto al grupo S/Tx.
 Prueba U Mann-Whitney.

Gráfica 4. BS 0.2 mL y OA 0.2 mL oral, sobre hipurato urinario.

5. Efecto de la combinación Benzoato de sodio/Ornitina-Aspartato 0.2 mL, 0.4 mL y 0.6 mL oral, sobre los niveles de hipurato urinario.

La combinación de ambos fármacos mostró un incremento significativo en los niveles de hipurato urinario cuando se comparó contra el grupo que no fue tratado. Este efecto se observó cuando se administraron las dosis baja (0.2 mL) (2.3 ± 0.5 vs 0.3 ± 0.05 , $p < 0.007$), media (0.4 mL) (2.4 ± 0.4 vs 0.3 ± 0.05 , $p < 0.003$) y alta (0.6 mL) (2.2 ± 0.6 vs 0.3 ± 0.05 , $p < 0.003$).

Hipurato
(mg/vol)



C = Control

S/Tx = Sin Tratamiento

BO = Benzoato de sodio/Ornitina-Aspartato
(500 mg/kg + 20 mg/mL) oral.

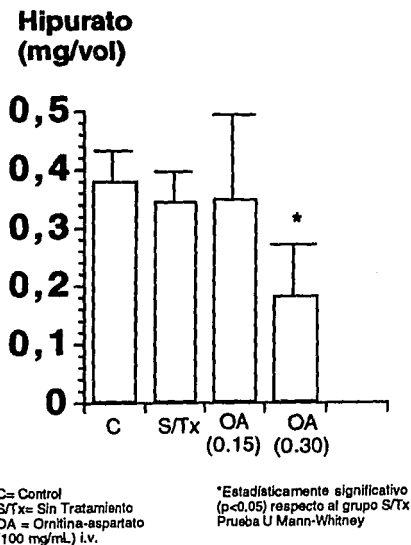
* Estadísticamente significativo
($p < 0.05$) respecto al grupo S/Tx.
Prueba U Mann-Whitney.

Gráfica 5. BO 0.2, 0.4 y 0.6 mL oral, sobre hipurato urinario.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

6. Efecto de dos dosis i.v. de Ornitina-Aspartato (0.15 mL y 0.30 mL), sobre los niveles de hipurato urinario.

Cuando se analizaron los grupos que recibieron Ornitina-Aspartato intravenosa, con respecto al grupo que no fue tratado, se observó un incremento significativo en los niveles de hipurato urinario tanto para el grupo que recibió la dosis de 0.15 mL (0.3 ± 0.1 vs 0.3 ± 0.05 , $p < 0.007$), como para el grupo que fue tratado con la dosis de 0.30 mL (0.1 ± 0.09 vs 0.3 ± 0.05 , $p < 0.007$).



Gráfica 6. OA 0.15 y 0.30 mL i.v., sobre hipurato urinario.

EFECTO SINERGICO

7. Efecto de los diferentes fármacos sobre los niveles de urea en orina.

<u>GRUPO</u>	<u>UREA (mg/vol)</u>
C	45 ± 10
S/Tx	49 ± 18
BS	71 ± 38 *
OA	184 ± 23 *
BO (0.2 mL)	120 ± 41 *
BO (0.4 mL)	108 ± 16 *
BO (0.6 mL)	115 ± 38 *
OA (0.15 mL)	130 ± 23 *
OA (0.30 mL)	152 ± 40 *

TABLA 4. Urea en orina

C = Control

S/Tx = Sin Tratamiento

BS = Benzoato de sodio (500 mg/kg) oral

OA = Ornitina-Aspartato (20 mg/mL) oral

BO = Benzoato de sodio /Ornitina-Aspartato
(500 mg/kg + 20 mg/mL) oral

OA = Ornitina-Aspartato (100 mg/mL) i.v.

* Estadísticamente significativo
(p<0.05) respecto a grupoS/Tx.
Prueba U-Mann Whitney.

EFEECTO SINERGICO

PRUEBAS DE FUNCIONAMIENTO HEPATICO

Grupo	TGO (U/L)	TGP (U/L)	B.T. (mg/dL)	B.D. (mg/dL)	F.A. (U/L)
Normal (n=5)	528 ± 138*	125 ± 47*	2 ± 0.6*	1 ± 0.2*	168 ± 58*
ST/x (n=9)	690 ± 79	1121 ± 287	9 ± 1	5 ± 1	454 ± 117
BS (0.2 mL) (n=5)	363 ± 115*	135 ± 41*	5 ± 1*	3 ± 1*	368 ± 74
OA (0.2 mL) (n=4)	607 ± 39	168 ± 61*	7 ± 1*	4 ± 1	406 ± 76
BO (0.2 mL) (n=4)	297 ± 45*	362 ± 138*	3 ± 1*	2 ± 0.4*	258 ± 72*
BO (0.4 mL) (n=5)	395 ± 145*	132 ± 37*	5 ± 1*	3 ± 0.2*	267 ± 49*
BO (0.6 mL) (n=4)	538 ± 99*	102 ± 24*	7 ± 1*	3 ± 1*	155 ± 44*
OA (0.15 mL) (n=4)	225 ± 79*	107 ± 28*	8 ± 1	5 ± 1	251 ± 93*
OA (0.30 mL) (n=4)	263 ± 43*	124 ± 14*	7 ± 1*	5 ± 1	258 ± 53*

BS = Benzoato de sodio
 OA = Ornitina-aspartato
 BO = Benzoato de sodio/Ornitina-aspartato

TGO = Transaminasa Glutámico Oxaloacé
 TGP = Transaminasa Glutámico Pirúvica
 B.T. = Bilirrubinas Totales
 B.D. = Bilirrubinas Directas
 F.A. = Fosfatasa Alcalina

*Estadísticamente significativo ($p < 0.05$), respecto al grupo S/Tx. Prueba U-Mann Whitney.

Tabla 5. Pruebas de Funcionamiento Hepático

CAPITULO VI DISCUSION

El modelo de cirrosis biliar secundaria inducida por ligadura del conducto comun en ratas conduce a un estado metabólico asociado a hiperamonemia, modelo con el cual se pueden hacer ensayos con fármacos para intentar modificar la hiperamonemia, tratando de extrapolar así lo que podría ocurrir en padecimientos que cursasen con esta alteración metabólica.

En los animales a semejanza de lo que ocurre en pacientes hepáticos desde el punto de vista clínico, la insuficiencia hepática que se expresa como en la cirrosis hepática en humanos existen alteraciones clínicas desde la cirrosis, se presentan ictericia, coluria, alteración de los reflejos motores, hepatomegalia, esplenomegalia y ascitis; este mismo patrón al igual que los aspectos biológicos del hígado, se ven modificados en los animales de experimentación. Estos cambios fueron observados en la 4a semana de ligadura del conducto biliar, como se ha reportado en trabajos realizados en ratas y perros (59).

Histopatológicamente se reproduce el patrón característico de la cirrosis biliar, como un aumento significativo de la colágena y proliferación de los conductos biliares (56).

Dentro de los aspectos funcionales del modelo, las pruebas de funcionamiento hepático (PHF) (Tabla 4) tratan de correlacionar que a semejanza de lo que ocurre en el patrón humano, también se encontró una alteración en este estudio experimental, lo cual convalida el modelo animal utilizado. En general, el incremento en las cifras de las PFH es otro parámetro que confirma la utilización del modelo de cirrosis por ligadura del conducto colédoco en ratas.

El diseño de este estudio se distinguió de otros ensayos experimentales de toxicidad del amonio en roedores, por lo siguiente: (a) se utilizaron ratas con

EFFECTO SINERGICO

cirrosis comprobada histológicamente (31); (b) no fue necesario administrar acetato de amonio porque la hiperamonemia fue producida por una insuficiencia hepática crónica; (c) la administración de todos los tratamientos se realizó en forma aguda y en una sola dosis; (d) se emplearon dosis de sustratos sin combinar (Gupos III y IV); (e) se trabajó con grupos que recibieron la combinación de Benzoato de sodio/Ornitina-Aspartato, tratando de encontrar una interacción medicamentosa positiva para manejar la hiperamonemia; (f) se empleó Ornitina-Aspartato i.v., buscando nuevas alternativas de administración; (g) se realizaron ensayos dosis-dependientes por vía oral e i.v.

Al utilizar modelos animales de cirrosis experimental se ha podido determinar la actividad biológica del Benzoato de sodio, lo cual ha permitido conocer sus parámetros farmacodinámicos. Estas determinaciones están basadas en los trabajos llevados a cabo en el Departamento de Gastroenterología del Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán (83, 103), así como en los estudios desarrollados por Quereshi y col.

Ahora es deseable conocer los efectos que la combinación de este medicamento administrado en forma simultánea con Ornitina-Aspartato, pudiera tener sobre los niveles de amonio sanguíneo en ratas con cirrosis hepática.

El mecanismo benéfico del Benzoato de sodio para reducir los niveles de amonio sanguíneo en mamíferos, se lleva a cabo mediante su conjugación con compuestos nitrogenados, glicina o glutamato para facilitar la excreción urinaria como ácido hipúrico. Por cada molécula de Benzoato de sodio administrada se elimina una cantidad equimolar de nitrógeno, lo que disminuye la poza metabólica de la glicina, la cual para restablecer su síntesis utiliza el amonio circulante, reduciendo los niveles de la hiperamonemia y las manifestaciones clínicas de la encefalopatía hepática (44).

Häussinger et al (72), han especulado que el benzoato de sodio puede activar una vía alterna de eliminación del amonio en células perivenosas, por

EFEECTO SINERGICO

ejemplo mediante la formación y liberación de glutamato en lugar de glutamina estimulando probablemente el intercambio glutamato/benzoato.

El Benzoato de sodio se ha usado en medicina clínica como una prueba de funcionamiento hepático (4).

De acuerdo con ciertos resultados experimentales el benzoato de sodio puede ser tóxico solo cuando es usado en altas dosis, en un rango de 7.5 a 10.0 mmol/kg de peso (esto es, 1081 a 1441 mg/kg de peso) (102, 118). El grupo del Dr. O'Connor ha mostrado que tanto L-carnitina (75) y carbamil glutamato (63) pueden prevenir la potenciación del Benzoato de sodio y esto puede ser útil para poner de manifiesto los efectos tóxicos del compuesto cuando son usadas accidentalmente altas dosis de Benzoato de sodio (118).

El efecto deletereo de altas dosis de Benzoato de sodio se ha atribuido a la acumulación de benzoil-Co A, la que puede depletar el pool de acetil-Co A, llevando a una disminuída formación de N-acetilglutamato y consecuentemente a una inhibición de la síntesis de urea (45). No se ha encontrado inhibición directa en las enzimas del ciclo de la urea en ratas hiperamonémicas tratadas con Benzoato de sodio (37).

Ornitina-Aspartato estimula la incorporación del amonio dentro del ciclo del ácido cítrico, disminuyendo los niveles del amonio circulante. Este medicamento funciona como un sustrato crítico para que se lleven a cabo la ureagénesis y la síntesis de glutamina, procesos que pueden actuar como vías alternas de eliminación del amonio (54). Aunque podría existir hipotéticamente una vía más de excreción del amonio que pueda potenciar el aumento en las concentraciones de hipurato. Tal vez por una vía alterna en la formación de orotato o de glicina.

Este compuesto estimula dos vías más. La ornitina se combina con la carbamilfosfato sintetasa I, que no funciona activamente en el proceso de

EFEECTO SINERGICO

cirrosis hepática. La unión de estos metabolitos más la captación del amonio circulante, promueven la síntesis de urea en los hepatocitos periportales y en menor grado en los perivenosos.

Por otro lado, en los hepatocitos perivenosos la ornitina luego de sufrir transaminación y pasar a α -cetoglutarato, puede combinarse con sustancias dicarboxiladas como el aspartato para estimular la glutamina sintetasa, enzima que durante las enfermedades hepáticas agudas y crónicas se encuentra trabajando a un 20% de su capacidad, para formar glutamina (54).

También debe recordarse que la población de hepatocitos es heterogénea y que dependen de su localización y su edad el grado de funcionamiento y capacidad enzimática. Lo cual es una característica muy propia del hígado de funcionar en forma segmentaria y no como una unidad. Lo que nos hablaría de las diferentes formas de excreción amoniaca que el hígado puede desarrollar.

Al analizar los niveles de amonio plasmático en el grupo que no recibió tratamiento, se observó un aumento significativo de casi 200 % con respecto al grupo control (gráficas 1 a 3). Esto se explica porque la ligadura que se colocó al conducto colédoco provocó insuficiencia hepática y corto-circuitos portosistémicos una vez que la rata alcanza la cirrosis, observándose un efecto mixto tanto de los hepatocitos dañados como de los corto-circuitos inducidos por la cirrosis biliar.

El efecto de los fármacos administrados en forma separada por vía oral, no mostró modificación de los niveles de amonio sanguíneo (gráfica 1). En el caso del Benzoato de sodio puede deberse a la duración del tratamiento, ya que en estudios experimentales realizados en el Departamento de Gastroenterología del INN SZ (69), empleando Benzoato de sodio en dosis bajas pero durante 7 días, se ha observado disminución significativa en los niveles de amonio plasmático.

EFEECTO SINERGICO

Ornitina-Aspartato no mostró eficacia para reducir el objetivo que es la concentración de amonio, lo que puede ser debido a la vía de administración en forma oral, pues en estudios realizados por Leweling (54), se encontró una reducción significativa en los índices de amonio sanguíneo con el empleo del mismo fármaco en condiciones similares a las nuestras pero en pacientes que recibieron el tratamiento por vía intravenosa.

Este efecto puede deberse a una mayor biodisponibilidad de la Ornitina-Aspartato administrada i.v.. Lo que fue observado cuando se empleó Ornitina-Aspartato en forma i.v. (gráfica 3), donde las concentraciones de amonio disminuyeron hasta el nivel basal tomado a partir del grupo que no fue operado. Estos resultados muestran que el medicamento administrado de esta forma alcanza con más facilidad el torrente sanguíneo y por tanto es más notorio su efecto.

Con el objeto de cuantificar el efecto de la combinación de los dos fármacos, se emplearon tres dosis diferentes en forma oral en un ensayo dosis-dependiente (gráfica 2). Esta combinación mostró un efecto sinérgico en la reducción de las concentraciones de amonio con las tres diferentes dosis, lo que puede deberse a la captación de amonio (NH_4^+) mediante dos vías alternas del ciclo de la urea, el cual se encuentra deprimido durante el proceso de cirrosis y encefalopatía hepática.

El efecto sinérgico propuesto para estos dos medicamentos sería pues, una mayor captación de moléculas de nitrógeno provenientes del amonio circulante, lo que disminuiría considerablemente la hiperamonemia y por tanto los efectos causados por ésta.

La captación de nitrógenos por estos dos medicamentos activa vías alternas para su eliminación, las que pueden ser evaluadas mediante sus productos de excreción. Una forma de medir la cantidad de Benzoato de sodio administrado es cuantificando su eliminación como hipurato, el cual se forma

EFECTO SINERGICO

después de que la glicina le cede su esqueleto carbonado al ácido benzoico.

Analizando al grupo que recibió Benzoato de sodio en la dosis baja y en forma oral (gráfica 4), se encontraron aumentados los niveles de hipurato urinario lo que concuerda con la hipótesis planteada para este medicamento.

La combinación de ambos medicamentos en sus tres diversas dosis (gráfica 5), mostró elevación significativa de las concentraciones de hipurato, alcanzando solo la mitad del incremento encontrado para el Benzoato de sodio. Este efecto podría deberse a que solo el Benzoato de sodio se deriva hacia hipurato, en tanto que la Ornitina-Aspartato se excreta como urea en el caso de la ornitina o se deriva hacia la formación de glutamina cuando ambos intermediarios actúan conjuntamente. Lo que puede explicar porque solo se obtiene la mitad del incremento de hipurato en comparación con el grupo tratado con Benzoato de sodio.

No se descarta que la combinación si bien estimula algunas enzimas, también puede deprimir otras y debido a esto puede producirse el aumento de hipurato por arriba de lo supuestamente esperado. La poza de urea se eleva más en las combinaciones pero también se encuentra elevada en Benzoato de sodio y Ornitina-Aspartato aunque en forma menos impresionante.

Otro metabolito nitrogenado que comunmente está involucrado en la eliminación del amonio es la urea. Este producto de excreción teóricamente solo debería encontrarse elevado en los grupos que fueron tratados con Ornitina-Aspartato, lo que se observa principalmente en el grupo que recibió el medicamento por vía oral (Tabla 5).

Las ratas que fueron tratados con la combinación de los dos medicamentos en sus tres dosis también por vía oral, mostraron niveles elevados en las concentraciones de urea.

EFFECTO SINERGICO

Los grupos que fueron tratados con Ornitina-Aspartato por vía intravenosa, mostraron incremento en los niveles ureicos para las dos dosis empleadas (0.15 mL y 0.30 mL).

Estos resultados, sugieren la existencia de un punto crítico en donde las dosis empleadas en forma oral pueden actuar a nivel enzimático para la formación de los productos de excreción, principalmente en el caso de las combinaciones de los medicamentos. Este sitio de acción en común para ambas vías debería encontrarse fuera del ciclo de la urea, tal vez en el aspartato que va a entrar al ciclo de la urea y que funciona como uno de los precursores del ciclo del ácido cítrico, compartiendo el NH_4^+ que es la segunda molécula nitrogenada necesaria para activar el ciclo de Krebs.

Los resultados sugieren que el Benzoato de sodio más la Ornitina-Aspartato, tienen efecto sinérgico en la disminución de los niveles de amonio en sangre de ratas cirróticas hiperamonémicas.

Debido al efecto de Ornitina-Aspartato intravenosa esta podría ser también una alternativa en el tratamiento de la encefalopatía hepática aguda, cuando los pacientes se encuentran en coma y no pueden ingerir el fármaco por vía oral.

CAPITULO VII CONCLUSIONES

De acuerdo con los objetivos planteados en este estudio se puede concluir:

1. Este modelo animal de cirrosis biliar inducida por ligadura del conducto biliar, reproduce muchas de las alteraciones observadas en pacientes cirróticos, siendo un modelo adecuado para el estudio de diversas fases de esta enfermedad.
2. La administración de BS por vía oral no provocó disminución significativa en la concentración de los niveles de amonio sanguíneo aunque sí el mayor incremento en los niveles de hipurato urinario.
3. Con el empleo de OA sola en forma oral, en nuestro modelo, no disminuyeron las concentraciones de amonio.
4. La administración conjunta de BS más OA disminuyó notablemente la concentración de amonio en suero de ratas con cirrosis.
5. El empleo simultáneo de la fórmula Benzoato de sodio/Ornitina-aspartato, no mostró tener un efecto dosis-dependiente cuando se analizaron los niveles de amonio plasmático y las concentraciones de hipurato urinario. Lo que puede deberse a un proceso de saturación enzimático.
6. El efecto sinérgico más significativo por vía oral para disminuir el amonio plasmático y aumentar su excreción, fue de 0.4 mL oral (con una concentración de BS de 500 mg/kg y 20 mg/mL de OA).
7. Con la administración intravenosa de Ornitina-Aspartato (100 mg/mL), se logró la disminución más significativa de las concentraciones de amonio

EFEECTO SINERGICO

plasmático. Lo que comprueba que es más efectiva esta vía de administración, por la mayor biodisponibilidad del fármaco.

BIBLIOGRAFIA.

1. Acatino L, Contreras A, Berdicheusky E, Quintana C. The effect of complete obstruction on bile secretion. Studies on the mechanisms of postcholestatic cholerisis in the rat. *J Lab Clin Med* 1981;97:525-534.
2. Acatino L, Contreras A, Fernández S, Quintana C. The effect of completa biliary obstruction on bile flow and bile acid excretion: postcholestatic cholerisis in the rat. *J Lab Clin Med* 1979; 93: 706-717.
3. Adams RD. The neurological changes in the more common types of severe liver disease. *Transac Am Neurol Ass* 1949;74:327.
4. Anet F, Reynolds MJ, Reynolds TM. Water-soluble constituents of fruit. II. The separation of acids on anion-exchange resins: the isolation of 1-quinic acid from apricots. *Australian J Chem*, 1955; 8: 26.
5. Aoyama H, Kamiyama Y, Ukikusa M, et al. Clinical significance of hippurate-synthesizing capacity in surgical patients with liver disease: A metabolic tolerance test. *J Lab Clin Med*, 1986; 108: 456-460.
6. Arana R. Conservadores químicos para alimentos. *Ind Aliment* 1980; 2: 16-22.
7. Aurri S, Monden K, Hai S, et al. Depressed function of Kupffer cells in rats with CCl₄-induced liver cirrhosis. *Res Exp Med* 1990; 190: 173-182.
8. Babson A, Shapiro P, Philips GE. *Clin Chem Acta* 1962; 7: 199.

9. Bacq C, Roulot D, Braillon A, Lebrec D. Hemodynamic effects of dopamine in conscious rats with secondary biliary cirrhosis. *J Hepatol* 1990; 11: 257-262.
10. Ballard RA, Vinocur B, Reynolds JW. Transient hyperammonemia of the preterm infant. *N Engl J Med* 1987; 299: 920-925.
11. Baló J, Korpassy B. The encephalitis of dogs with fistula fed with meat. *Arch. Pathol* 1932; 13: 80-87.
12. Banko G, Zöllner H. Does ornithine stimulate carbamoylphosphate synthetase?. *Int J Biochem* 1985; 17: 503-507.
13. Basile A, Jones AJ. The pathogenesis and treatment of hepatic encephalopathy: Evidence for the involvement of benzodiazepine receptor ligand. *Pharmacol Rev* 1991;4:27-71.
14. Batshaw ML, Brusilow S, et al. Treatment of inborn errors of urea synthesis: Activation of alternative pathway of waste nitrogen synthesis and excretion. *N Eng J Med* 1982; 301: 1387-1392.
15. Bayless T, Rosenwelg N, Christopher N, et al. Milk intolerance and lactose tolerance test. *Gastroenterology* 1968;54:475-477.
16. Beliveau GP, Brusilow S. Glycine availability limits maximum hippurate synthesis in growing rats. *J Nutr* 1987; 117: 36-41.
17. Bennet A, Eley KG. Intestinal pH and propulsion: an explanation of diarrhea in lactose deficiency and laxation by lactulose. *J Pharma Pharmacol* 1976;28:192-195.

EFEECTO SINERGICO

18. **Bessman AN, Merieck GS.** Blood ammonia levels following the ingestion of casein and whole blood. *J Clin Invest* 1958; 37: 990-998.
19. **Bichet DG, Van Putten VJ, Schrier RW.** Potential role of increased sympathetic activity in impaired sodium and water excretion in cirrhosis. *N Engl J Med* 1982; 307: 1552-1557.
20. **Bosch J, Enriquez R, Groszmann JR, Storer HE.** Chronic bile duct ligation in the dog: hemodynamic characterization of a portal hypertensive model. *Hepatology* 1983; 3: 1002-1007.
21. **Boyer LJ.** What causes cholestasis?. The American Association for the study of liver diseases. Postgraduate course. Chicago Illinois 1989: 266-285, **Sherlock SD.** Cholestasis. In: **Sherlock SD.** Diseases of the liver and biliary system. Blackwell Scientific Publications. Oxford London Edinburgh Boston Melbourne 1985:537.
22. **Bown RL, Gibson SA, Fenton CJB, et al.** Ammonia and urea transport by excluded human colon. *Clin Sci Mol Med* 1975; 48: 279-287.
23. **Brusilow S.** Disorders of the urea cycle. *Hospital Practice* 1985; 20: 59-65.
24. **Butterworth FR.** Pathophysiology of hepatic encephalopathy: studies in autopsied brain tissue from hepatic coma patients. *Rev Inv Clin* 1990; 42: 131-136.
25. **Cameron GR, Hasan SM.** Disturbances of structure and function in the liver as the result of biliary obstruction. *J Path Bact* 1958; 75: 333-349.

EFEECTO SINERGICO

26. Campbell AGM, Rosenberg LE, Snodgrass PJ, et al. Ornithine transcarbamylase deficiency: a cause of lethal neonatal hyperammonemia in males. *New Engl J Med* 1973;288:1-6.
27. Carulle N, Salwsle GF, Maneti F. Absorption of lactulose in man. *Digestion* 1972;6:139-145
28. Cassidy WA, Brown ED, Cecil SJ. Alterations in zinc and vitamin A metabolism in alcoholic liver disease: a review. In Hambridge KM, Nichols BL. Zinc and cooper in clinical medicine. Medical and scientific books. New York 1978, p.59 .
29. Castell DO, Moore EW. Amonia absorption from the human colon. The role of nonionic diffusion. *Gastroenterology* 1971;60:33-42.
30. Cavanagh JB. Celular abnormalities in the brain in chronic liver disease. *Sci Bas Med Ann Rev* 1972:248-260.
31. Ceasar J. Levels of glutamine and ammonia in CNF. *Clin Sci* 1962;41:22-23.
32. Cervera E, Olvera G, Gil S. Excreción de hipurato urinario en insuficiencia hepática. Presentado en reunión anual de AMINSZ, 1991.
33. Chen S. Mercaptans and dimethylsulfide in the breath of patients with cirrhosis of the liver. *J Lab Clin Med* 1970;75:628-635.
34. Chen S, Zieve L, Mahadevan V. Mercaptans and dimethylsulfide in the breath of patients with cirrhosis of the liver. *J Lab Clin Med*, 1970; 75: 628-635.157.
35. Chichter F. Antimicrobial food additives. En: Furia TE. Food technology. Cleveland. The chemical rubber Co.,1972; 120-122.

EFFECTO SINERGICO

36. Clarke JS, Cruza K, McKissock PK, et al. Diphasic blood ammonia curves after feeding proteins to normal dogs and man. Arch Surg 1959;78:836-843.
37. Colombo JP, Bachmann C, Pfiser U, Gradwohl M. Biochem Biophys Res Commun 1988;151: 872-877.
38. Conn H. Hepatic encephalopathy. 37. In: Schiff L, Schiff ER, Schiff JB. Diseases of the liver. Seventh edition. Lippincott Company Philadelphia. 1993. p:1036-1060.
39. Conn HO. Spontaneous bacterial peritonitis. Multiple revisitations. Gastroenterology 1976; 70: 455-457.
40. Conn HO, Atterbury CE. Cirrhosis. In: Schiff L, Schiff RE, Schiff JB. Diseases of the liver. Seventh edition. Lippincott Company Philadelphia. 1993. p:875-934.
41. Conn HO, Lieberthal MM. The inherited hyperammonemic syndromes. En The hepatic coma syndromes and lactulose. Págs. 122-140. Williams and Wilkins Co. Baltimore, 1979.
42. Copage WS, Island DP, Coover A, Liddle GW. The metabolism of aldosterone in normal subjects and in patients with hepatic cirrhosis. J Clin Invest 1962;41:1672-1680.
43. Coulter DL, Allen RJ. Secondary hyperammonemia: a possible mechanism of valproate encephalopathy. Lancet 1980;1:1309-1311.
44. De Meo AN, Andersen BR. Defective chemotaxis associated with serum inhibition in cirrhotic patients. N Engl J Med 1972; 286: 735-740.

EFEECTO SINERGICO

45. Desmorath H, Vinel JP, Laholou O, et al. Systemic and splanchnic hemodynamic effects of molsidomine in rats with tetrachloride-induced cirrhosis. *Hepatology* 1991; 13: 1181-1184.
46. Diamond T. Development and reversal of endotoxemia and endotoxin-related death in obstructive jaundice. *Surgery* 1990; 108: 370-375.
47. Díaz-Muñoz M. Encefalopatía hepática. Un enfoque moderno a un antiguo problema de salud. *Ciencia* 1988; 39: 179-189.
48. Donaldson RM. Normal bacterial populations of the intestine and their relation to intestinal function. *New Engl J Med* 1964;270:938,94 y 1050
49. Donohue MT, Jennett BR, Tuma JD, Sorrell FM. Synthesis and secretion of plasma proteins by the liver. In: Zakim D, Boyer DT. *Hepatology: A Textbook of Liver Disease*. W.B. Saunders Company, 1990: 124-137.
50. Drayna CJ, Titcomb CP, Varma RR, Soergel KH. Hyperammonemic encephalopathy caused by infection of neurologic bladder. *N Engl J Med* 1981; 766-768.
51. Estanes-Hernández A. Alteraciones morfológicas, hemodinámicas y funcionales en un modelo de cirrosis experimental. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. UNAM. 1994.
52. Fisher-Nielsen A, Poulson EH, Hansen BA, Hage E, Kelding S. CCl₄ cirrhosis in rats irreversible histological changes and differentiated functional impairment. *J Hepatol* 1991; 12: 110-117.
53. Fitzpatrick SM, Hetherington HP, Behar KL, Shulman RG. Effects of acute hyperammonemia on cerebral amino acid metabolism and pH in

- vitro, measured by ^1H and ^{31}P Nuclear Magnetic Resonance. *J Neurochem* 1989; 52: 741-749.
54. Flannery DB, Hsia YE, Wolf B. Current status of hyperammonemia syndromes. *Hepatology* 1982; 2: 495-506.
 55. Fowler JM, Schafer DM. A mechanism for the increased sensitivity to benzodiazepines in hepatocellular failure: evidence from an animal model. *Gastroenterology* 1981; 80: 1359.
 56. Franco D, Gigou M, Szekely MA, Bismuth H. Portal hypertension after bile duct obstruction. *Arch Surg* 1979; 114: 1064-1067.
 57. Gabuzda GJ. Hepatic coma. Clinical considerations, pathogenesis and management. In: *Advances in internal medicine, Vol XI*. Dock and Shapper Ed. Year Book Medical Publishers USA 1962; 11-73.
 58. Galambos JT. *Cirrhosis*. Philadelphia, WB Saunders, 1979, p 273.
 59. Garcia-Compean D, Valadez CR, Barragán FR. Conceptos actuales sobre la fisiopatogenia de la encefalopatía hepática. *Rev Invest Clín* 1990; 42: 113-119.
 60. Gatley SJ, Sherrat HS. The synthesis of hippurate from benzoate and glycine by rat liver mitochondria. *Biochem J* 1977; 166: 39-47.
 61. Gerok W, Häussinger D. Ammonia detoxication and glutamine metabolism in severe liver disease and its role in the pathogenesis of hepatic encephalopathy. In: Häussinger D, Sies H (eds). *Glutamine metabolism in mammalian tissues*. Springer. Heidelberg 1984: 257-277.

EFFECTO SINERGICO

62. Gil S, Rojas S, Uribe M, et al. Efecto de la lactosa, lactulosa y neomicina sobre la generación de amonio y flora fecal. I Reunión Nacional de Química Clínica. Morelia, Mich. Agosto de 1979.
63. Grau E, Fellpo V, Miñana MD, Grisolia S. Treatment of hyperammonemia with carbamylglutamate in rats. *Hepatology* 1991; 15: 446-448.
64. Green TP, Marchessault BA, Freese DK. Disposition of sodium benzoate in newborn infants with hyperammonemia. *J Pediatr* 1983; 102: 785.
65. Greenberg NJ, Carley J, Schenker S, et al. Effect of vegetable and animal protein diets in chronic hepatic encephalopathy. *Am J Dig Dis* 1977; 22: 845-855.
66. Greenberg LH, Momary H. Audiotoxicity and nephrotoxicity due to orally administered neomycin *JAMA* 1965; 194: 237-243.
67. Grimm G, Lenz K, Gangl A. Improvement of hepatic encephalopathy treated with flumazenil. *Lancet* 1988; 2: 1392-1394a.
68. Grimm G, Lenz K, Kleinberger G, et al. Ro 15-1788 improves coma in 4 out of 5 patients with fulminant hepatic failure: verification by long latency auditory and somatosensory evoked potentials. *J Hepatol* 1987; 4: S21.
69. Guerra A. Utilización de una alterna de excreción de nitrógeno en ratas normales y cirróticas hiperamonémicas. Tesis de Licenciatura, UAP. 1993.

EFEECTO SINERGICO

70. Guevara L, García G. Diagnóstico de la encefalopatía hepática. En: Encefalopatía y coma hepático. Uribe ME. Ed. Salvat, 1a. ed, 1982; 23-44.
71. Harper H.A. Manual de química fisiológica. Ed. El manual moderno. México, D.F. 1980.
72. Häussinger D. Nitrogen metabolism in normal and cirrhotic liver. In: cirrhosis, encephalopathy and ammonium toxicity. Edited by Grisolia et al. Plenum Press New York 1990; 47-64.
73. Häussinger D, Steeb R, Gerok W. Ammonium and bicarbonate homeostasis in chronic liver disease. *Klin Wochenschr* 1990; **68**: 175-182.
74. Hawkins RA, Mans AM. Brain energy metabolism in hepatic encephalopathy. In: Butterworth RF, Pomier Layrargues G. Eds. Hepatic encephalopathy. Pathophysiology and treatment. Human Press. Clifton New Jersey 1989: 159-176.
75. Hearn TJ, Coleman AE, Lai CJ, et al. Effect of orally administered L-carnitine on blood ammonia and L-carnitine concentrations in portacaval-shunted rats. *Hepatology* 1989; **10**:822-828.
76. Henglein-Ottermann D. Der Einfluß von Ornithin-Aspartat auf die experimentell erzeugte Hyperammoniämie. *Klinisch-experimentelle Studie Ther Gegenw* 1976; **115**: 1504-1518.
77. Henriksen HJ, Ring-Larsen H, Christensen NJ. Sympathetic nervous activity in cirrhosis: A survey of plasma catecholamine studies. *J Hepatol* 1984; **1**: 55-65.

EFFECTO SINERGICO

78. Herlong FH, Maddrey WC, Walsler M. The use of ornithine salts of branched-chain ketoacids in portal-systemic encephalopathy. *Ann Intern Med* 1980; 93: 545-550.
79. Hermann R, McIntyre N. Metabolismo de los aminoácidos, producción de urea y regulación del pH. En Rodés J, Benhamou JP, Bircher J, McIntyre N, Rizzetto M. Tratado de hepatología clínica. Masson-Salvat Medicina, Barcelona, 1993. p:188-207.
80. Jacobsen ED, Prior JT, Falcon WW. Malabsorptive syndrome induced by neomycin. *J Lab Clin Med* 1960;56:245-250.
81. Jendrassik L, Grof P. *Biochem Z.* 1938;297:81.
82. Johnson JD. Neutral hetero B galactosidase from rabbit small intestine. *Bioch Bioph Acta* 1973;302:382-392
83. Jungermann K, Katz N. Functional hepatocellular heterogeneity. *Hepatology* 11982;2:385-395.
84. Kaiser S, Gerok W, Häussinger D. Ammonia and glutamine metabolism in human liver slices: New aspects of the pathogenesis of hyperammonemia in chronic liver disease. *Eur J Clin Invest* 1988; 18: 535-542.
85. Kay HD. *J Biol Chem* 1930; 89: 235.
86. Kersh ES, Rifkin H. Lactulose enemas. *Ann Intern Med* 1973;78:81-84.
87. Kircheis G, Quack G, Erbler H. L-Ornithine-L-Aspartate in the treatment of hyperammonemia and hepatic encephalopathy. In: Conn H, Bircher J

editors. Hepatic encephalopathy syndromes and therapies. Medi-Ed Press 1993; 375-383.

88. Klotz U, Walker S. Flumazenil and hepatic encephalopathy. *Lancet* 1989; 1: 155-156.
89. Kountouras J, Billing HB, Schever JP. Prolonged bile duct obstruction: a new experimental model for cirrhosis in the rat. *Br J Exp Path* 1984; 65: 305-311.
90. Krol. Tauroursodeoxycholate (TUDC) reduces ductular proliferation and portal inflammation in bile-duct-ligated hamsters. *Hepatology* 1983; 3: 881 (Abstract).
91. Kurt-Isselbacher J. Ictericia y Hepatomegalia. En Harrison. Principios de Medicina Interna. Interamericana, Mac Graw-Hill. México. Cap 47; 1991: 2762.
92. Lee SS, Girod C, Brailon A, Hadengue A, Lebrec D. Hemodynamic characterization of chronic bile duct-ligated rats: effect of pentobarbital sodium. *Am J Physiol* 1986; 251: G176-G180.
93. Lenhinger AL. Bioquímica 2a. ed. Omega S.A. Barcelona 1982; pp:1013.
94. Lewis HB. Studies in the synthesis of hippuric acid in the animal organism II. *J Biol Chem* 1914; 18: 225-231.
95. Livingstone AS, Potvin M, Goresky CA, Finlayson MH, Hinchey EJ. Changes in the blood-brain barrier in hepatic coma after hepatectomy in the rat. *Gastroenterology* 1977; 73: 697-704.

EFEECTO SINERGICO

96. López C, Jiménez W, Arroyo V, et al. Temporal relationship between the decrease in arterial pressure and sodium retention in conscious spontaneously hypertensive rats with carbon tetrachloride-induced cirrhosis. *Hepatology* 1991; 13: 585-589.
97. López-Novoa JM. A micropuncture study of salt and water retention in chronic experimental cirrhosis. *Am J Physiol* 1977; 234: F315-F318.
98. Lunzer M, James IM, Sherlock S, et al. Treatment of chronic hepatic encephalopathy with levodopa. *Gut* 1974;15:555-561.
99. Lux HD. Ammonium and chloride extrusion: hyperpolarizing synaptic inhibition in spinal motoneurons. *Science* 1971; 173: 555-557.
100. Mac Donald RA, Pechet G. Liver cell regeneration due to biliary obstruction. *Arch Path* 1961;72: 133-141.
101. Maddison EJ, Dodd PR, Morrison M, et al. Plasma GABA, GABA-like activity and the brain GABA benzodiazepine receptor complex in rats with chronic hepatic encephalopathy. *Hepatology* 1987; 7: 621-622.
102. Maswoswe SM, Cyr DM, Griffith AD, Tremblay GC. The effects of sodium benzoate on ammonia toxicity in rats. *Bioch Biophys Res Com* 1986; 369-373.
103. Mc Geer EG, Mc Geer PL. Amino acid neurotransmitters. In: Siegel GJ, Agranoff B, Albers RW, Molinoff P, Eds. *Basic neurochemistry: molecular, cellular and medical aspects*. Raven Press Ltd., New York 1989: 311-332.
104. Meier R. Flumazenil in the treatment of portal systemic encephalopathy. *Intensive Care Med* 1991; 17: S39-42.

EFFECTO SINERGICO

105. Meister A. Metabolism of glutamine. *Physiol Rev* 1956;36:103-127.
106. Mendenhall CL, Rouster S, Marshall L. A new therapy for portal systemic encephalopathy. *Am J Gastroenterol* 1986; 81: 540-543.
107. Merz-Pharma + Co. GmbH & Co. D-6000 Frankfurt/MAIn 1. República Federal de Alemania.
108. Michel H, Solere M, Granier PM, et al. Treatment of cirrhotic hepatic encephalopathy by L-Dopa. *Gastroenterology* 1980;79:211.
109. Miura S, Asakura M, Munakata Y, et al. Lymphatic role in the pathogenesis of fat malabsorption in liver cirrhosis in rats. *Gastroenterology* 1972; 62: 93-100.
110. Morgan MY, Jakobwits A, Eleithorn A, et al. Successful use of bromocriptine in the treatment of a patient with chronic portasystemic encephalopathy. *N Engl J Med* 1977;296:793-794.
111. Mullen KD. Hepatic encephalopathy. In: Rector WG. Complications of chronic liver disease. Mosby Year Book, 1a. ed.1992; 145-147.
112. Müting D, Kalk JF, Fischer R, Wuzel H, Reikowski J. Hepatic detoxification and hepatic function in chronic active hepatitis with and without cirrhosis. *Dig Dis Sci* 1988; 33: 41-46.
113. Müting D, Reikowski J. Kontrollierte Studie über die Wirkung einer oral verabreichten ammoniaksenkenden Aminosäure Ornithin-Aspartat auf Leber-und Pankreasfunktion bei Leberzirrhosekranken. *Therapiewoche* 1980; 30: 5990-5996.
114. Narro-Robles J, Gutiérrez-Avila H, López-Cervantes M, et al. La mortalidad por cirrosis hepática en México I. Características

- epidemiológicas relevantes. *Salud Pública de México* 1992; 34: 378-387.
115. Nelson DC, McGraw WR, Hoyumpa AM. Hypermagnesemia and lactulose therapy. *JAMA* 1983; 249: 1295-1298.
 116. Norenberg MD, Baker L, Norenberg LOB, et al. Ammonia-induced astrocyte swelling in primary culture. *Neurochem Res* 1991; 16: 833-836.
 117. O'Connor JE, Costell M, Grisolia S. The potentiation of ammonia toxicity by sodium benzoate is prevented by L-Carnitine. *Biochem Biophys Res Comm* 1987; 145: 817.
 118. O'Connor JE, Ribelles M, Grisolia S. Potentiation of hyperammonemia by sodium benzoate in animals. A note of caution. *Eur J Pediatr* 1982; 138: 186-187.
 119. O' Gardy JO, Portmann B, Williams R. Capítulo 39. Fulminant Hepatic Failure. *Diseases of the liver. Seventh edition. Lippincott Company Philadelphia.* 1993. p: 1077-1090.
 120. Ohara N, Schaffner T, Reichen J. Structure-function relationship in secondary biliary cirrhosis in the rat. Stereologic and hemodynamic characterization of a model. *J Hepatol* 1993; 17: 155-162.
 121. Ohmori S, Ikeda M. Colorimetric determination of hippuric acid and liver homogenate. *AnalChem* 1977; 48: 1494-1496.
 122. Oster JR. Acid base homeostasis and liver disease. In: Epstein M. Ed. *The kidney in liver disease* 2nd ed. Elsevier biomedical New York 1983, 147-182.

EFEECTO SINERGICO

123. Owen EE, Flanagan JF, Tyor MP, et al. Kidney, as a source of blood ammonia. *Proc Soc Exp Biol Med* 1959;102:696-697.
124. Pérez-Ayuso RM, Arroyo V, Planas R. Randomized comparative efficacy of furosemide versus spironolactone in no azotemic cirrhosis with ascitis. *Gastroenterology* 1983; 84: 961-968.
125. Pérez-Tamayo R. Is cirrhosis of the liver experimentally produced by CCl₄, an adequate model of human cirrhosis?. *Hepatology* 1983; 83: 112-120.
126. Phear EA, Ruebner B, Sherlock S. Blood ammonia levels in liver diseases and hepatic coma. *Lancet*,1955; 1: 836-840.
127. Poo JL, Cervera E, De Hoyos A, et al. Benzoato de sodio. Fundamentos para su uso clínico en hepatología. *Rev Inv Clín* 1990; 42: 101-105.
128. Poo JL, Cruz C, Zenteno E, et al. Etiology and prognosis of portal hypertension (PH) in a cohort of 1000 patients from Mexico City. *Hepatology* 1992; 16: 245A.
129. Poo JL, Feldmann G, Erlinger S, et al. Ursodeoxycholic acid limits liver histologic alterations and portal hypertension induced by bile duct ligation in the rat. *Gastroenterology* 1992; 102: 1752-1759.
130. Poupon ER, Eschwege E, Poupon R, and the UDCA-PBC Study Group. Ursodeoxycholic acid for the treatment of primary biliary cirrhosis. *J Hepatol* 1990; 11: 16-21.
131. Prasad AS. Clinical disorders of zinc deficiency. In Prasad AS. *Current topics in nutrition and disease*. Alan R. Liss. New York 1982;7:89.

EFFECTO SINERGICO

132. Proctor E, Chatamra K. Controlled induction of cirrhosis in the rat. *Br J Exp Path* 1983; 64: 320-330.
133. Proctor E, Chatamra K. High yield micronodular cirrhosis in the rat. *Gastroenterology* 1982; 83: 1183-1190.
134. Quick AJ. Intravenous modification of the hippuric acid test for liver function. *Am J Dig Dis* 1969; 6:716-717.
135. Quick AJ. The synthesis of hippuric acid. A new test of liver function. *Am J Med Sc* 1933; 185: 630-635.
136. Raabe WA. Neurophysiology of ammonia intoxication. In: Butterworth RF, Pomier LG, Eds. *Hepatic encephalopathy. Pathophysiology and treatment.* Humana Press, Clifton, 1989: 49-72.
137. Ratliff CR, Hall FF. Blood ammonia returns to the laboratory. *Laboratory management* . August 179, p.16.
138. Reding P. Oral zinc supplementation improves hepatic encephalopathy. *Lancet* 1984;2:493-495.
139. Reitman S, Frankel S. *Am J Clin Path* 1957;28:56.
140. Reye RDK, Morgan B, Baral J. Encephalopathy and fatty degeneration of the viscera: a disease entity in childhood. *Lancet* 1963; 2: 749-752.
141. Richterich RW, Goldstein L. Distribution of glutamine metabolizing enzymes and production of urinary ammonia in mammalian kidney. *Am J Physiol* 1958;195:316-320.

EFFECTO SINERGICO

142. Riggio O, Merli M, Capocaccia L, et al. Zinc supplementation reduces blood ammonia and increases liver ornithine transcarbamylase activity in experimental cirrhosis. *Hepatology* 1992; 16: 785-789.
143. Rodjkind and Kershenovich, 1976.
144. Rosenthal P, Vinocur B. Neonatal Hyperammonemia *J Pediatr* 1979; 94: 847-848.
145. Salvatore F, Cimino F, d'Ayello-Caracciao M, Cittadini D. Mechanism of protection by L-ornithine-L-aspartate mixture and by L-arginine- in ammonia intoxication. *Arch Biochem Biophys* 1964; 107: 499.
146. Schellong G, Wende U. *Arch Kinderheilk.* 1960; 162:126.
147. Scheuer JP. Cirrhosis. En Macsween NMR, Scheuer JP. *Pathology of the liver.* Churchill Livingstone Edinburg, London and NY 1979: 258 271.
148. Schmidt FO. Molecular regulators of brain function: A new review. *Neuroscience* 1984; 13: 991-1001.
149. Shiraf M, Yoshimura A, Nishioka M, et al.. Organ distribution of 3H-endotoxin in rats with liver fibrosis and rats with liver cirrhosis. *Hepatogastroenterology* 1989; 36: 172-174.
150. Shont EM, Conn HO, Snodgrass PJ, et al. Evidence for X-linked dominant inheritance of ornithine transcarbamylase deficiency. *New Engl J Med* 1973;288:7-12.

EFEECTO SINERGICO

151. Silen W, Harper HA, Mawsdley DL, et al. Effect of antibacterial agents on ammonia production within the intestine. *Proc Soc Exp Biol* 1955;88:138-140.
152. Snodgrass PJ, DeLong GR. Urea-cycle enzyme deficiencies and an increased nitrogen load producing hyperammonemia in Reye's syndrome. *N Engl J Med* 1976; 294: 855-860.
153. Stryer L. *Bioquímica 2a. ed.* Ed. Reverté 1985.pp:871, España.
154. Summerskill WHJ. On the origin and transfer of ammonia in the human gastrointestinal tract. *Medicine* 1966;45:491-496.
155. Summerskill WHJ, Wolpert E. Ammonia metabolism in the gut. *Am J Clin Nutr* 1970;23:633-639.
156. Summerskill WHJ, Wolfe SJ, Davidson CS. The management of hepatic coma in relation to protein withdrawal and certain specific measures. *Am J Med* 1957;23:59-76.
157. Swain M, Butterworth RF, Blei AT. Ammonia and related amino acids in the pathogenesis of brain edema in acute ischemic liver failure in rats. *Hepatology* 1992; 15: 449-453.
158. Tyler HR. Asterixis. *J Chron Dis* 1965;18:409-411.
159. Uribe M. Dietary management of portal systemic encephalopathy. Conn H, Bircher J. *Med Ed. Press.* East Lansing 1989.
160. Uribe M. Encefalopatía hepática en gastroenterología y hepatología. En: Berenguer J. Cap 55. Ediciones DAY MA, Barcelona, España, pp.720-732, 1992.

EFEECTO SINERGICO

161. Uribe M, Berthier JM, Lewis M, et al. Lactose enemas plus starch enemas in acute portal systemic encephalopathy. *Gastroenterology* 1981;81: 101-106.
162. Uribe M, Bosques F, Marín E. y cols. Derivación metabólica del amonio plasmático con benzoato de sodio como método de tratamiento en pacientes con cirrosis y encefalopatía portosistémica. Informe interino de un estudio multicéntrico doble ciego. *Rev Inv Clin* 1990; 42:149-151.
163. Uribe M, Bosques F, Poo JL, et al. A double blind randomized trial of sodium benzoate versus lactulose in patients chronic portal systemic encephalopathy. Abstract. *Hepatology* 1989; 8: 1449.
164. Uribe M, Campollo O, Vargas F y col. Acidifying enemas (lactitol and lactose) versus non acidifying enemas (tap water) to treat acute portal systemic encephalopathy. A double blind randomized controlled clinical trial. *Dig Dis Sci* 1987. In Press.
165. Uribe M, Farca A, Márquez MA, et al. Failure of bromocriptine in the management of chronic porto-systemic encephalopathy. *Gastroenterology* 1978;74:1156.
166. Uribe M, Farca A, Márquez MA, et al. Treatment of chronic portal systemic encephalopathy with bromocriptine. A double blind controlled. *Gastroenterology* 1979;76:1347-1351.
167. Uribe M, Gil S, Poo JL, Bosques F. Hyperammonemic hepatic encephalopathy treated with sodium benzoate. Final report of a double blind evaluation. Presentado en la reunión anual de la AASLD, Nov. 1989.

168. Uribe M, Guevara L. Encefalopatía hepática. En: Gastroenterología y hepatología. Berenguer J. Editorial Dogma, Barcelona España 1986:715-723.
169. Uribe M, Marín LE, Guevara L. Cap. 173. Pruebas de funcionamiento hepático. Vol.I. En: Uribe M. Tratado de medicina interna. Ed. Panamericana. p:1224-1233.
170. Uribe M, Marquez MA. Tratamiento de la encefalopatía hepática. En: Uribe M, Guevara L. Encefalopatía y coma hepático. Ed Salvat, 1a. ed. págs. 120-145. 1982.
171. Uribe M, Márquez MA, García-Ramos G, et al. Treatment of chronic portal systemic encephalopathy with vegetable and animal protein diets. Dig Dis Sci 1982;27: 1109-1116.
172. Uribe M, Marquez MA, García RG, et al. Treatment of chronic portal systemic encephalopathy with vegetable and animal protein diets: A controlled cross-over study. Dig Dis Sci, 1987; 27: 119-126.
173. Valle D, Simell O. The hyperornithinurias. Chapter 19. In: Scriver et al. The metabolic basis of inherited disease. Ed. McGraw Hill 6th.edition, 1989: 599-603.
174. Van der Rijt CD, Schalm SW, Meulstee J, et al. Flumazenil therapy for hepatic encephalopathy: a double blind cross-over study. Hepatology 1989; 10: 590.
175. Wallestein S, Zucker CL, Fleiss JL. Some statistical methods useful in circulation research. Cir Res 1980;47:1-9.

EFECTO SINERGICO

176. Weber FL. Encefalopatía hepática. En: Williams R, Maddrey W. Hígado ED. El manual moderno. 216-248. 1a ed.1987.
177. Westergard JO, Hunt MR. Clin Chem 1973;19:49.
178. Wiesdorf AS, Freese DK, Rodmer WJ, Penher LP, Cerra FB. Plasma amino acids in long term models for obstructive versus toxic liver injury in developing rats. J Pediatric Gastroenterol Nutr 1990; 10: 371-379.
179. Wilkinson SP, Jowen TP, Slater JDH. Renal sodium retention in cirrhosis relation to aldosterone an nephosite. Clin Sci. 1979; 56: 169-177.
180. Wolpert E, Phillipps, Summerskill WHJ. Transport of urea and ammonia production in the human colon. Lancet 1971;2:1387-1390.
181. Zaki AEO, Ede RJ, Davis M, Williams R. Experimental studies of blood-brain barrier permeability in acute hepatic failure. Hepatology 1984; 4: 359-363.
182. Zeneroli ML, Iuliano E, Racagni G, Baraldi M. Metabolism and brain uptake of gamma-aminobutyric acid in galactosamine induced hepatic encephalopathy in the rats. J Neurochem 1982; 38: 1219-1222.
183. Zieve L. Synergism between mercaptans and ammonia in the production of coma. J Lab Chron Med 1974;83:16-28.
184. Zieve L. The mechanism of hepatic coma. Hepatology 1981;1: 3605.
185. Zieve L, Doizaki WM, Zieve FJ. Synergism between mercaptans and ammonia or fatty acids in the production of coma. A possible role of

EFFECTO SINERGICO

- mercaptans in the pathogenesis of hepatic coma. *J Lab Clin Med* 974;83:16-28.
186. Zieve L, Lyftogt C, Raphael D. Ammonia toxicity: comparative protective effect of various arginine and ornithine derivatives, aspartate, benzoate, and carbamyl glutamate. *Metab Brain Dis* 1986; 1: 25-35.
187. Zieve L, Nicoloff MD. Pathogenesis of hepatic coma. *Ann Rev Med* 1975;26:143-157.
188. Zimmerman H. Direct (Toxicopathic) hepatotoxins: Haloalkanes and elemental phosphorus. En Zimmerman H. *Hepatotoxicity. The adverse effects of drugs and other chemicals on the liver.* Appleton-Century-Crofts. New York. Cap 9; 1978: 205.
189. Zimmerman HJ, Korn RJ. Observations on the source of elevated plasma ammonia levels in hepatic insufficiency. *Am J Med Sci* 1956; 231: 177-185.