



**PAPEL DEL IGF-1 EN LA PATOGENIA
DE LA ENCEFALOPATÍA HEPÁTICA.
ESTUDIO EXPERIMENTAL EN RATAS
SOMETIDAS A DERIVACIÓN PORTO-
CAVA.**

**UNIVERSIDAD DE SEVILLA
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA**

Sevilla, Junio de 2008

Proyecto de Tesis Doctoral presentado por el
Licenciado en Medicina y Cirugía
DANIEL DÍAZ GÓMEZ
para optar al grado de Doctor

Directores de Tesis:

Prof. Dr. MANUEL ROMERO GÓMEZ
Director de la Unidad de Gestión Clínica de
Enfermedades Digestivas
Hospital Universitario Ntra. Sra. de Valme

Prof. Dr. JOSÉ MARÍA ORTEGA BEVIÁ
Director del Departamento de Cirugía de la
Universidad de Sevilla

A Charo.
Gracias por todo tu apoyo, tan necesario siempre.

A Pablo y Fernando,
auténtica motivación para ser mejor cada día.

A Agustín y Ana María,
a los que debo todo lo que soy.

A mis pacientes.

AGRADECIMIENTOS

Quiero empezar esta breve reseña recordando al desaparecido Dr. D. Custodio Sarmiento Robles, entusiasta de la innovación quirúrgica, propulsor de este y otros proyectos desarrollados por ambos y verdadero amigo. Gracias por hacerme ver la trascendencia que tiene en nuestro trabajo mantener la inquietud por la exploración de las fronteras de la cirugía. D.E.P.

Quiero expresar mi afectuoso y sincero agradecimiento al Dr. D. Manuel Romero Gómez, por su experiencia y sabia dirección, que me han hecho encontrar la motivación para seguir cuando, a lo largo de estos años, faltaban las fuerzas para continuar este laborioso trabajo de investigación.

Al Profesor D. Jose María Ortega Beviá por aportar sus amplios conocimientos a la dirección de esta tesis doctoral.

Mi más sincero agradecimiento a la Dra. D^a. María Jover Cobos, farmacéutica responsable de los estudios bioquímicos y analíticos en las innumerables muestras biológicas. Sin su participación no hubiera sido posible llevar a buen puerto este proyecto.

A Pedro, Paco y a todo el personal del quirófano experimental del Hospital Universitario Virgen del Rocío. No tengo duda de que sin sus conocimientos, trabajo y hospitalidad jamás se hubiera concluido esta tesis.

Y en general, a todos aquellos que de forma directa o indirecta pusieron su grano de arena para ayudar a sacar esta obra adelante.

"A veces sentimos que lo que hacemos es tan solo una gota en el mar, pero el mar sería menos si le faltara una gota"

Madre Teresa de Calcuta (1910-1997)

- AAAs:** Aminoácidos Aromáticos
- AARs:** Aminoácidos Ramificados
- AM:** Amonio
- AMQ:** 6-Aminoquinolina
- AQC:** 6-Aminoquinolil-*N*-Hidroxi-Succinimidil-Carbamato
- BHE:** Barrera Hematoencefálica
- CH:** Cirrosis Hepática
- DPC:** Derivación Porto-Cava
- EAATs:** Receptores de Glutamato
- EDTA:** Ácido Etilen-Diamino-Tetraacético
- EH:** Encefalopatía Hepática
- EHM:** Encefalopatía Hepática Mínima
- GH:** Growth Hormone, Hormona de Crecimiento
- GLDH:** Glutamato Deshidrogenasa
- GLN:** Glutamina
- GLU:** Ácido Glutámico / Glutamato
- GMS:** Glutaminasa
- GS:** Glutamina-Sintetasa
- HAM:** Hiperamoniemia
- HC:** Hepatopatía Crónica
- HPLC:** High Performance Liquid Chromatography, Cromatografía Líquida de Alta Resolución
- HTP:** Hipertensión Portal
- IGF:** Insulin-Like Growth Factor, Factor de Crecimiento “Similar a la Insulina”
- IGFBP:** Insulin-Like Factor Binding Protein, Proteína Transportadora de IGF
- KHCO₃:** Bicarbonato Potásico
- LCR:** Líquido Cefalorraquídeo
- NADP, NADPH:** Dinucleótido Fosfatado Nicotinamida-Adenina
- NHS:** *N*-Hidroxi-Succinimidil

NMDA: Receptor de Glutamato *N*-Metil-*D*-Aspartato

ON: Óxido Nítrico

ONS: Óxido-Nítrico Sintetasa

RI: Resistencia a la Insulina

RIS: Respuesta Inflamatoria Sistémica

RL: Radicales Libres

RPBL: Receptor Periférico de Benzodiazepinas

ROS: Radicales Libres

ROC: Receiver Operating Characteristics, Características Operativas del Receptor

TCA: Ácido Tricloroacético

I. INTRODUCCIÓN	1
1. Encefalopatía Hepática.....	4
1.1. Fisiopatología	7
1.1.1. Papel del amonio	8
1.1.1.1. Interferencias con el metabolismo energético cerebral	12
1.1.1.2. Cambios estructurales en los astrocitos.....	13
1.1.1.3. Formación de edema cerebral de bajo grado.....	13
1.1.1.4. Disfunción de múltiples sistemas neurotransmisores del sistema nervioso central.....	16
1.1.1.5. Modificación de la expresión de las proteínas implicadas en la neurotransmisión.....	18
1.1.1.6. Inhibición de la transmisión por acción directa.....	19
1.1.1.7. Incremento de la actividad óxido-nítrico sintetasa.....	19
1.1.1.8. Contribución al estatus redox intracelular.....	21
2. Factores de Crecimiento “insulin-like” (IGF´s).....	26
2.1. Acciones “in vivo”	28
2.2. IGF-1 y hepatopatía.....	29
2.2.1. Influencia sobre el estado nutricional.....	31
2.2.2. Influencia sobre el metabolismo óseo.....	33
2.2.3. influencia sobre la atrofia testicular.....	34
2.2.4. Efectos “hepatoprotectores”.....	35
2.3. IGF como agente terapéutico.....	36
3. Modelos animales de hiperamonemia y encefalopatía.....	38
3.1. Modelos animales de hepatopatía crónica.....	41

3.1.1. Shunt portocava quirúrgico o congénito en perros.....	41
3.1.2. Cirrosis inducida en ratas por tetracloruro de carbono	42
3.1.3. Shunt portocava en ratas.....	42
3.1.4. Shunt portocava con manipulaciones adicionales.....	44
3.2. Anastomosis porto-cava experimental	45

II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....49

III. MATERIAL Y MÉTODOS.....53

1. Material biológico.....	53
1.1. Método anestésico.....	56
1.2. Técnica quirúrgica de derivación porto-cava.....	57
1.3. Eutanasia.....	62
2. Métodos.....	63
2.1. Aislamiento de tejidos y toma de muestras.....	63
2.2. Preparación de las muestras de tejidos.....	65
2.2.1. Muestras de enterocitos.....	65
2.2.2. Muestras de cerebro.....	66
2.2.3. Muestras de riñón.....	67
2.2.4. Muestras de hígado y músculo.....	68
2.3. Estudios bioquímicos.....	68
2.3.1. Determinación de amonio.....	68
2.3.1.1. Determinación de amonio en sangre.....	69
2.3.1.2. Determinación de amonio en tejidos.....	69
2.3.2. Determinación de óxido nítrico.....	70
2.4. Técnicas analíticas.....	71
2.4.1. Análisis de aminoácidos por HPLC.....	71
2.4.2. Protocolo de medida de IGF-1.....	74
2.5. Tratamiento con IGF-1	75
3. Equipos utilizados.....	77
4. Compuestos químicos y bioquímicos empleados.....	78

5. Análisis estadístico.....	78
IV. RESULTADOS.....	81
1. Estudio de la homogeneidad de la muestra.....	81
2. Tiempo de realización de las anastomosis.....	83
3. Influencia de la derivación porto-cava en el peso.....	84
4. Influencia de la derivación porto-cava en la producción de amonio.....	86
4.1. Medida de amonio en sangre.....	86
4.1.1. Definición del “Punto de corte” del amonio plasmático.....	87
4.2. Medida de amonio en tejidos.....	89
5. Influencia de la derivación porto-cava en el perfil de aminoácidos en sangre.....	96
6. Influencia de la derivación porto-cava en los niveles de óxido nítrico en sangre.....	98
7. Influencia de la derivación porto-cava sobre los niveles de IGF-1 en sangre.....	99
7.1. Relaciones de los niveles del IGF-1.....	100
7.1.1. Relación con el amonio plasmático.....	100
7.1.2. Relación con el cociente AARs/AAAs.....	101
7.2. Definición del “Punto de corte” del IGF-1.....	102
8. Efecto del tratamiento con IGF-1 sobre las ratas sometidas a derivación porto-cava.....	104
8.1. Efecto sobre el peso.....	104
8.2. Efecto sobre los niveles de amonio en sangre.....	107
8.3. Efecto sobre la cantidad de amonio presente en diferentes tejidos.....	108
8.4. Efecto sobre el perfil de aminoácidos en sangre.....	109
8.5. Efecto sobre los niveles de Óxido Nítrico en sangre.....	111

V. DISCUSIÓN	113
1. Resultados de la anastomosis porto-cava siguiendo la modificación técnica propuesta por Numata.....	113
1.1. Resultados de la técnica microquirúrgica.....	113
1.2. Efectos de la técnica quirúrgica sobre los parámetros propios de la hepatopatía.....	115
2. Influencia de la derivación porto-cava sobre los niveles de IGF-1.	136
3. Influencia del tratamiento con IGF-1rh sobre las ratas sometidas a derivación porto-cava.....	140
VI. CONCLUSIONES	145
VII. BIBLIOGRAFÍA	147



I. INTRODUCCIÓN

La hepatopatía crónica (HC) se define como la inflamación del hígado de duración superior a seis meses, que se suele manifestar por incremento de las transaminasas y un grado variable de insuficiencia hepatocelular. La cirrosis hepática (CH) es el término histológico que denomina el estadio evolutivo final de las HC y se caracteriza por necrosis hepatocelular y distorsión del lecho vascular, implicando una alteración difusa de la arquitectura del hígado debida a la aparición de fibrosis y nódulos de regeneración.

Las manifestaciones clínicas de la CH son consecuencia de las alteraciones morfológicas y funcionales que tienen lugar en el hígado. La disminución de la masa hepatocelular funcionante puede originar ictericia, edema, trastorno de la coagulación y diversas alteraciones metabólicas; la fibrosis y la distorsión vascular, junto al aumento de sustancias vasoconstrictoras como endotelina-1 y angiotensina-II y al descenso de sustancias vasodilatadores como el óxido nítrico intrahepático, conducen al desarrollo de hipertensión portal y posteriormente esplenomegalia, ascitis y varices esófago-gástricas. La encefalopatía hepática (EH) es consecuencia tanto de la insuficiencia hepatocelular como de la hipertensión portal (HTP)⁽¹⁾.

Las principales causas de CH en nuestro medio son el alcohol y el virus C (**Tabla-11**). Se estima que evolucionan hasta cirrosis hepática el 20% de los pacientes alcohólicos, al menos el 50% de los pacientes infectados por el virus de la hepatitis C y entre el 15-20% de los pacientes con infección crónica por el virus de la hepatitis B.

La CH se caracteriza por la presencia de necrosis hepatocelular, nódulos de regeneración y fibrosis. El resultado de los sucesivos procesos destructivos y reparativos es la alteración de la arquitectura hepática, con obstrucción del flujo sanguíneo sinusoidal y aparición de

cortocircuitos venosos portosistémicos. La consecuencia final es la perpetuación del daño celular y la aparición de la HTP, fenómenos de los que derivan todas las complicaciones de la enfermedad.

Enfermedades infecciosas	Medicamentos y tóxicos
Hepatitis virales (B, C, D) Citomegalovirus Virus Epstein-Barr Brucelosis Equinococosis Esquistosomiasis Toxoplasmosis Hidatidosis	Alcohol Alcaloides de pirrolidizina Amiodarona Anticonceptivos orales (Budd-Chiari) Arsenicales
Trastornos hereditarios y metabólicos	Otras causas
Atresia biliar Colostasis intrahepática familiar tipos 1-3 Déficit de α_1 -antitripsina Enfermedad de Gaucher Enfermedad de Wilson Enfermedad por depósito de glucógeno Galactosemia Hemocromatosis Intolerancia hereditaria a la fructosa Síndrome de Alagille Síndrome de Fanconi Tirosinemia hereditaria	Cirrosis biliar primaria Colangitis esclerosante primaria Cortocircuito yeyunoileal Esteatosis hepática no alcohólica Fibrosis quística Enfermedad de injerto contra huésped Obstrucción biliar crónica Sarcoidosis

Tabla-I1. Causas de Cirrosis Hepática y Hepatopatía Crónica.

El pronóstico de los pacientes cirróticos es difícil de valorar en conjunto, debido a la gran variedad etiológica que puede producir esta enfermedad. En términos generales podemos decir que las expectativas de los pacientes con CH compensada es razonablemente bueno y será peor en aquellos pacientes que tengan complicaciones. Es por ello que los pacientes compensados tienen una probabilidad de supervivencia a los 5 años del 50% en comparación con el 20% que suelen tener después de la primera descompensación.

La clasificación pronóstica más utilizada y aplicable a todo el conjunto de pacientes cirróticos es la de Child y Campbell modificada posteriormente por Pugh⁽²⁾ (**Tabla-I2**). En esta clasificación se valoran criterios clínicos y analíticos, incluyéndose los enfermos en tres grupos A, B y C. Consiste en un sistema de puntuación de 5 a 15 sumando las escores de cinco factores: bilirrubina sérica, albúmina sérica, presencia o no de ascitis, existencia de trastornos neurológicos y tiempo de protrombina. Unas puntuaciones de 5 y 6 corresponden a la clase A de Child-Pugh (“cirrosis compensada”), las puntuaciones de 7 a 9 indican clase B y las puntuaciones de 10 a 15 clase C. La supervivencia media de los pacientes pertenecientes a los grupos A, B y C sería de 5, 2 y 1 años respectivamente. Este sistema de puntuación es un método pronóstico razonablemente fiable de supervivencia en muchas enfermedades hepáticas y predice la probabilidad de desarrollar complicaciones graves de la cirrosis. En la actualidad se acepta como método de clasificación tanto en estudios prospectivos como retrospectivos.

Factor	Puntuación		
	1	2	3
Bilirrubina sérica $\mu\text{M/l}$ (mg/dl)	<34 (<2,0)	34-51(2,0-3,0)	>51 (>3,0)
Albúmina sérica g/l (g/dl)	>35(>3,5)	30-35(3,0-3,5)	<30 (<3,0)
Ascitis	No	Bien controlada	Mal controlada
Encefalopatía hepática	No	Mínimo	Coma avanzado
Tiempo de protrombina (segundos prolongados)	0-4	4-6	>6
(INR)	<1,7	1,7-2,3	>2,3

Tabla-I2. Clasificación de Child- Pugh de la cirrosis.

1. ENCEFALOPATÍA HEPÁTICA.

La EH es una grave complicación de la CH, tanto por sus serias manifestaciones clínicas, como por las necesidades terapéuticas e implicaciones pronósticas. A pesar de ello, la ausencia de pruebas diagnósticas que permitan tanto su diagnóstico como su prevención y la fuerte presencia de la disfunción hepática en su patogenia, han hecho que sea la complicación mayor de la CH menos estudiada.

La EH puede definirse como un síndrome neuropsiquiátrico complejo que acontece en pacientes con disfunción hepática o grandes comunicaciones portosistémicas. Se caracteriza por alteraciones de la conciencia y de la conducta, cambios de la personalidad, signos neurológicos fluctuantes, asterixis o “temblor aleante” y alteraciones electroencefalográficas características. La EH puede ser aguda y reversible o crónica y progresiva. En los casos graves puede aparecer un coma irreversible y producirse la muerte.

En un paciente con una cirrosis previamente estable, la EH suele ser consecuencia de un acontecimiento desencadenante fácil de identificar (**Tabla-I3**).

La EH se manifiesta de manera muy variable y puede presentarse cualquier alteración neurológica, incluidos déficits neurológicos focales. En los pacientes con encefalopatía aguda, los defectos neurológicos son completamente reversibles una vez se han corregido los factores desencadenantes subyacentes o ha mejorado la función hepática, pero en los pacientes con encefalopatía crónica estas alteraciones pueden ser irreversibles y progresivas. Con frecuencia existe edema cerebral que contribuye al cuadro clínico e incrementa la

mortalidad en el conjunto de pacientes con encefalopatía, aguda o crónica.

Aumento del aporte de nitrógeno	Fármacos
Hemorragia gastrointestinal Exceso de proteínas en la alimentación Hiperazoemia Estreñimiento	Opiáceos Tranquilizantes Sedantes Diuréticos (desequilibrios electrolíticos)
Desequilibrios electrolíticos y metabólicos	Varios
Hipopotasemia Alcalosis Hipoxia Hiponatremia	Infecciones

Tabla-I3. Principales factores desencadenantes de la Encefalopatía Hepática.

Recientemente se ha propuesto una nueva clasificación de la EH⁽³⁾, según la que se consideran tres tipos:

- **tipo A:** asociada a fallo hepático agudo.
- **tipo B:** asociada a la existencia de comunicaciones (by-pass) porto-sistémicos sin enfermedad hepática intrínseca.
- **tipo C:** asociada a CH.

La **EH tipo C**, a su vez, se clasifica en función de su forma de presentación:

- **EH episódica** o espontánea, en relación con factores precipitantes.
- **EH persistente**, subdividida a su vez en **leve** (EH grado I), **grave** (EH II-IV) o **dependiente del tratamiento** (se desarrolla precozmente tras la supresión del mismo).
- **EH mínima**, como primera manifestación de la EH.

La alteración del nivel de conciencia o la aparición de manifestaciones neurológicas en un paciente con CH suelen deberse a un episodio de EH *episódica*. No existe ninguna alteración patognomónica de esta entidad y siempre debe realizarse un diagnóstico de exclusión.

El desarrollo de EH condiciona un mal pronóstico a la enfermedad, de forma que se estima que la supervivencia se sitúa en torno al 15-23% a los 3 años de sufrir un episodio de EH clínica⁽⁴⁾. Por tanto, un reconocimiento precoz de las alteraciones neuropsicológicas que puedan predecir el desarrollo de esta complicación es fundamental en el manejo del paciente cirrótico.

Desde 1978 se han comunicado diferentes estudios sobre el diagnóstico de la EH mínima (EHM), llamada inicialmente latente o subclínica, dado que afecta a la calidad de vida, deteriora la capacidad de conducción y se considera la antesala para el desarrollo de episodios de encefalopatía hepática clínica. La EHM se define como la situación en la que los pacientes con CH compensada muestran un número cuantificable de defectos neurofisiológicos, a pesar de un estado mental y neurológico normal en la exploración clínica rutinaria⁽⁵⁾. La importancia diagnóstica de la EHM radica en aspectos tales como su alta prevalencia (25-33% de los pacientes con CH compensada) o su relación con un elevado riesgo de desarrollar EH clínica, por lo que se considera la manifestación más precoz del espectro de alteraciones clínicas que tienen lugar en el síndrome florido de la EH^(6;7). En un estudio prospectivo incluyendo 63 pacientes cirróticos se comprobó que 5 de cada 6 de los que desarrollaron durante su evolución encefalopatía hepática presentaban datos de EHM en el estudio basal⁽⁸⁾. Por ello pensamos que es fundamental la investigación sistemática de su presencia en el manejo del paciente cirrótico. Por otra parte, la EHM

deteriora la capacidad de conducción, llegando a afirmarse en alguna publicación que un 60% de cirróticos no fueron capaces de superar las pruebas de aptitud para la misma⁽⁹⁾. Sin embargo, un estudio posterior demostró que los pacientes con EHM no presentaron diferencias con un grupo control corregido por edad, sexo y profesión⁽¹⁰⁾ y más recientemente se ha publicado que estos pacientes requieren con más frecuencia la intervención del instructor para evitar accidentes de tráfico o errores en la conducción (36%) respecto a pacientes cirróticos sin EHM (6%) y controles (8%)⁽¹¹⁾. Las discrepancias entre los estudios pueden ser explicadas por los tamaños muestrales, la selección de los pacientes (en los referidos se incluyen pacientes con antecedentes de encefalopatía hepática clínica) y la duración del test de conducción (90 minutos frente a 30 minutos). Por último, la EHM condiciona alteraciones en la calidad de vida. En un estudio holandés se encontró que los pacientes cirróticos con EHM mostraban un deterioro en las funciones de la vida diaria, valoradas mediante un cuestionario de Perfil de Impacto de la Enfermedad (SIP)⁽¹²⁾, con mayor alteración en las categorías de tiempo libre, estado de alerta, tiempos de sueño/descanso, interacción social, gestión del hogar, comportamiento emocional y trabajo⁽¹³⁾. El deterioro en la aptitud laboral se podría considerar como el de mayor impacto sobre la calidad de vida, siendo especialmente importante la repercusión sobre profesiones necesitadas de destreza manual, ya que el déficit específico se acentúa sobre la función psicomotora y la inteligencia práctica, preservando la capacidad verbal⁽¹⁴⁾.

1.1. FISIOPATOLOGÍA.

En los últimos años se han desarrollado nuevos conceptos en la fisiopatología de la EH, esencialmente en relación con la mayor evidencia del papel del AM en su génesis y el mejor conocimiento de su

metabolismo en pacientes con CH, el descubrimiento de su importancia en el desarrollo del edema cerebral de bajo grado en la EH tipo C, la implicación del óxido nítrico intracerebral y, por último, el papel de la respuesta inflamatoria sistémica en su patogenia.

1.1.1. PAPEL DEL AMONIO.

De todas las sustancias estudiadas como responsables del desarrollo de EH, el AM es la neurotoxina más claramente implicada y analizada. Tiene un papel fundamental en la patogénesis de la EH e induce neurotoxicidad cuando alcanza al cerebro en concentraciones elevadas⁽¹⁵⁾. La primera evidencia de asociación entre EH y AM se remonta al siglo XIX, en el trabajo de Hahn y colaboradores, que describieron el “síndrome de intoxicación por carne”⁽¹⁶⁾. Observaron que en perros sometidos a derivación porto-cava la alimentación con comida rica en proteínas les ocasionaba estupor, desorientación y estado de coma. En los últimos 50 años, esta misma asociación entre los niveles altos de AM y las alteraciones del comportamiento se han descrito en pacientes con CH^(17;18).

La concentración de AM aparece frecuentemente elevada en la sangre de pacientes con diferentes tipos EH, encontrándose una correlación directa entre los niveles de AM y la severidad de los síntomas⁽¹⁹⁾. En voluntarios sanos, dicha concentración arterial de AM suele ser 45 $\mu\text{M/l}$ ⁽²⁰⁾, mientras que en pacientes con EH tipo C se detectan habitualmente niveles del orden de 60-80 $\mu\text{M/l}$ ⁽²¹⁾. Estudios recientes muestran que niveles de AM en sangre arterial por encima de 150 $\mu\text{M/l}$ en pacientes con fallo hepático agudo predicen una mayor probabilidad de muerte por daño cerebral⁽²²⁾.

Aunque en algunos estudios se ha detectado una clara relación entre los niveles de AM y la gravedad de la EH, en otros no se encuentra y, además, más de la mitad de los pacientes cirróticos sin EH presentan también hiperamonemia. Estas discrepancias pueden deberse a determinados factores que tienen influencia en los resultados de la determinación de la amoniemia.

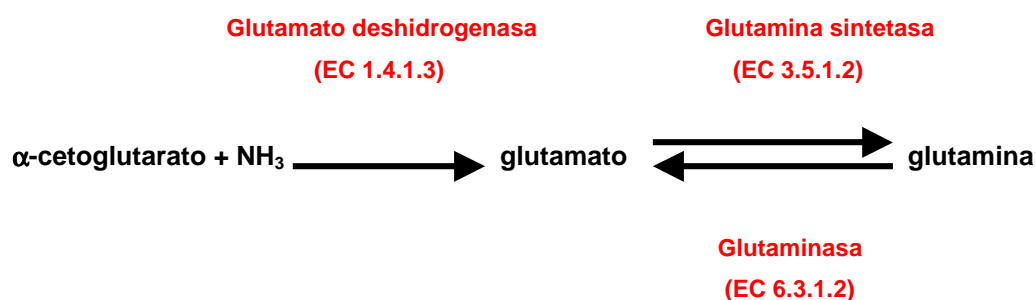
Lockwood y colaboradores presentaron la primera evidencia directa de la implicación del AM en la patogénesis de la EH en humanos utilizando tomografía por emisión de positrones y $^{13}\text{NH}_3$ como trazador⁽²³⁾. Dicho estudio reveló la acumulación de AM en el cerebro de pacientes con EH y enfermedad crónica hepática, en parte como consecuencia de una mayor permeabilidad de la barrera hematoencefálica (BHE). Esta facilidad para el paso del AM de la sangre al cerebro y el incremento resultante de la razón de concentración de AM en el cerebro y la sangre (cerebro/sangre) ofrece una explicación a una serie de observaciones empíricas. Por un lado, la reconocida hipersensibilidad de los pacientes cirróticos a las condiciones amoniogénicas, tales como la ingesta de dietas ricas en proteínas o la presencia de hemorragias gastrointestinales y, por otro, la correlación imperfecta del grado de disfunción neurológica con la concentración de AM en la sangre de dichos pacientes.

Existen diferentes factores que modulan la extracción cerebral de AM y su neurotoxicidad. Del 11⁽²⁴⁾ al 20%⁽²⁵⁾ del AM circulante pasa al cerebro a través de la BHE⁽²⁶⁾ (**Figura-11**) y la concentración de AM en el cerebro suele ser el doble que en la sangre de controles sanos, mientras que en pacientes con CH este cociente entre el AM cerebral y el plasmático está aumentado, siendo aproximadamente 4 veces superior el nivel de AM en el cerebro⁽²⁵⁾. El paso del AM desde la sangre hasta el cerebro a través de la BHE depende del pH sanguíneo,

aumentando en situaciones de alcalosis⁽²⁷⁾. Así, el flujo sanguíneo cerebral disminuye, se produce un mayor tiempo de contacto sangre-tejido y una mayor difusión, agravada también por un incremento de la permeabilidad de la BHE⁽¹⁵⁾.

Por tanto, todos estos factores que dependen tanto de las condiciones en las que se realiza la determinación de la amoniemia como del propio individuo, pueden explicar la amplia variabilidad de resultados comunicados respecto a la relación entre los niveles de AM y la gravedad de la EH tipo C.

La principal ruta metabólica del AM intracerebral es la incorporación al aminoácido glutamato (GLU) para formar glutamina (GLN), reacción catalizada por la enzima glutamina sintetasa (GS), localizada exclusivamente en los astrocitos⁽²⁸⁾. Un pequeño porcentaje de AM es metabolizado por vía de la aminación reductiva del 2-oxoglutarato a glutamato. Ambas reacciones están implicadas en el denominado **metabolismo cíclico del glutamato y la glutamina**, que tiene lugar entre astrocitos y neuronas.



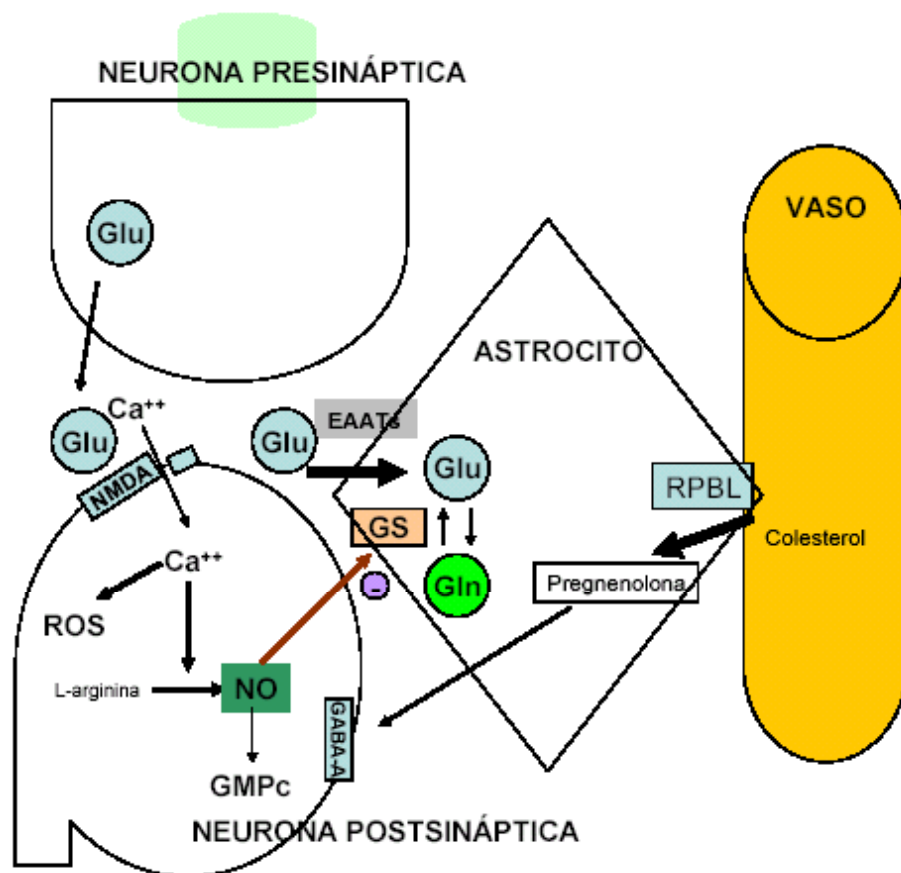


Figura-11. Representación esquemática simplificada del metabolismo del AM a nivel cerebral. Glu: Glutámico. Gln: Glutamina. GS: Glutamina sintetasa. EAATs: Receptores de glutamato. RPBL: Receptor periférico de benzodiazepinas. NMDA: Receptor de glutamato. RL: Radicales libres. NO: Oxido nítrico.

El incremento de GLN en el cerebro podría conducir a un aumento de la osmolaridad cerebral de manera considerable, por lo que dicho aminoácido es bombeado al interior de las células endoteliales donde es, al menos, parcialmente metabolizado hasta AM y GLU, el cual puede difundir posteriormente a través de la membrana luminal. De esta manera, el AM liberado desde el cerebro a la sangre estaría en un compartimento (células endoteliales) localizado del lado de la barrera astrocítica en contacto con la sangre.

El cerebro contiene, por lo tanto, las dos enzimas implicadas en el metabolismo de la glutamina, la GS y la glutaminasa (GMS). Sin embargo, estas enzimas están compartimentalizadas. Los astrocitos contienen la mayoría del total de la actividad GS cerebral⁽²⁹⁾ mientras que toda la actividad GMS se localiza en las neuronas⁽²⁸⁾.

Evidencias más recientes implican también a la transaminación del GLU a alanina como un importante paso en la transferencia intracelular de AM⁽³⁰⁾.

Aunque el AM es un metabolito importante que participa en diferentes rutas metabólicas, es tóxico a concentraciones elevadas⁽³¹⁾ y se ha propuesto la hipótesis de que induce el síndrome de la EH. En grandes concentraciones alcanza la BHE y produce lesiones cerebrales por diferentes mecanismos directos e indirectos:

1.1.1.1. INTERFERENCIAS EN EL METABOLISMO ENERGÉTICO CEREBRAL.

El AM cerebral estimula la glucólisis e inhibe el ciclo de los ácidos tricarboxílicos. Cuando las concentraciones del ión AM alcanzan niveles del orden milimolar, éste tiene la capacidad potencial de alterar el metabolismo energético cerebral a través de la inhibición de la enzima α -cetoglutarato deshidrogenasa⁽³²⁾, limitante en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos. Como consecuencia disminuye la incorporación al mismo del piruvato y se interrumpe el ciclo aerobio, lo que está respaldado por la presencia de altas concentraciones de lactato en el líquido cefalorraquídeo (LCR) de los pacientes con EH⁽³³⁾.

Por otro lado, la hiperamoniemia (HAM) genera una mayor expresión de receptores GLUT-1, encargados de introducir glucosa en el astrocito, lo que provoca una mayor glucólisis en dichas células, con el consiguiente aumento de la producción de lactato^(34;35). El incremento de lactato en el cerebro y en el LCR de los pacientes con disfunción hepática es directamente proporcional al deterioro de la función neurológica⁽³⁶⁾.

No obstante, el déficit energético consecuente de esta alteración inducida por la HAM solamente es apreciable en estadios avanzados de la enfermedad.

1.1.1.2. CAMBIOS ESTRUCTURALES EN LOS ASTROCITOS.

En estudio neuropatológicos se ha detectado la presencia de astrocitos Alzheimer tipo II tanto en cerebro de pacientes con EH tipo C⁽³⁷⁾ como en cultivos astrocitarios expuestos al AM⁽³⁸⁾. Se acepta que la HAM cerebral induce cambios estructurales en los astrocitos, de forma que éstos adquieren la morfología característica consistente en la aparición de un núcleo pálido, con nucleolo prominente y cromatina rechazada.

1.1.1.3. FORMACIÓN DE EDEMA CEREBRAL DE BAJO GRADO.

Parece que las alteraciones estructurales de los astrocitos Alzheimer tipo II son el resultado final de un proceso que comienza con el edema astrocitario. Se ha comprobado que en las situaciones de incremento del AM sanguíneo tienen lugar una serie de cambios ultraestructurales neuronales. Se produce un descenso en la expresión de la proteína ácida fibrilar glial, perteneciente al citoesqueleto y

encargada de la regulación del volumen celular⁽³⁹⁾. Por otro lado, la expresión de acuoporina IV, proteína de membrana que regula el movimiento de agua transmembrana, está elevada en cultivos de astrocitos sometidos a condiciones de HAM, lo que la implicaría en el desarrollo del edema astrocitario⁽⁴⁰⁾. Otro fenómeno promovido por los altos niveles de AM es el aumento de la permeabilidad mitocondrial de transición, que consiste en la apertura de un poro específico (PTP) en la membrana interna de la mitocondria, que permite el colapso de los gradientes iónicos, también implicado en el inicio del proceso de apoptosis celular⁽⁴¹⁾. Este fenómeno de aumento de la permeabilidad mitocondrial es inhibido por la ciclosporina A y favorecido por factores implicados en la patogénesis de la EH, como los radicales libres, el aumento del calcio intracelular, el óxido nítrico, el pH alcalino y la concentración de glutamina⁽⁴²⁾. La expresión de proteína ácida fibrilar glial, de acuoporina IV y de la permeabilidad mitocondrial de la transición están promovidos por la HAM e implicados en el desarrollo de edema astrocitario, base fundamental para el desarrollo de edema cerebral de bajo grado. Por otra parte, situaciones de hiponatremia o de aumento de producción de TNF se han asociado también al edema astrocitario⁽⁴³⁾.

El metabolismo cerebral del AM conduce a la síntesis y acumulación de GLN en el astrocito. La detección de altas concentraciones de la misma es la norma en estos pacientes, habiéndose demostrado niveles elevados en tejido cerebral de fallecidos en coma hepático, en muestras de LCR o en la resonancia magnética espectroscópica, que detecta altas concentraciones de GLN en los ganglios basales y en la corteza cerebral y, todo ello, a pesar de que la GS no se encuentra inducida. La GLN es un aminoácido osmótico y, por tanto, su acumulación en el astrocito puede favorecer el edema astrocitario (**Figura-I2**). La tríada detectada en pacientes con EH

tipo C se compone de elevación de GLN junto a descenso de mioinositol y colina⁽⁴⁴⁾. Todos estos datos emergen como resultado de la metabolización cerebral del AM hacia la síntesis de GLN, provocando esta acumulación una salida de otros metabolitos osmóticamente activos como el mioinositol y la colina.

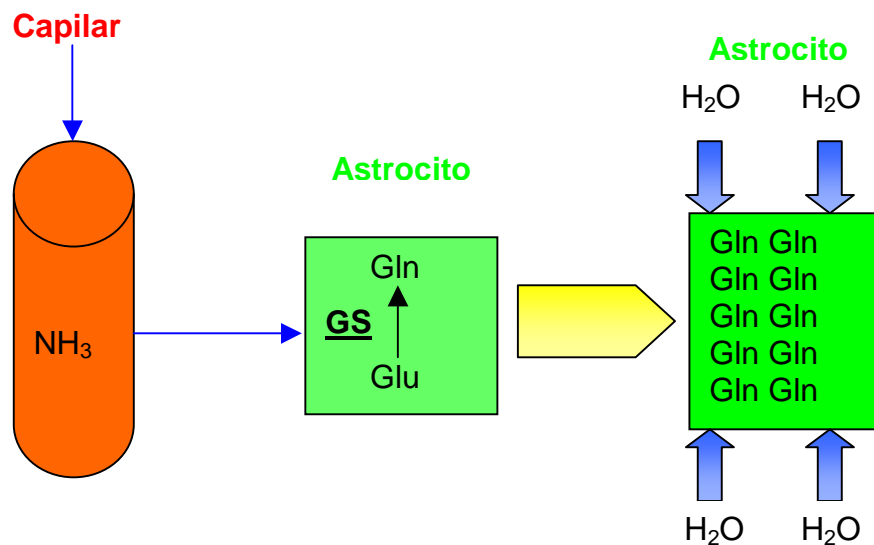


Figura-I2. Ilustración del edema producido por la acumulación de glutamina en los astrocitos, inducido por la HAM, que produce estrés osmótico y edema de los mismos. NH₃: amoníaco; GS: glutamina-sintetasa; Glu: Glutamato; Gln: glutamina; H₂O: agua.

Sin embargo, ha existido una gran controversia sobre el papel patogénico de la GLN intracerebral en la génesis del síndrome de EH. De hecho, algunos estudios han constatado que el bloqueo de la síntesis de GLN mediante metionina-sulfoximina conduce a un control de los niveles de GLN cerebrales pero no evita completamente el desarrollo de edema cerebral⁽⁴⁵⁾. Así también, el bloqueo de receptores glutamatergicos NMDA conduce a un aumento de la GLN cerebral sin que se desarrolle edema cerebral ni síntomas de EH⁽⁴⁶⁾. De todas

formas, el tratamiento con metoxamina-sulfoximina produce un descenso de los niveles de GLN al tiempo que se aprecia un efecto beneficioso sobre la EH⁽⁴⁷⁾. Por ello se ha especulado que podría ejercer su efecto beneficioso a través de otros efectos metabólicos, evitando quizás el aumento de la permeabilidad mitocondrial de la transición⁽⁴⁸⁾.

Por tanto, parece que la GLN es más una consecuencia de la HAM que la causa del desarrollo de edema y de la disfunción astrocitaria, que puede ser explicada por las modificaciones en la regulación de expresión de proteínas y receptores debidas al aumento del AM.

Recientemente se ha postulado que la entrada de GLN en la mitocondria permitiría su desdoblamiento a GLU y AM, por acción de la GMS, lo que perpetuaría la situación de HAM.

En pacientes con CH se ha detectado edema cerebral de bajo grado y se ha implicado en la patogenia de la EH. El edema astrocitario altera el funcionalismo del astrocito, de forma que no se desarrollan las principales funciones de mantenimiento del medio extracelular perineuronal, captación de potasio sobrante, liberación de neurotransmisores y canalización de las señales intercelulares cerebrales⁽⁴⁹⁾, lo que conllevaría una neurotransmisión defectuosa, con alteración del transporte de metabolitos entre el astrocito y la neurona y, por último, la disfunción neuronal y el desarrollo de EH.

1.1.1.4. DISFUNCIÓN DE MÚLTIPLES SISTEMAS NEUROTRANSMISORES DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL.

Como consecuencia del incremento de la GLN cerebral y con objeto de resolver la problemática del aumento de la osmolaridad se favorece la eliminación de dicho aminoácido por intercambio activo, a través de la BHE, con aminoácidos neutros y no osmóticamente activos del plasma, tales como Valina, Leucina, Isoleucina, Tirosina, Fenilalanina y Triptófano, lo que implica un aumento de dichos aminoácidos en el cerebro⁽⁵⁾. Como consecuencia del aumento del catabolismo muscular y/o de un defecto de la desaminación hepática⁽⁵⁰⁾, la concentración plasmática de los aminoácidos aromáticos es mayor que la de los aminoácidos ramificados, por lo cual el intercambio se hace fundamentalmente con los aminoácidos aromáticos, incrementándose éstos de manera notable en el sistema nervioso central. El resultado de esto es la síntesis de falsos neurotransmisores como la octopamina y la feniletanolamina, que compiten con las catecolaminas y la dopamina, neurotransmisores habituales⁽⁵¹⁾.

El Ácido Glutámico es un aminoácido con una actividad neuroexcitadora muy potente en el cerebro. En las células gliales o los astrocitos se canaliza para la detoxificación del AM, de manera que la HAM conlleva la depleción del GLU neuronal metabólicamente activo⁽³⁵⁾. Además, actúa como precursor de otros sistemas de neurotransmisores excitadores (aspartato) e inhibidores (GABA)⁽⁵²⁾, por lo cual la alteración en su metabolismo en el cerebro conlleva a un desequilibrio de la neurotransmisión a muy diferentes niveles.

Puesto que en algunos estudios se comunicó cierta falta de correlación entre el grado de EH y los niveles de AM sanguíneos (venoso o arterial), se consideraron otros factores implicados en la génesis del síndrome de EH. Además de los anteriormente expuestos podría tenerse en cuenta el aumento del tono gabaérgico, por el

incremento en el número o de la sensibilidad de los receptores cerebrales de GABA/Benzodiazepinas, o bien por la presencia en la sangre de sustancias semejantes a las benzodiazepinas (*benzodiazepin-like*), endógenas, de origen intestinal ⁽⁵³⁾.

A pesar de los diferentes indicios encontrados por algunos grupos, las diferentes hipótesis de los “falsos neurotransmisores” han ido progresivamente sumando datos en contra a lo largo de los últimos años, de forma que hoy día no se aceptan como causas patogénicas directas en la EH.

1.1.1.5. MODIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS IMPLICADAS EN LA NEUROTRANSMISIÓN.

La expresión de la enzima Monoamino-Oxidasa-A está aumentada en pacientes con EH. Está localizada en la membrana externa mitocondrial de las neuronas monoaminérgicas y es la encargada de metabolizar la serotonina. Un aumento de su actividad deteriora la neurotransmisión serotoninérgica. Se ha especulado que esta alteración podría ser responsable de la alteración del ritmo del sueño y de las modificaciones de la conducta ⁽⁵⁴⁾.

El receptor periférico de benzodiazepinas es un complejo heterodímero proteico localizado en la membrana externa de la mitocondria de células no neuronales (básicamente astrocitos). El aumento de la densidad de receptores se correlaciona con la gravedad del deterioro cognitivo detectado en pacientes con EH. Este receptor podría estar implicado en la patogenia de la EH por la capacidad de aumentar el transporte de colesterol al interior de la mitocondria, lo que provoca la síntesis de neuroesteroides, que son potentes estimuladores

del receptor GABA-A, lo que favorece la neuroinhibición⁽⁵³⁾. Por otro lado, juegan un papel primordial en el mantenimiento del metabolismo celular, al formar parte del poro de la transición, implicado en la regulación de la permeabilidad mitocondrial y por tanto, puede estar implicado en el desarrollo de edema de bajo grado.

La HAM puede modificar intensamente la neurotransmisión glutamatergica, mediante la modulación de la expresión de proteínas transportadoras en el astrocito. Una infraexpresión de receptores EAAT-2 provoca un aumento del GLU extracelular, impidiendo su recaptación hacia el astrocito y, por tanto, dificultando la síntesis de GLN en el interior del astrocito, evitando así la detoxificación del AM⁽⁵⁵⁾.

El transportador GLYT-1 que transporta glicina, un neurotransmisor neuroinhibidor también se encuentra infraexpresado en la EH, provocando acumulación de glicina extracelular, lo que a su vez puede provocar en la sinapsis una alteración en la excitabilidad neuronal⁽⁵⁶⁾.

1.1.1.6. INHIBICIÓN DE LA TRANSMISIÓN POR ACCIÓN DIRECTA.

El AM *per se* puede modificar tanto la inhibición postsináptica como la neurotransmisión excitadora en cerebro y cordón espinal, lo primero por bloqueo de la liberación de cloro en las neuronas postsinápticas y lo segundo por depresión de la transmisión sináptica^(57;58).

1.1.1.7. INCREMENTO DE ACTIVIDAD ÓXIDO NÍTRICO SINTETASA.

En animales con DPC se ha puesto de manifiesto el incremento de la actividad cerebral de la enzima óxido nítrico sintetasa (ONS) lo que conlleva un aumento de la producción de óxido nítrico (ON). El AM estimula la captación de L-arginina⁽⁵⁹⁾, aminoácido precursor de la síntesis de ON, pudiendo este ser uno de los mecanismos implicados en las mayores actividad de ONS y producción de ON.

Además se ha descrito que L-arginina puede actuar también como precursor del GLU, por lo que es posible que la mayor recaptación de L-arginina astrocitaria secundaria a la HAM pueda derivar en un aumento en la producción de GLN derivada del GLU⁽⁶⁰⁾.

Otro de los mecanismos que puede estar implicado en la activación de la enzima ONS por la HAM se describe a continuación. En situaciones de aumento de AM el daño cerebral tiene lugar esencialmente por la hiperestimulación de los receptores NMDA de GLU en la neurona postsináptica. La estimulación de los receptores NMDA produce la entrada de calcio al interior de la célula con la consecuente activación de la calmodulina, que a su vez estimula la actividad ONS neuronal, produciendo altos niveles de ON que difunden hasta el astrocito y bloquean la actividad GS, mediante su nitrosilación, inhibiendo por tanto la única vía de detoxificación de AM⁽⁶¹⁾.

La producción mayor de ON en el cerebro podría ser responsable del estrés oxidativo, de las alteraciones de la perfusión cerebral, caracterizado por una redistribución córtico-subcortical⁽⁶²⁾, así como en el desarrollo de edema cerebral y el consiguiente deterioro cognitivo⁽⁶³⁾, eventos descritos tanto en modelos experimentales como en humanos con fallo hepático crónico⁽⁶⁴⁾.

1.1.1.8. CONTRIBUCIÓN A LA ALTERACIÓN DEL ESTATUS REDOX INTRACELULAR.

En pacientes con EH se ha detectado lipofucsina en el interior de los astrocitos Alzheimer tipo II, reflejando la existencia de peroxidación lipídica⁽⁶⁵⁾. Por otro lado, la formación de radicales libres tiene lugar en astrocitos cultivados en HAM⁽⁶⁶⁾. Se ha demostrado que el aumento del AM incrementa a su vez la producción de radicales libres superóxidos y disminuye la actividad de enzimas antioxidantes en el cerebro⁽⁶⁷⁾.

El Glutation es uno de los más importantes antioxidantes intracelulares, sintetizado a partir de los aminoácidos GLN y GLU. El cerebro es especialmente susceptible al daño oxidativo y el glutatión es el principal protector contra los efectos perjudiciales de los radicales libres. En el caso de que ambos aminoácidos se encuentran alterados debido a la HAM, no se favorece la síntesis de éste antioxidante, con las implicaciones patológicas que ello conllevaría⁽⁶⁸⁾. Para evitarlo, se ha utilizado GLN como suplemento de dietas clínicas para mantener niveles adecuados de glutatión y disminuir el daño por estrés oxidativo⁽⁶⁹⁾.

Aunque no es un mecanismo patogénico del ion AM, se ha de mencionar que ciertos componentes de la respuesta inflamatoria sistémica (RIS) como el factor de necrosis tumoral u otras citoquinas del tipo de la IL-6 o la IL1 β pueden potenciar el efecto neurotóxico del AM⁽⁷⁰⁾.

En pacientes con fallo hepático fulminante y EH, la existencia de una RIS provoca un agravamiento rápido de dicha encefalopatía. La RIS tiene lugar frente a numerosas agresiones y se caracteriza por la

presencia de al menos dos de los siguientes parámetros⁽⁷¹⁾: fiebre (temperatura $>38^{\circ}\text{C}$) o hipotermia (temperatura $<36^{\circ}\text{C}$), taquicardia (frecuencia cardíaca > 90 spm), taquipnea (frecuencia respiratoria > 20 rpm), hipocapnia (presión parcial de CO_2 en sangre arterial < 32 mm Hg.) o leucocitosis (>12.000 células/ mm^3). Las citoquinas liberadas en esta situación pueden alcanzar el cerebro e interactuar con sus receptores en las células endoteliales o pueden ser generadas en el propio astrocito. La interleucina- 1β , secretada por los astrocitos, provoca un aumento de la liberación de ON, de radicales libres y de prostaglandinas, que son elementos favorecedores de la neurotoxicidad por AM. Así también, estas citoquinas pueden modular la neurotransmisión glutamatergica, ya que inhiben la recaptación astrocitaria de GLU, impidiendo la detoxificación del AM⁽⁷²⁾. Por último, citoquinas como el factor de necrosis tumoral puede modular el flujo sanguíneo cerebral, al mismo tiempo que está implicado en la patogenia de la EH, ya que se ha demostrado que puede inducir edema astrocitario⁽⁷³⁾. Por ello, la RIS, podría formar parte del repertorio patogénico de la EH, ya que favorecería la toxicidad del AM y además podría implicarse en el desarrollo de edema cerebral de bajo grado. Recientemente, se ha constatado que la RIS influye directamente en la aparición de las manifestaciones clínicas de la EH. En pacientes con RIS sometidos a HAM provocada por la ingesta de una solución de aminoácidos similar a la hemoglobina (simulando una hemorragia digestiva) se detectan manifestaciones clínicas de EH. En cambio, una vez controlado en estos pacientes el evento infeccioso y habiendo desaparecido la RIS, la provocación de una HAM de cuantía similar no se acompaña de manifestaciones clínicas de EH⁽⁴⁰⁾. Estos datos avalan fuertemente el papel de la RIS en la patogenia de la EH y su capacidad para favorecer la neurotoxicidad del AM.

La **teoría de la neurotoxicidad del AM** tiene diferentes elementos a favor (**Figura-I3**):

1. El 90% de los pacientes con EH presentan niveles altos de AM en sangre.

2. La HAM origina disfunción cerebral tanto en animales de experimentación como en personas con alteración del ciclo de la urea.

3. En el LCR se encuentran valores altos de GLN, vía de detoxificación cerebral de AM, que se correlacionan con el grado de EH.

4. Situaciones que aumentan la producción de AM intestinal (dieta rica en carnes, hemorragia digestiva, estreñimiento, etc.) son factores desencadenantes de EH.

5. Los tratamientos encaminados a disminuir los niveles de AM en sangre son efectivos en el tratamiento de la EH. Las sustancias inhibitoras de la actividad ureasa, como el ácido nicotínico-hidroxámico, también mejoran los síntomas de la EH, bloqueando únicamente la producción de AM.

Pero también tiene elementos en contra:

1. El 10% de los pacientes con EH no presentan hiperamoniemia, y muchos pacientes con niveles altos de AM en sangre no presentan síntomas de EH.

2. Los niveles de AM no se correlacionan con el grado de EH. En animales de experimentación, las dosis requeridas para producir EH son muy superiores a los niveles encontrados en pacientes con hepatopatía y EH.

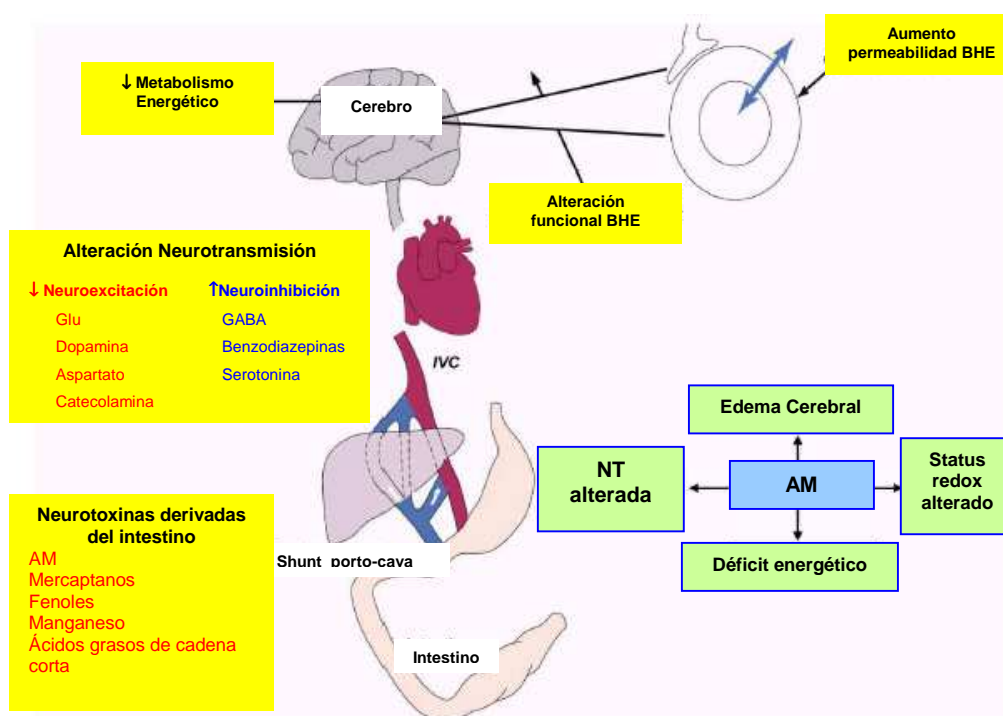


Figura-I3. Representación esquemática de los diferentes factores involucrados en la patogénesis de la EH.

En los últimos años estos elementos en contra han perdido importancia. Entre otras razones, por la falta de homogeneidad en la determinación de los niveles séricos de AM de los diferentes estudios y porque no se ha controlado los numerosos factores que pueden influir en el resultado de la prueba. Esto hace que los estudios no sean ni comparables ni rigurosos. Aunque parecería razonable que la amoniemia arterial reflejase de forma más fidedigna la concentración de AM tóxico, se ha comprobado que la amoniemia arterial, venosa o la presión parcial de AM, muestran un valor de correlación con el grado de EH similar entre ellas, por ello, la amoniemia venosa, aunque imperfecta, puede ser suficiente en el manejo del paciente con EH⁽⁷⁴⁾.

Así mismo, se ha postulado que el aumento que se produce en la permeabilidad de la BHE al AM también podría explicar la falta de

correlación entre los niveles de AM en plasma y el grado de la EH. La explicación de esto se ha expuesto previamente.

2. FACTORES DE CRECIMIENTO “INSULIN-LIKE”.

Los hepatocitos son la principal fuente de la hormona conocida como factor de crecimiento “similar a la insulina” (IGF, siglas de su nombre inglés “insulin-like growth factor”) circulante, un potente mediador anabolizante que participa en el crecimiento y función de la casi totalidad de los órganos del cuerpo⁽⁷⁵⁾ y cuya secreción es estimulada por la hormona de crecimiento (GH por las siglas inglesas de “growth hormone”). Los IGF’s estimulan el crecimiento y el metabolismo a través de su unión con su receptor celular, lo que a su vez activa la fosforilación de la tirosina, que desencadena una cascada muy similar a la originada por la insulina⁽⁷⁶⁾.

Los IGF’s fueron descubiertos por su capacidad de estimular la sulfatación del cartílago en un ensayo realizado “in vivo”⁽⁷⁷⁾. El significado de este hallazgo inicial se extendió rápidamente, describiéndose también su papel en la estimulación de la síntesis de ADN, de proteoglicanos, de glucosaminoglicanos y de proteínas. Más tarde se encontró que la sulfatación de los cartílagos se podía estimular añadiendo GH a los animales de experimentación hipofisectomizados, pero no en cambio en cultivos titulares de cartílago de esos mismos animales, lo que sugirió que dicho crecimiento se veía inducido “in vivo” por un mediador de la GH⁽⁷⁸⁾. En virtud de su diversidad de acciones estimuladoras y del hecho de que la GH en esa época se conocía como “somatotropina”, se modificó su nombre inicial de “factor de sulfatación” por el de “somatomedina” (mediador de los efectos de la somatotropina), incluyéndolo en diferentes clasificaciones junto a otros factores de crecimiento emergentes como el “factor de crecimiento derivado de plaquetas”, el “de fibroblastos” o el “epidérmico”⁽⁷⁹⁾. Paralelamente a estos estudios en los que se descubrieron las mediaciones estimuladoras del IGF-1 se describieron también factores

presentes en el suero que realizaban acciones estimuladoras similares a la de la insulina, pero que no se veían suprimidos ante la exposición a los anticuerpos anti-insulina, por lo que se les denominó “factores con actividad insulin-like no suprimible”⁽⁸⁰⁾. Hacia finales de los 70 se descubrieron las secuencias de aminoácidos que constituían estas proteínas, comprobándose que las somatomedinas y los “factores con actividad insulin-like no suprimible” eran similares entre sí y que a su vez coincidían en un 48% con la secuencia de aminoácidos de la proinsulina, renombrándose como IGF⁽⁸¹⁾ (**Figura-I4**), del que más adelante se describió una segunda forma, con un 70% de semejanza en su secuencia de aminoácidos con la anterior, denominándose ambas como IGF I y II⁽⁸²⁾. IGF-I e IGF-II son las principales hormonas mediadoras de la acción de la GH en el suero humano⁽⁷⁵⁾.

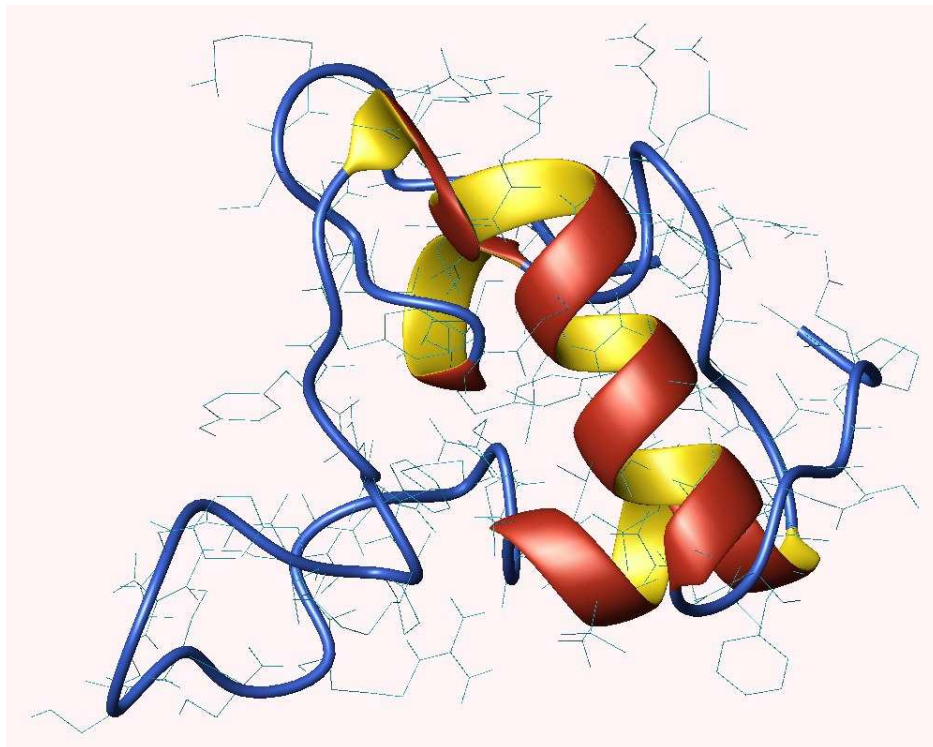


Figura-I4. Estructura tridimensional del IGF-1.

2.1. ACCIONES “IN VIVO” DEL IGF-1.

El modelo de las somatomedinas establece que la GH actúa controlando los niveles de IGF-1, mientras éste tiene función a nivel celular. Dicho modelo se postuló suponiendo que se trataba de hormonas circulantes secretadas por el hígado en respuesta a GH. Sin embargo, el 80% del IGF-1 circula unido a proteínas “ligantes” (conocidas como IGFBP, siglas de su nombre en inglés “insulin-like growth factor binding proteins”), especialmente a la IGFBP-3, formando con ella un complejo de alto peso molecular y fuera de la acción de la GH. De esta forma la IGFBP-3 “secuestra” la mayor parte del IGF-1 en el torrente circulatorio, prolongando su vida media y actuando como auténtico “reservorio” del mismo. Las IGFBP’s actúan generalmente inhibiendo la acción de los IGF’s, ya que se unen competitivamente a ellos y reducen su biodisponibilidad⁽⁷⁶⁾. En realidad, los IGF’s son también ampliamente sintetizados localmente en órganos y tejidos, donde cumplen importantes funciones autocrinas y paracrinas⁽⁷⁸⁾. La GH, la hormona paratiroidea (PTH) y los esteroides sexuales regulan la producción de IGF-1 en el hueso, mientras estos mismos esteroides son los que principalmente regulan su producción local en los órganos reproductores⁽⁸³⁾.

Cuando se administra IGF-1 a ratas sanas se produce hipoglucemia por estimulación de la captación periférica y mínima supresión de la producción hepática de la glucosa⁽⁸⁴⁾. Sus efectos anabólicos en la síntesis protéica en animales se han estudiado con varios tipos de estímulos catabólicos como los corticoides o la restricción de proteínas en la dieta⁽⁸⁵⁾. IGF-1 también estimula la síntesis proteica en ratones con deficiencia de GH⁽⁸⁶⁾ e incrementa el peso corporal total en ratas hipofisectomizadas. Cuando se administra directamente en la luz intestinal produce un efecto trófico en el

epitelio⁽⁸⁷⁾. Puede, además modificar el patrón de proteínas ligantes circulantes, pues se ha comprobado en ratas hipofisectomizadas o sometidas a dieta sin proteínas que éstas bajan en plasma, pero que sus niveles se restablecen cuando se les infunde IGF-1⁽⁸⁸⁾.

En ratas diabéticas por deficiencia de insulina se han comprobado niveles plasmáticos bajos de IGF-1 y menor crecimiento, que se restauran cuando se infunde IGF-1⁽⁸⁹⁾. Mientras que tanto la insulina como el IGF-1 administrado a ratas diabéticas restauran los patrones de crecimiento globales, se ha comprobado que la insulina causa un aumento proporcionalmente mayor de la grasa y que el IGF-1 aumenta más el peso a expensas de los órganos y el músculo⁽⁹⁰⁾.

Múltiples órganos distintos del hígado también sintetizan IGF-1, que generalmente actúa en los mismos de forma autocrina y paracrina. El hueso es uno de las principales dianas para el IGF-1, no solo durante el crecimiento, sino también durante la edad adulta⁽⁹¹⁾. De hecho, el IGF-1 estimula la proliferación y diferenciación osteoblástica, actuando a través de receptores específicos presentes en las células de la línea osteoblástica y en las células endoteliales derivadas del hueso. Se piensa que el IGF-1 juega un papel central en el proceso de la remodelación ósea y, por tanto, en el mantenimiento de la masa ósea. Además, distintos estudios clínicos han demostrado los efectos beneficiosos del tratamiento con IGF-1 humano recombinante sobre el hueso en diferentes condiciones clínicas⁽⁹²⁻⁹⁵⁾.

2.2. IGF-1 Y HEPATOPATÍA.

Como es sabido, la síntesis de IGF-1 depende de la acción de la GH, que a su vez está alta en la acromegalia y baja en el hipopituitarismo. Además, las concentraciones séricas de IGF-1 se

afectan de forma importante por el estado nutricional y en diferentes patologías⁽⁹⁶⁾. En pacientes con hepatopatía crónica se han descrito niveles plasmáticos bajos de IGF-1, de origen no completamente aclarado, pero atribuido tanto a un descenso en su síntesis en el hígado enfermo⁽⁹⁷⁾ como a la malnutrición que les suele acompañar, y siempre a pesar de que en estos pacientes la secreción de GH se encuentra elevada. Además, se han correlacionado la disminución de la concentración plasmática de IGF-1 con el grado de disfunción hepática, de modo que presentan niveles más bajos los enfermos con estadios C de Child que los B ó A. Sin embargo, no se correlacionan los niveles bajos de IGF-1 con los parámetros indicativos de mayor actividad de la enfermedad hepática, lo que sugeriría que los cambios en la producción de IGF-1 son independientes del grado de inflamación^(98;99).

Entre los distintos mecanismos de modulación de la función biológica del IGF-1 se encuentra la alta afinidad específica que esta hormona presenta a sus proteínas ligantes (IGFBP's), presentes tanto en el plasma como en otros compartimentos y de las que hay descritos 6 subtipos (denominadas IGFBP desde la 1 a la 6)^(78;96;100). Dichas proteínas se sintetizan también en el hígado, siendo la IGFBP-3 la única que forma un complejo de alto peso molecular al asociarse en el plasma al IGF-1. Este complejo constituye la forma principal del IGF-1 circulante, prolongando su vida media y funcionando como un verdadero "reservorio" sérico de esta hormona. La forma libre del IGF-1 no ligada constituye un porcentaje escaso de su cantidad total, pero a ella se le achacan al menos las acciones agudas del IGF-1. Scharf y colaboradores han comunicado recientemente niveles plasmáticos bajos en pacientes con hepatopatía severa tanto de IGF-1 total como de las IGFBP's. Estudiaron la respuesta en forma de producción de IGF-1 e IGFBP's de hígados sanos, con hepatopatía leve y severa, tras la infusión de GH. En la cirrosis decrece la cantidad de IGF-1 sérica, tanto

libre como ligada, al compararlos con los controles sanos o la hepatopatía leve, modificándose también el patrón de IGFBP's, con disminución de la cantidad de IGFBP-3 y aumento de IGFBP-1 y 2. Donaghy y colaboradores comprobaron además que disminuye la respuesta productora de IGF-1 en el hígado severamente enfermo tras la infusión de GH, cuando se les compara con pacientes a los que se administró placebo⁽¹⁰¹⁾.

2.2.1. INFLUENCIA SOBRE EL ESTADO NUTRICIONAL.

El estado nutricional afecta finalmente a las concentraciones séricas de IGF-1, puesto que tanto el ayuno total como la disminución de la ingesta proteico-calórica conllevan distintos grados de resistencia a la GH. Estas condiciones se asocian a una disminución de la señal transmitida por el receptor de GH, lo que a la postre se traduce en la reducción de la secreción de IGF-1 en el hígado. Por ello, pese a que el IGF-1 es una hormona anabolizante, la malnutrición acarrea un estado catabólico⁽¹⁰²⁾ y parece que el déficit de IGF-1 puede ser a la vez consecuencia y parcialmente responsable del estado nutricional deficitario de los pacientes cirróticos.

En pacientes con CH se producen trastornos del metabolismo intermediario que afectan a múltiples vías bioquímicas y que llevan a un deterioro progresivo del estado nutricional, similar al que tiene lugar en la malnutrición proteico-calórica. Esto se ha observado tanto en humanos como en los modelos animales de cirrosis, en especial en los estadios más avanzados, cuando se presenta la ascitis. Múltiples factores se han relacionado con esta malnutrición, pero las alteraciones unidas a la lesión hepática y el deterioro asociado del estado nutricional aun no están completamente aclarados. Frente a los pacientes con cirrosis avanzada, los que la tienen compensada raramente presentan

manifestaciones clínicas de malnutrición⁽¹⁰³⁾, si bien parece que los mecanismos que finalmente llevan a la misma ya se encontrarían en los estadios iniciales, aunque compensados. Hasta el momento, el único procedimiento efectivo que se conoce para corregir la malnutrición de los pacientes cirróticos es el trasplante hepático, si bien hay pocos trabajos que hayan propuesto algún otro tipo de tratamiento⁽¹⁰⁴⁾. Dado que los niveles plasmáticos de IGF-1 se encuentran muy mermados en los estadios avanzados de las hepatopatías y en virtud de las acciones anabólicas que se le atribuyen, podría plantearse, al menos a nivel teórico, la utilidad de esta hormona para mejorar el estado nutricional de dichos enfermos. Picardi y colaboradores⁽¹⁰²⁾ administraron dieta enriquecida con el isótopo del nitrógeno ¹⁵N a ratas sanas y cirróticas por inhalación de tetracloruro de carbono (éstas divididas en 2 subgrupos a los que se administró tratamiento con IGF-1 y placebo respectivamente). Las ratas cirróticas a las que se administró placebo presentaron reducción significativa de la ingesta de nitrógeno y de la eficiencia de la dieta respecto a los controles. Sin embargo, las tratadas con IGF-1 presentaron valores de ingesta de nitrógeno, eficiencia de la dieta y cantidad de nitrógeno de la dieta incorporado al músculo similares a los de los controles, y significativamente más altos que los del grupo no tratado.

Los carbohidratos constituyen en los humanos la principal fuente de energía de la dieta y, para ser asimilados, han de ser escindidos previamente en monosacáridos. La captación de glucosa y galactosa por los enterocitos está mediada por una proteína de cotransporte de sodio/glucosa-galactosa que se localiza en la membrana del borde “en cepillo”. Este sistema cotransportador requiere energía derivada de los gradientes eléctricos y de sodio que se producen a ambos lados de la membrana celular. Uno de los mecanismos postulados para explicar los trastornos nutricionales encontrados en los pacientes cirróticos ha sido

el empeoramiento de la digestión y/o absorción de los nutrientes por vía digestiva, pero nunca se ha descrito en estos pacientes la malabsorción de un nutriente concreto como resultado del fallo de un sistema específico de transporte intestinal. Castilla Cortázar y colaboradores demuestran en un estudio experimental en ratas que la absorción de azúcar se encuentra alterada en los estadios no terminales de la cirrosis inducida. Este defecto funcional se acompaña de cambios estructurales en los enterocitos, el más llamativo de los cuales es la elongación de los *microvilli*. Aunque en este trastorno pueden participar tanto la hipertensión portal como la función hepática alterada, en el mencionado estudio se encuentra que el defecto revierte en el grupo de animales cirróticos que se somete a tratamiento con IGF-1, lo que sugeriría que el déficit de esta hormona jugaría un papel central en la génesis del trastorno^(105;106). En recientes estudios publicados por el mismo grupo^(107;108) se analizaron las absorciones intestinales de D-galactosa, L-leucina, L-prolina, L-ácido glutámico y L-cisteína en ratas con cirrosis inducida por tetracloruro de carbono en estadios avanzados (con ascitis), confirmándose que el transporte de todos los nutrientes se encontraba significativamente disminuido en los animales enfermos, pero que se normalizaba siempre tras la administración de IGF-1 en dosis bajas a dichos animales cirróticos. Además se encontró que la alteración en los *microvilli* que aparecía en la cirrosis compensada, consistente básicamente en su elongación, pasaba en los estadios avanzados a ser de atrofia y desaparición de los mismos.

2.2.2. INFLUENCIA SOBRE EL METABOLISMO ÓSEO.

La prevalencia de osteopenia en los pacientes cirróticos es significativamente mayor que en los grupos de edad similares de la población sana. Como consecuencia, estos pacientes se ven expuestos a un mayor riesgo de fracturas óseas, lo que supone una fuente

importante de morbilidad tanto en cirróticos severos como en trasplantados. La patogénesis de la osteopenia de estos enfermos no está completamente esclarecida, aunque la malabsorción, la desnutrición, la deficiencia de vitamina D, los menores niveles de hormonas sexuales y la toxicidad directa del alcohol parecen factores implicados en la alteración del metabolismo óseo. Como anteriormente ya ha sido mencionado, el IGF-1 afecta a la formación de hueso a través de la estimulación de la osteogénesis y es harto conocido que en la cirrosis avanzada los niveles de IGF-1 se encuentran disminuidos, lo que puede hacer pensar en su posible implicación en la pérdida de masa ósea. Cemborain y colaboradores compararon en ratas cirróticas el efecto del tratamiento con IGF-1 frente a placebo, comprobando que en las segundas se producía una pérdida de peso óseo total y de densidad ósea global significativamente mayor, mientras que se incrementaban la resorción ósea perimedular y la excreción urinaria de desoxi-piridinolina, un marcador de reabsorción ósea ⁽⁹¹⁾.

2.2.3. INFLUENCIA SOBRE LA ATROFIA TESTICULAR.

El hipogonadismo frecuentemente complica la cirrosis avanzada, caracterizándose por niveles bajos de testosterona e hiperestrogenismo relativo. Habitualmente se asocia con pérdida de libido, impotencia sexual y hábito corporal feminizado en hombres y con amenorrea en mujeres. Se ha atribuido a múltiples mecanismos causales, incluida la toxicidad directa del alcohol, la malnutrición y la producción incrementada de estrógenos a partir de los andrógenos en los tejidos periféricos, como resultado de la existencia de shunts portosistémicos. Por otro lado, son bien conocidos tanto el efecto estimulador de la síntesis de testosterona y la espermatogénesis que tiene el IGF-1 como que durante la cirrosis avanzada se produce un déficit de la mencionada hormona. Dados los resultados favorables obtenidos al estudiar de

manera experimental el efecto del tratamiento con IGF-1 sobre ratas cirróticas a diferentes niveles, como por ejemplo el estado nutricional, la absorción intestinal, la osteopenia y la propia función hepática, no se estaría desencaminado al atribuirle cierta responsabilidad en el hipogonadismo de los cirróticos al déficit de IGF-1. Esta idea se ve refrendada al demostrarse, por un lado, la existencia de receptores del IGF-1 en las células de Sertoli, germinales y de Leydig de los testículos⁽¹⁰⁹⁾ y, por otro, que pacientes con deficiencia de IGF-1 por ausencia de receptores de GH, aumentaban el tamaño de sus testículos y los niveles séricos de testosterona tras el tratamiento con IGF-1 exógeno⁽¹¹⁰⁾. Además, Castilla-Cortázar y cols. demostraron que las ratas cirróticas tratadas con IGF-1 recuperaban por completo el tamaño y peso testiculares, todas las anomalías histopatológicas y los niveles plasmáticos de las hormonas sexuales al compararlas con controles sanos⁽¹¹¹⁾.

2.2.4. EFECTOS “HEPATOPROTECTORES” DEL IGF-1.

La cirrosis hepática se desarrolla finalmente como consecuencia de la concatenación de eventos como la necrosis celular, la regeneración hepatocelular y la fibrosis. Como ya se ha mencionado, ha sido demostrado experimentalmente que la infusión de IGF-1 en animales mejora diferentes situaciones derivadas de la cirrosis hepática avanzada, tales como el estado nutricional, la malabsorción de nutrientes, la osteopenia o el hipogonadismo. En el modelo experimental de cirrosis inducido en el animal de experimentación mediante la inhalación prolongada de tetracloruro de carbono, la lesión hepatocitaria sobreviene por la presencia de radicales libres. El estrés oxidativo resultante conduce a la peroxidación de los lípidos, la disfunción mitocondrial y la depleción de ATP. La peroxidación de los lípidos podría jugar un papel importante en la sobreexpresión de los

genes del colágeno y en la actividad de la prolil-4-hidroxilasa hepática, efectos que parecen relevantes en el desarrollo de la fibrosis. Castilla Cortázar y colaboradores demostraron en ratas con cirrosis inducida, compensada o avanzada, que el IGF-1 mejoraba la función hepática y reducía la lesión hepática oxidativa y la fibrogénesis^(112;113). Así mismo, mejoraba la función mitocondrial, lo que podría jugar un papel central en el efecto hepatoprotector de esta hormona. Por otra parte, García Fernández y colaboradores asociaron dicho efecto hepatoprotector al descenso de los niveles hepáticos de múltiples factores implicados en la lesión oxidativa, como la mieloperoxidasa o el óxido nítrico⁽¹¹⁴⁾.

2.3. IGF-1 COMO AGENTE TERAPÉUTICO.

Parte de las esperanzas depositadas en esta hormona como agente terapéutico derivan del amplio rango de acciones biológicas que se le conocen. IGF-1 media la mayoría de los efectos anabólicos de la GH circulante. Estimula la formación de hueso, la síntesis proteica, la captación de glucosa por el músculo, la supervivencia de la neuronas y la síntesis de mielina. También modifica el balance negativo de nitrógeno en los estados de alimentación incorrecta e inhibe la degradación proteica en el músculo. Por estas razones se ha postulado al IGF-1 como agente terapéutico en la osteoporosis, en varios estados catabólicos, en la diabetes, la obesidad, los desórdenes neuromusculares, la resistencia a la GH y la resistencia a la insulina.

Sin embargo, es preciso tener en cuenta sus efectos secundarios, tanto a corto plazo tras la infusión intravenosa o a más largo plazo tras múltiples inyecciones subcutáneas. Una inyección única de IGF-1 puede originar respuestas cardiovasculares drásticas, como asistolia e hipotensión arterial, que pueden deberse a hipofosfatemia. Altas dosis de IGF-1 por vía subcutánea por períodos superiores a 10

días pueden originar múltiples y dispares consecuencias como molestias témporo-mandibulares, edema de cara y manos, ganancia ponderal o disnea. También puede desencadenar taquicardia sinusal por reflejo simpático secundario al descenso de las resistencias vasculares periféricas, aumento de la presión intracraneal, ginecomastia, manifestaciones “acromegaloides” y necrosis aséptica de la cabeza del fémur. Aun deben ser determinados los resultados del uso a largo plazo del IGF-1, en especial en los que respecta a las manifestaciones acromegálicas o la hipertrofia de los tejidos, como por ejemplo de las paredes arteriales o el endometrio uterino, o incluso sobre la proliferación de células tumorales⁽¹¹⁵⁾.

3. MODELOS ANIMALES DE HIPERAMONIEMIA Y ENCEFALOPATÍA.

La insuficiencia hepática crónica acompañada o no de shunt porto-sistémico, se asocia tanto a EH subclínica como a EH crónica y recurrente. La encefalopatía clínicamente florida se ve precipitada muy frecuentemente por factores como una ingesta proteica excesiva, una hemorragia gastrointestinal, el abuso de diuréticos, la sepsis, etc⁽¹¹⁶⁾.

Aunque existen gran cantidad de modelos para experimentación animal, bien de origen genético o inducido de diferentes formas en el laboratorio, aun no se ha descrito el modelo ideal de enfermedad hepática crónica con encefalopatía. Los diferentes problemas asociados a los modelos ha llevado a los investigadores a desarrollar sus propios, a veces únicos, modelos experimentales, lo que dificulta la comparación entre los resultados de los estudios realizados por cada uno de ellos⁽¹¹⁷⁾.

En 2002 se publicaron los acuerdos sobre EH a los que se llegó tras la reunión de expertos celebrada en Viena en 1998⁽³⁾, donde se consensuó la nomenclatura de los diferentes tipos de encefalopatía (**apartado 1.1 de “Introducción”**).

Dado que es posible que se produzcan discrepancias entre los términos utilizados para denominar los mismos hechos clínicos, denominaciones tales como encefalopatía aguda y crónica frecuentemente son malinterpretados. Se hace notar así la necesidad de diferenciar muy claramente la EH que acompaña al fallo hepático fulminante (tipo A), la que acompaña a las situaciones de Shunt portosistémico sin fallo hepatocelular (tipo B) y la asociada a cirrosis e

hipertensión portal (tipo C), que a su vez puede cursar de manera episódica, persistente o mínima. Éste tipo C de EH es la forma más frecuente y desde un punto de vista clínico, la forma episódica por descompensación de la CH es la variante más típica e importante.

Los modelos animales de hiperamoniemia más extendidos son la cirrosis hepática inducida por tetracloruro de carbono (CCl₄) en la rata y el shunt portocava en la misma especie u otras, especialmente el perro. En relación con la encefalopatía hepática, sin embargo, la cirrosis inducida por el CCl₄ en ratas parece desarrollar escasos cambios comportamentales típicos, a pesar de originar una cirrosis avanzada y descompensada y constituir en teoría un buen modelo para la EH tipo C. En contraposición, la derivación porto-cava (DPC) se relaciona claramente con un evidente, aunque sutil, conjunto de cambios del comportamiento. Los más recientes avances en este campo han sido las sucesivas mejoras en la detección de los citados cambios y, de manera destacada, la constatación de la reversibilidad de los síntomas en relación con la administración de neomicina o dietas de bajo contenido proteico⁽¹¹⁸⁾.

El modelo ideal de EH debería, al menos, reproducir la mayoría de los hallazgos clínicos típicos de este síndrome en humanos (**Tabla-15**).

Ocurre principalmente en paciente con enfermedad hepática crónica
Frecuentemente precipitada por factores definidos
Frecuentemente reversible con la corrección de los factores precipitantes
Reversible con neomicina, lactulosa o dieta baja en proteínas
Asociada a un metabolismo del nitrógeno y de los aminoácidos alterado
Amplio espectro de severidad

Tabla-15. Hallazgos clínicos típicos de la Encefalopatía Hepática.

Ya que la mayoría de pacientes con EH padecen además enfermedades hepáticas crónicas, sería ideal que los modelos animales incluyesen esta circunstancia. Existen numerosos modelos experimentales que reproducen satisfactoriamente la EH asociada al fallo hepático fulminante, sin embargo, hay que tener en cuenta que existen diferencias llamativas entre esta EH y la que se produce en los pacientes con patología hepática crónica (**Tabla-I6**).

Frecuentemente no precipitada por factores definidos
Escasa reversibilidad con tratamiento, exceptuando trasplante hepático
Fuertemente asociada a edema cerebral
Asociada con múltiples complicaciones metabólicas
Ocasionalmente asociada con episodios de excitación del SNC

Tabla-I6. Hallazgos de la Encefalopatía Hepática durante el fallo hepático fulminante.

Cuando se especula con el modelo ideal de HAM, lo primero que el investigador ha de decidir es el nivel de la misma que se precisa reproducir. Las necesidades de un modelo que explore los efectos de la HAM severa por déficits enzimáticos en el ciclo de la urea son muy distintas de las de otro para el estudio del incremento, habitualmente más moderado, asociado con la hepatopatía crónica. De manera independiente, los estudios sobre los efectos de la HAM en animales son relevantes sólo si el grado y duración de ésta son similares a la de los pacientes. Este principio es a veces violado, ya que la mayoría de los investigadores focalizan su interés exclusivamente en el hecho en sí del incremento del AM en la sangre, como causa de la EH, más que en el mantenimiento a lo largo del tiempo de los niveles elevados del AM sanguíneo. El requisito previo de todos los estudios que deseen realizarse en este campo debería ser que el modelo animal empleado reprodujese los cambios comportamentales de la EH humana. A

menudo se asume que la mayoría, o ninguno, de los cambios comportamentales del modelo experimental de HC son debidos a EH. Sin embargo, al igual que en la EH en humanos, el diagnóstico es incierto hasta que otras causas de encefalopatía son excluidas y se aprecia una respuesta empírica al tratamiento apropiado para la EH. Si no se tienen en cuenta estos principios, algunos estudios animales que pretendan reproducir la HC pueden no ser relevantes en cuanto al estudio de la EH se refiere.

3.1. MODELOS ANIMALES DE HEPATOPATÍA CRÓNICA.

3.1.1. SHUNT PORTOCAVA QUIRÚRGICO O CONGÉNITO EN PERROS.

En términos prácticos, a pesar del importante interés de múltiples equipos de investigación en la anastomosis porto-cava término-lateral del perro, pocos laboratorios han sido finalmente capaces de manejar estos animales y, por tanto, de diseñar estudios basados en los mismos. En cualquier caso, se ha comprobado que los perros con shunt portosistémico quirúrgico o congénito presentan frecuentemente cambios del comportamiento compatibles con el equivalente humano de la EH. Además, estudios realizados por veterinarios han demostrado que la encefalopatía mejoraba en perros con shunts congénitos a los que se trataba tanto con dieta baja en proteínas como con lactulosa y neomicina⁽¹¹⁹⁾. Sin embargo, como ya se menciona antes, no son muchos los laboratorios que pueden disponer de perros con shunts congénitos o que son capaces de intervenirlos para crear éstos quirúrgicamente, incluso se aprecia gran variabilidad en cuanto a los cambios comportamentales observados en los animales intervenidos en instituciones distintas⁽¹²⁰⁾.

3.1.2. CIRROSIS INDUCIDA EN RATAS POR TETRACLORURO DE CARBONO.

Este modelo es razonablemente fácil de reproducir, aunque un número significativo de animales muere durante el tratamiento con el CCl₄, especialmente si este se prolonga hasta que se presenta la ascitis. Recientemente, mejoras en la técnica de administración del CCl₄ han llevado a producir un modelo experimental fácilmente reproducible en ratas, con anomalías del metabolismo del colágeno, hipertensión portal y ascitis⁽¹²¹⁻¹²³⁾. Múltiples grupos de investigación han destacado, sin embargo, que se suelen detectar escasos cambios del comportamiento a pesar de conseguirse estados muy avanzados y descompensados de enfermedad hepática. Aunque el modelo de cirrosis bien compensada puede ser útil para investigar exclusivamente los efectos de la hiperamoniemia⁽¹²⁴⁾, que suele ser moderada, a pesar de que se ha demostrado que no se produce una reducción demasiado severa de la actividad enzimática del ciclo de la urea⁽¹²⁵⁾, hallazgo presente en los pacientes con cirrosis. Por este motivo, Snodgrass afirma que el modelo es inadecuado para el estudio de las hepatopatías crónicas. Podría ser interesante la producción de un estado avanzado de cirrosis, pero la presentación de severa ascitis dificulta la interpretación de los resultados en relación al comportamiento de los animales.

3.1.3. SHUNT PORTOCAVA EN RATAS.

Muchos de los estudios realizados durante años en ratas con DPC han revelado algunos de los principales conocimientos que hoy tenemos acerca de la HAM de la patología hepática⁽¹²⁶⁾. Inicialmente

surgieron dudas acerca de la idoneidad del modelo para reproducir síntomas en los animales que pudiesen ser equiparados a la EH humana; sin embargo, a partir de los trabajos de Bengsston y colaboradores⁽¹²⁷⁻¹²⁹⁾ y otros^(130;131), se demostró inequívocamente que en este modelo están presentes cambios del comportamiento, en especial en las áreas de actividad espontánea en respuesta a un nuevo entorno y actividad exploratoria. Tras ello, se encontró también que dichos cambios eran reversibles al aplicar a los animales las medidas que se conoce son efectivas para el tratamiento de la EH y, como antes se mencionó, sólo demostrando este aspecto puede considerarse el modelo como relevante para estudiar la EH. En concreto, Conjeevaram y colaboradores⁽¹³²⁾ demostraron claramente que administrando neomicina con el agua de la bebida a ratas con DPC se reducía en ellas la actividad motora tras exponerlas a un ambiente oscuro y nuevo, mientras que Coy y colaboradores también lo hicieron, usando una técnica más sofisticada de medida de las alteraciones de la actividad motora circadiana⁽¹³³⁾. Este mismo grupo también demostró que las ratas operadas obtenían la misma mejoría cuando se las sometía a dietas bajas en proteínas.

Hay que tener en cuenta, sin embargo, que el simple hecho de someter a las ratas a una DPC no garantiza que vayan a desarrollar alteraciones comportamentales. Aspectos tales como la técnica quirúrgica empleada o el tamaño del estoma de la anastomosis microvascular, que pueden influir notablemente en el gradiente de presiones del shunt; o bien la dieta suministrada, el lapso de tiempo que pasa desde la intervención hasta que se le realiza el estudio a la rata o incluso la edad y el peso de los animales, pueden afectar en la capacidad de los investigadores para detectar cambios significativos^(134;135). Además, hay que tener presente que puede producirse neovascularización hepática de manera espontánea con

desarrollo de “shunts hepatopedales”, lo que se asociaría a recuperación del peso y descenso de la HAM y de la EH subclínica en esos animales.

3.1.4. SHUNT PORTOCAVA CON MANIPULACIONES ADICIONALES.

La idea de reproducir los síntomas de una encefalopatía más severa en ratas (y ocasionalmente en perros) ha sido el origen del diseño de diferentes manipulaciones sobre los animales intervenidos. Una maniobra con potencial utilidad es la **administración de resinas de AM** a las ratas con DPC, que origina una encefalopatía aparentemente reversible. El AM administrado por otros medios (por ejemplo i.v.) produce claramente coma total, estando aun sin determinar lo que esto significa en términos humanos. Potencialmente, este coma se relaciona con el edema cerebral inducido, aunque no existen aun evidencias sobre este aspecto. Además, no hay datos que demuestren la reversibilidad de este coma. Las ratas normales a las que se las alimenta con acetato amónico desarrollan una HAM de un grado similar a la de las ratas con DPC, y aun son resistentes a la administración puntual de más AM; sin embargo, las ratas con DPC se encuentran, como se ha mencionado, en la situación contraria⁽¹³⁶⁾.

La superposición de una **hepatitis tóxica aguda por dimetilnitrosamida** en perros con DPC se ha mostrado capaz de inducirles una EH severa⁽¹³⁷⁾. Otras manipulaciones realizadas sobre animales con DPC incluyen la **extracción sanguínea** o la **administración de altas cantidades protéicas con la dieta**, que funciona en perros, pero no en ratas. También se han usado en algunas ocasiones la **hepatectomía parcial** en ratas con DPC previa o la **DPC a**

ratas con cirrosis inducida por CCl₄, sin llegar a constatar cambios en el comportamiento de los animales.

Recientemente se han publicado trabajos utilizando la **ligadura biliar completa** sobre ratas a las que previamente se ha practicado una DPC, lo que induce una colostasis aguda o subaguda⁽¹³⁸⁾. Este modelo no ha sido completamente caracterizado y presenta la dificultad añadida de que induce una severa pérdida ponderal al animal, motivada probablemente por anorexia o malabsorción.

3.2. ANASTOMOSIS PORTO-CAVA EXPERIMENTAL.

Las primeras derivaciones portales, es decir, la puesta en comunicación directa del sistema porta con el sistema cava, cortocircuitando más o menos completamente el aporte sanguíneo al hígado, fueron realizadas en 1877 en perros por Nikolai Vladimirovich Eck⁽¹³⁹⁾. Sin embargo, no fue hasta 1903 que Vidal⁽¹⁴⁰⁾ las utilizó con éxito como tratamiento de la ascitis en el hombre, introduciendo la noción del tratamiento quirúrgico de las hemorragias digestivas secundarias a ruptura de varices esofágicas. Durante los primeros años tras la descripción de la técnica se conocía poco de ella y hasta 1945 Whipple y Blakemore no especificaron los efectos de la intervención sobre la HTP^(141;142). Rápidamente apareció gran entusiasmo por esta cirugía, dada la eficacia comprobada en la prevención de las recidivas hemorrágicas por ruptura de varices, si bien éste se atemperó tras comprobar sus consecuencias inmediatas: el agravamiento de la insuficiencia hepatocelular previa y la aparición de alteraciones neuropsiquiátricas.

Simultáneamente con estos estudios clínicos se desarrollaron otros en el terreno experimental que intentaron explicar el fenómeno

desde un punto de vista fisiopatológico. Los primeros realizados en ratas datan de 1946, cuando Whitaker practicaba un método en dos tiempos iniciado por la ligadura de la cava, seguido por la confección de una fístula porto-cava mediante un punto transfixiante entre las dos paredes venosas y finalizado por la ligadura de la porta 4 días más tarde⁽¹⁴³⁾. En la misma época, Reinhard y Bazell propusieron una técnica de anastomosis porto-renal que precisaba de una nefrectomía y de la interposición de un tubo de vidrio⁽¹⁴⁴⁾, si bien era un acortamiento del shunt con polivinilo entre las venas iliaca y porta descrito por Berstein y Cheicker durante la hepatectomía para evitar la hipertensión portal⁽¹⁴⁵⁾. Todas estas técnicas resultaron poco satisfactorias por la enorme mortalidad operatoria que las acompañaba, la gran tasa de trombosis de los shunts y la escasa reproducibilidad de los resultados obtenidos.

Lee y Fisher⁽¹⁴⁶⁾ en 1961 y Bismuth en 1962⁽¹⁴⁷⁾ describieron una técnica de anastomosis porto-cava directa, fiable y reproducible, realizada por microsutura vascular, que aun hoy en día continua vigente en virtud de sus buenos resultados y su reproducibilidad por los diferentes grupos de investigación. Sin embargo, no es despreciable la dificultad técnica que se le asocia, por lo que han existido intentos ulteriores de simplificarla. Funovics⁽¹⁴⁸⁾ describió en 1974 una técnica de anastomosis mediada por un tubo de teflón que pretendía evitar la sutura directa y Jerkins⁽¹³⁵⁾ en 1988 otra en la que la unión entre las venas cava y porta se realizaba mediante adhesivo de cianoacrilato, siempre con la intención de facilitar la manipulación microquirúrgica de los vasos y con ello, la técnica. Sin embargo, estudios posteriores que comparaban estos tipos de shunts alternativos con el descrito por Lee y Bismuth concluyeron que los gradientes de presiones entre los sistemas porta y cava eran menores tras los shunts quirúrgicos. Esto sugeriría que las anastomosis microquirúrgicas mantienen una tasa de viabilidad a

largo plazo mayor que los shunts alternativos, que presentarían mayores gradientes por su mayor tendencia a estenosarse en el postoperatorio. Así se explicaría la variabilidad de los resultados que se habían descrito previamente en trabajos que utilizaban dichas técnicas quirúrgicas alternativas⁽¹³⁴⁾.

En 1983 Numata publicó una modificación de la técnica que en nuestra opinión la simplifica en gran medida, la hace más fácil y reproducible y contribuye a minimizar el tiempo operatorio, vital en la viabilidad del animal después de la intervención⁽¹⁴⁹⁾. La técnica se basa en una anastomosis microquirúrgica veno-venosa látero-lateral entre la porta y la cava de la rata, que permite un mayor calibre de shunt que la anastomosis término-lateral de Lee, Fisher y Bismuth, con una tasa de estenosis a largo plazo teóricamente menor. Permite además su utilización bien como anastomosis látero-lateral, en función de que la dejemos tal y como quede tras la realización del shunt quirúrgico, o bien término-lateral, si es que ligamos y seccionamos la vena porta en sentido proximal inmediatamente después de realizar la anastomosis, lo que permitiría aplicarla a estudios experimentales diferentes en función de los intereses.

La técnica de Numata se inicia con una laparotomía media subxifoidea y evisceración del contenido intestinal hacia el lado izquierdo de la apertura abdominal. Así quedan expuestas tanto la vena cava infrahepática como la porta. Se lleva a cabo en primer lugar la disección de la cava, separándola de los tejidos retroperitoneales. A continuación se disecciona el eje mesentérico-portal por encima de la confluencia con la vena esplénica y por debajo de la entrada de la vena cólica derecha, poniendo especial atención a la separación entre la porta y la arteria hepática, pues la lesión de esta última implicaría una

isquemia hepática completa en el postoperatorio y la inviabilidad del animal intervenido.



II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

En los pacientes hepatópatas existe un déficit en la síntesis de múltiples proteínas de origen hepático, entre ellas de los IGF's. El IGF de mayor trascendencia en la hepatopatía es el IGF-1, en base a que su déficit se considera responsable de muchas de las alteraciones que se presentan en estos pacientes, especialmente en relación con los trastornos de metabolismo intermediario y la desnutrición⁽¹⁵⁰⁾.

La **hipótesis principal** del presente estudio fue que, tal y como ocurre en el paciente hepatópata^(98;99;101;151), en el modelo experimental de anastomosis porto-cava en ratas, uno de los modelos más extensamente utilizados y validados en la actualidad, **debe existir un estado deficitario en IGF1**. En las ratas con cirrosis inducida por tetracloruro se ha demostrado la deficiencia de IGF-1^(91;102;107;111-113) pero, sin embargo, no disponemos de datos en animales sometidos a derivación porto-cava. Además, como se recoge en el **apartado 3.1.2 de "Introducción"**, en el modelo de cirrosis se producen intensos cambios histológicos hepáticos y ascitis severa en los estadios más avanzados de la hepatopatía, pero que se acompañan de escasa hiperamoniemia. El modelo presenta también numerosos e importantes inconvenientes, como son su difícil manejo por el personal del laboratorio por su potencial toxicidad inhalatoria, la alta mortalidad de los animales durante el tratamiento, antes de hacerse cirróticos y la escasa encefalopatía que los mismos desarrollan. Por el contrario, en el modelo de anastomosis porto-cava en ratas se induce un aumento del AM sanguíneo más intenso, acompañado por cambios comportamentales, entre ellos el trastorno de la conducta alimentaria cuya máxima expresión la constituye la pérdida ponderal que los animales sufren en el postoperatorio.

Una **hipótesis adicional de partida** que nos planteamos al realizar el presente estudio fue la validación de la modificación publicada por Numata de la técnica de derivación porto-cava. Revisando las bases de datos bibliográficas más importantes (PUBMED, EMBASE, IME y BIREME) no hemos encontrado ninguna publicación que recoja los resultados experimentales de un grupo de animales intervenidos de anastomosis microquirúrgica siguiendo la mencionada variación técnica publicada por Numata (anastomosis latero-lateral transformada en termino-lateral funcional, mediante la ligadura y sección de la porta por encima del estoma).

Como **tercera hipótesis** se estableció la remota, aunque plausible posibilidad de que los niveles bajos de IGF-1 en el animal sometido a DPC no dependiesen de los efectos de la realización de un *shunt* microquirúrgico entre la porta y la cava, sino del mero hecho de someter a la rata a una intervención quirúrgica, bajo anestesia general y con manipulación de las venas porta y cava infrahepática. Por ello hemos incluido en el diseño del presente estudio un grupo de animales a los que se practicó una laparotomía idéntica a la realizada en las ratas sometidas a DPC, seguida de la disección de los vasos implicados en la anastomosis, de igual forma a como se realizó en el grupo de ratas DPC, pero sin construir después la mencionada anastomosis.

Como **última hipótesis** se pensó en la eventualidad de corregir los niveles deficitarios de IGF-1 en la rata sometida a DPC mediante su aporte exógeno y, por tanto, eliminar también los efectos deletéreos ocasionados por dicho déficit. Estudios similares han sido realizados en pacientes cirróticos y en ratas con cirrosis inducida por tetracloruro de carbono, demostrándose beneficios en ciertos aspectos tras la

administración de IGF-1 recombinante humano (IGF-1rh)^(91;102;105;106;108;111;112;114;151).

Por ello enumeramos los **objetivos** del presente trabajo, realizado sobre un modelo de ratas sometidas a DPC, que fueron:

1. **Validar el modelo experimental de derivación porto-cava de Numata**, estableciendo su efecto sobre el metabolismo del AM y las consecuencias de su patrón alterado en el grupo de ratas sometidas a DPC.
2. **Establecer el efecto de la derivación porto-cava sobre los niveles de IGF-1 plasmático**, comparando para ello los resultados en ratas sometidas a DPC frente a controles sanos y sometidos a intervención *sham*.
3. **Establecer el efecto que sobre las ratas sometidas a DPC tiene el tratamiento con IGF-1rh**, comparando los resultados de los parámetros típicos de la hepatopatía en ambos grupos de animales sometidos a DPC.



III. MATERIAL Y MÉTODOS

1. MATERIAL BIOLÓGICO.

Para la realización de este estudio experimental se han utilizado 34 ratas de la raza Wistar, machos, de entre 240 y 450 g de peso. Se analizaron los resultados de 32 animales, restando las 2 que no sobrevivieron a la Cirugía, divididas en cuatro grupos de 8 individuos según se detalla más adelante. Se eligieron ratas de sexo macho de forma exclusiva por haberse comunicado con anterioridad en la literatura un diferente comportamiento de ambos sexos ante la DPC^(118;132). En concreto, las mismas se referían a variaciones en el patrón de pérdida ponderal y de respuesta a estímulos durante el período postoperatorio.

Los animales se alimentaron durante todo el tiempo del estudio con una dieta estándar (Panlab, Barcelona, España), con la siguiente composición: 54% de carbohidratos, 12% proteínas (caseína), 5% de lípidos y el resto material no digerible. Se mantuvieron en condiciones estándares de luz (12 horas diarias con iluminación y 12 horas a oscuras), temperatura (23 ± 2 °C) y humedad (60-70%) desde las 24 horas previas a la intervención y durante los 28 días siguientes a la misma, hasta el sacrificio.

En todo momento se ha esmerado el manejo de los animales de experimentación, evitándoles todo sufrimiento innecesario, de acuerdo con las normas dictadas por el Comité Ético de Experimentación Animal de la Universidad de Sevilla⁽¹⁵²⁾.

Con el fin de reproducir los trastornos fisiopatológicos que acontecen durante la encefalopatía hepática, se procedió a intervenir quirúrgicamente un grupo de ratas (18 animales), sometiénolas a una

anastomosis entre la porta y la cava tal y como describiremos más adelante.

El diseño del estudio se completó con dos grupos más de animales, de manera que los grupos finalmente quedaron como sigue:

“Problema”: 16 animales a los que se les practicó derivación porto-cava y sobrevivieron 28 días, al cabo de los cuales fueron sacrificados. Puesto que la mortalidad postoperatoria de dichos animales fue del 5,89%, fue preciso intervenir a 18 ratas. Este grupo se vio dividido con posterioridad en dos subgrupos de animales de 8 individuos cada uno, uno que no recibió tratamiento (**Grupo DPC**) y otro al que se le aplicó tratamiento con IGF recombinante humano (**Grupo DPC-IGF**).

Sham: 8 animales a los que se les practicó una laparotomía y disección de las venas cava y porta, de la misma forma que se realizaba en los animales a los que con posterioridad se practicaba la anastomosis porto-cava, pero sin finalmente llevar a cabo ésta. Tras sobrevivir 28 días, fueron sacrificados.

Control: 8 animales sanos a los que se mantuvo desde las 24 horas previas a la intervención quirúrgica de sus hermanos de camada y durante 28 días posteriores en idénticas condiciones de alimentación, temperatura y ciclo sueño-vigilia que los grupos de estudio, transcurridos los cuales fueron sacrificados.

Todas las intervenciones quirúrgicas se realizaron cumpliendo con la Normativa actualmente vigente en la materia, (RD 223 de 14 de Marzo de 1998, BOE 18 de Marzo de 1998), en el quirófano de Cirugía Experimental del Hospital Universitario Virgen del Rocío, según acuerdo

entre su Comisión de Investigación y la del Hospital Universitario de Valme.

Para minimizar en lo posible las diferencias en los resultados de las distintas determinaciones de cada uno de los grupos de animales que fuesen atribuibles a su manipulación, bien previa a las intervenciones quirúrgicas o con posterioridad a las mismas (durante su mantenimiento en los animalarios o incluso en el momento del sacrificio y la toma de muestras) se agruparon éstos en grupos paralelos. Las sesiones quirúrgicas se proyectaron según esta premisa, de forma que durante las mismas se intervinieron siempre 2 animales a los que se practicaba una anastomosis porto-cava, uno más al que se realizaba la intervención *sham* y finalmente se dejaba otro sin intervenir, que pasaba a formar el grupo control. Así, al practicar el sacrificio 28 días más tarde, éste se realizó de forma simultánea a 3 ó 4 animales (dependiendo de que sobreviviesen 1 ó 2 de los que sufrieron anastomosis porto-cava. Las sesiones operatorias (y, por tanto, también las de sacrificio) se repitieron de esta forma en 8 ocasiones. Puesto que hubo un 5,89% de mortalidad operatoria (2 ratas) entre las sometidas a derivación portocava, en las dos últimas sesiones operatorias se intervinieron 3 animales en cada una de ellas para realizarles una DPC, siendo posteriormente sacrificadas con el mismo grupo en el que se encontraban, a los 28 días.

Los animales se mantuvieron dos días tras la intervención en el animalario del Centro de Experimentación Animal del Hospital Universitario Virgen del Rocío, en las condiciones ambientales y de luz-oscuridad ya mencionadas. Desde el final de la intervención tuvieron acceso libre a la ingesta de alimentos y agua. Transcurridas las 48 horas iniciales fueron trasladados al estabulario de la Facultad de Farmacia, manteniéndose allí hasta su sacrificio. La manipulación de los

animales se efectuó siempre atendiendo a la Normativa vigente al respecto (Directiva 86/609/CEE).

1.1. MÉTODO ANESTÉSICO.

Los animales fueron sometidos antes de la intervención a una anestesia general inhalatoria con isoflurano. La inducción anestésica se consiguió mediante la exposición del animal a una mezcla de oxígeno, aire ambiente y gases anestésicos, en la que estos últimos alcanzaban el 5%, a flujos altos (1000-2000 ml/min.). La mezcla gaseosa se aplicó mediante una mascarilla abierta en la que se introdujo la cabeza completa del animal, consiguiéndose la inconsciencia del animal en unos 20-30 segundos (**Figura-M1**). Una vez anestesiado, el animal quedaba en ventilación espontánea. El mantenimiento anestésico se consiguió con proporciones del gas de entre el 2 y el 3% (según peso del animal), con flujos bajos de mezcla gaseosa (300-500 ml/min.). Una vez se llevaba a cabo la oclusión de los grandes vasos durante la intervención para la realización de la anastomosis, la proporción del gas anestésico se reducía al 0,5%-0,75%, ya que la brusca disminución de la precarga tras esta maniobra inducía un descenso del gasto cardíaco y el consumo global de gases anestésicos. La consecuencia del mantenimiento de la anestesia con unas proporciones elevadas de gases anestésicos durante este período era la prolongación del período de despertar posquirúrgico o, en ocasiones, el fallecimiento del animal.

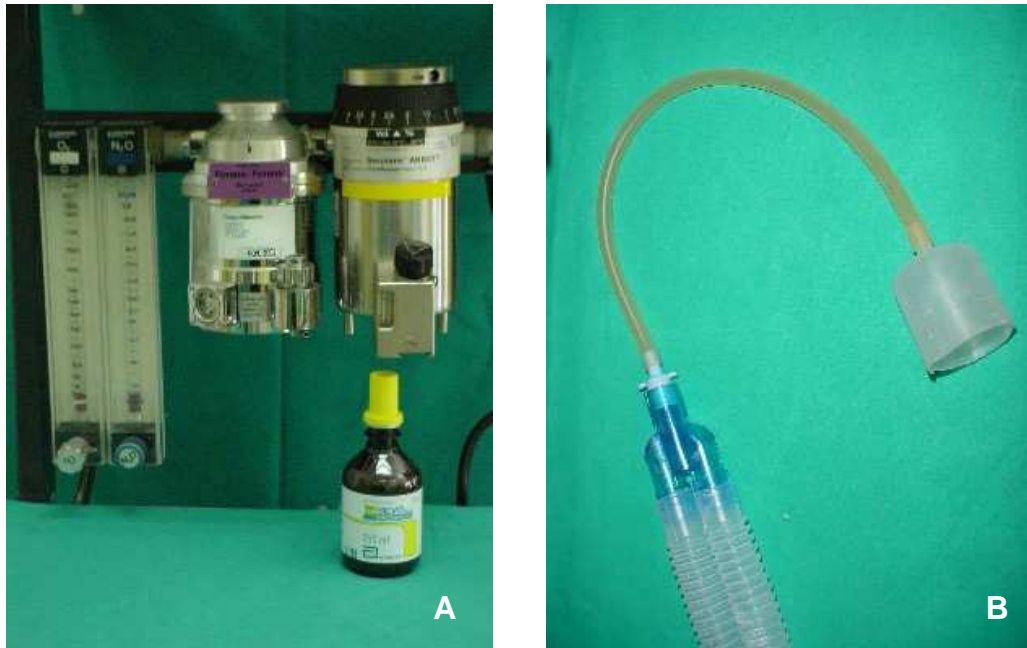


Figura-M1: Rotámetro y vaporizador (A). Mascarilla para la aplicación de los gases anestésicos (B).

1.2. TÉCNICA QUIRÚRGICA DE DERIVACIÓN PORTO-CAVA.

Una vez anestesiado, antes de iniciar la intervención se colocó el animal en decúbito supino, se fijó a una superficie plana y se procedió al rasurado abdominal y desinfección de la piel con povidona iodada. El material quirúrgico estaba limpio y desinfectado, pero no se realizaron las intervenciones bajo condiciones de esterilidad (**Figura-M2**), ya que la rata tiene un sistema inmunitario extremadamente potente, capaz de superar intervenciones de tal envergadura con escaso riesgo de infecciones postoperatorias. La operación comenzó siempre mediante una laparotomía media subxifoidea de unos 3 cm. de longitud y subsiguiente evisceración del paquete intestinal, incluyendo el colon ,debido a la presencia en las ratas de un mesenterio común con un colon intraperitoneal, hacia la izquierda de la apertura abdominal,

exponiendo así la vena cava infrahepática y el confluente venoso espleno-meso-portal (**Figura-M3**).

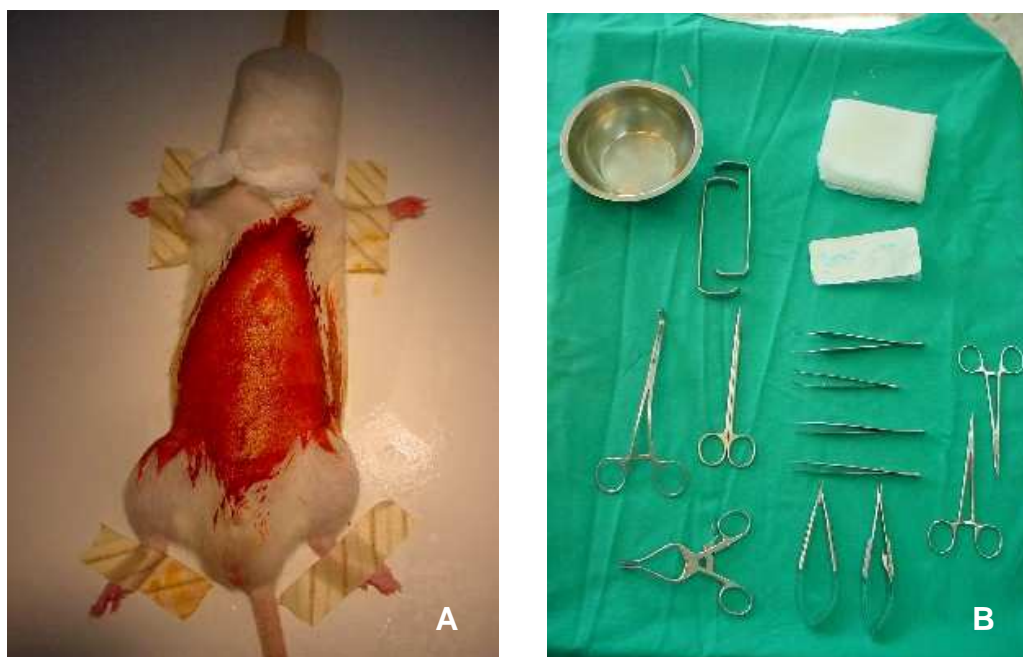


Figura-M2: Anestesia, rasurado y desinfección (A). Material quirúrgico (B).

Se disecó la vena cava de la grasa del retroperitoneo por encima y por debajo de las venas renales, así como los elementos del hilio hepático, en especial la vena porta, prestando especial atención a la liberación de la misma de la arteria hepática común, que por lo general se encuentra íntimamente unida a ella por su cara posterior (**Figura-M4**). En esta fase fue fundamental evitar la lesión de este vaso, puesto que a partir del clampaje de la porta y tras la realización de la anastomosis término-lateral de la misma sobre la vena cava, la arteria era la única que suministraba aporte sanguíneo al hígado, evitando así la isquemia hepática completa y el fallecimiento precoz del animal.

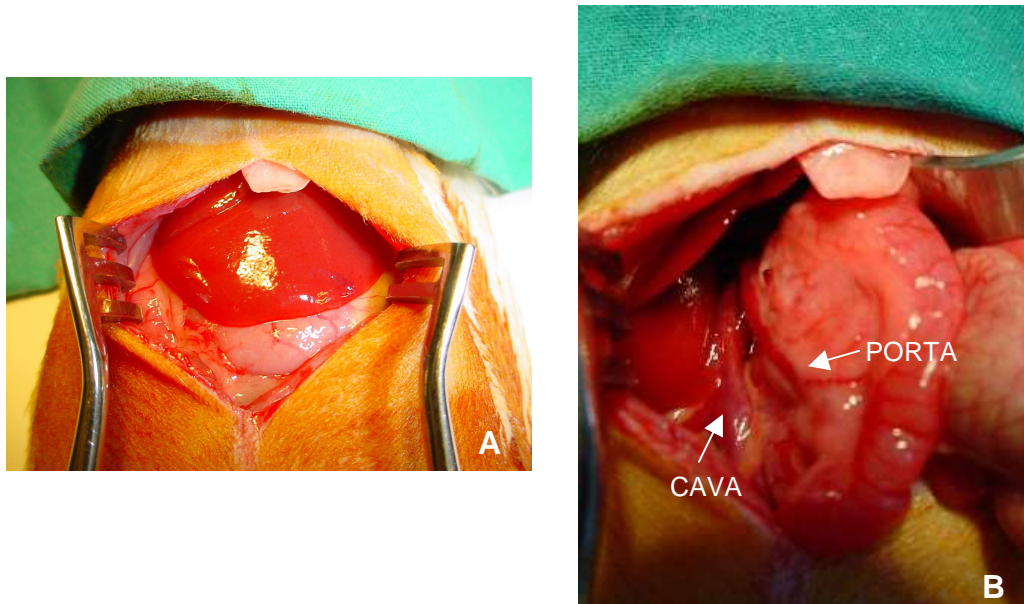


Figura-M3: Laparotomía (A). Evisceración y exposición de porta y cava (B).

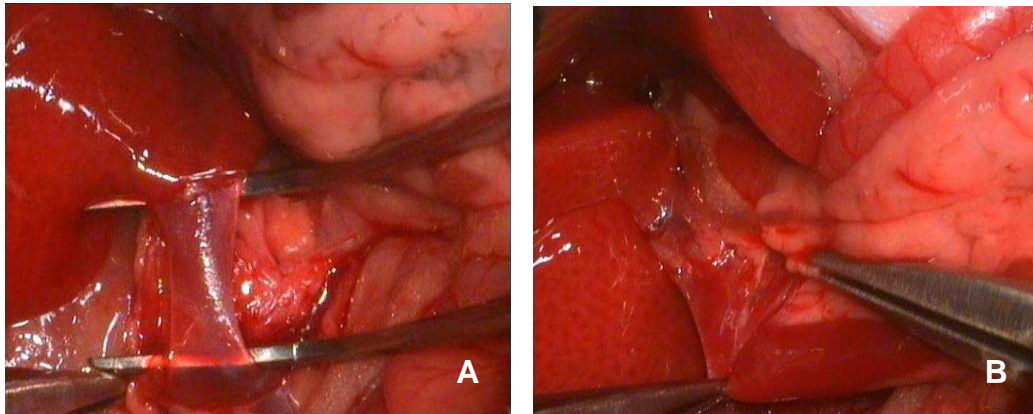


Figura-M4: Disección de las venas cava infrahepática (A) y porta (B) - fotografías de microscopio-.

A continuación se hizo pasar un primer hilo trenzado de 3 ó 4 ceros por detrás de la cava y por detrás de la porta simultáneamente, justo por encima de la salida de las venas renales y del confluente espleno-mesentérico en cada una de ellas. Un segundo hilo se pasó de

la misma forma pero por debajo de la salida de la vena renal derecha y de dicho confluente. Al tirar de ambas suturas al cenit y en sentidos cefálico y caudal, respectivamente y de forma simultánea, ambos vasos venosos quedaban aproximados entre sí (**Figura-M5**). Dispuestos de tal modo, seguidamente eran clampados con una pinza vascular de Satinsky, que los mantuvo juntos en dicha postura, permitiendo la realización de la técnica de anastomosis látero-lateral según describió Numata⁽¹⁴⁹⁾ (**Figuras-M6 a y b**).

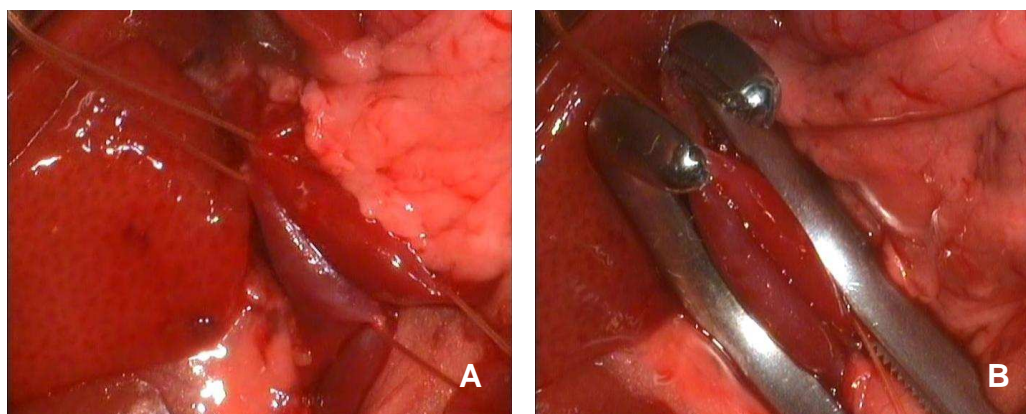


Figura-M5. Aproximación de ambos vasos mediante tracción de hilos de sutura (A) y clampaje (B) -fotografías de microscopio-

Se consiguió, de esta forma, un estoma anastomótico látero-lateral entre las venas cava y porta de unos 3-4 mm de diámetro mayor. Tras la doble ligadura y sección de la porta en el tramo proximal a la anastomosis, muy cerca del hilio hepático, la derivación pasa a ser término-terminal funcional (**Figura-M7**).

Para garantizar tanto el éxito del procedimiento como la viabilidad postoperatoria del animal fue preciso optimizar la técnica quirúrgica para que el tiempo de oclusión vascular no superase los 20 minutos. Con ello se consiguieron minimizar, fundamentalmente, los fenómenos

trombóticos en la porta y en la cava, que impiden la supervivencia precoz del animal a la intervención. Están favorecidos por la extrema facilidad para la coagulación rápida de la sangre en este animal, lo que por otra parte resulta muy favorable al detener con celeridad las hemorragias tras las anastomosis. A pesar del cumplimiento escrupuloso de estas premisas, la mortalidad operatoria fue del 5,89% (2 animales).

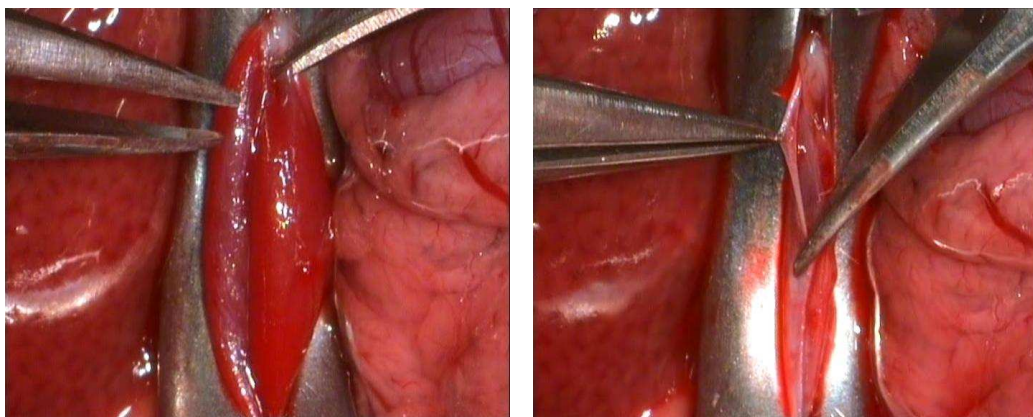


Figura-M6a. Apertura longitudinal de las venas cava y porta (fotografías de microscopio).

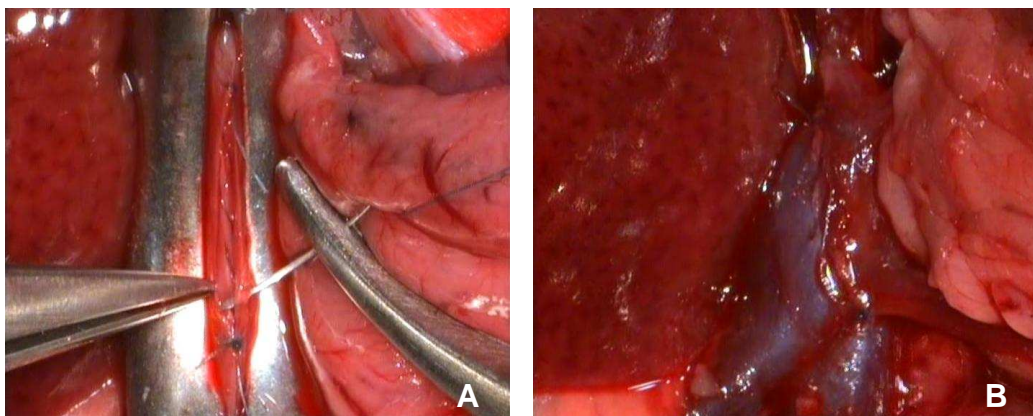


Figura-M6b. Confección de la anastomosis (A) y estado final del estoma porto-cava látero-lateral (B) -fotografías de microscopio-.

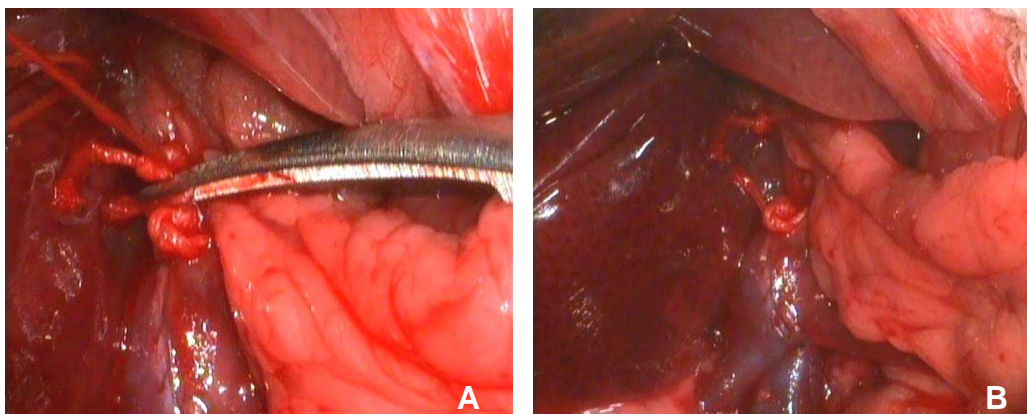


Figura-M7. Sección de la porta proximal a la anastomosis (A) y estado final de la derivación porto-cava término-lateral funcional.

En el grupo *sham* se realizó la laparotomía, evisceración y disección de las venas cava inferior y porta de modo idéntico al realizado en los animales del grupo problema, sin clampaje ni anastomosis ulterior, con la finalidad de establecer la afectación de los animales debido a la propia agresión quirúrgica. En este grupo no se produjo ningún caso de mortalidad postoperatoria.

1.3. EUTANASIA.

El sacrificio se realizó mediante decapitación de los animales, a las 4 semanas (28 días) de la intervención. Elegimos esta técnica, en primer lugar, porque permitía una muerte muy rápida del animal, consiguiendo extraer, de forma inmediata, las diferentes muestras que con posterioridad se analizarían. De esta forma, los posibles artefactos atribuibles al deterioro biológico de los fluidos y tejidos por la demora entre el momento de fallecimiento y la extracción y congelación se consideraron poco relevantes. Así pues, un equipo de 3 investigadores procedió de manera simultánea a la toma de muestras cerebrales, sanguíneas y de los diferentes tejidos, tras la eutanasia del animal.

Decidimos el momento del sacrificio basándonos en estudios previos sobre encefalopatía hepática basados en el modelo de derivación portocava en ratas en los que se analizaban los resultados a las 4 semanas de la cirugía⁽¹⁵³⁾. Un estudio sobre actividad glutaminasa intestinal de nuestro grupo de trabajo hizo una valoración preliminar de la misma en dos cohortes de animales sometidas a DPC a los 28 y 56 días, observándose un ligero ascenso de la actividad en el grupo de sacrificio más tardío, sin diferencia significativa con los niveles de AM obtenidos a los 28 días⁽¹⁵⁴⁾.

2. MÉTODOS.

2.1. AISLAMIENTO DE TEJIDOS Y TOMA DE MUESTRAS.

Gracias a que el manejo de los animales durante su sacrificio se llevó a cabo de forma muy rápida, se obtuvieron muestras tisulares con escasa demora para las distintas determinaciones. El primer paso consistía en conseguir un estado de sedo-analgnesia profunda del animal de experimentación mediante inyección intraperitoneal de Hidrato de cloral a dosis de 0.3 ml por cada 200 g peso de una disolución de 6 g de hidrato de cloral en 30 ml de agua destilada. Con ella se conseguía la anestesia del animal en unos 5 minutos, quedando éste bajo ventilación espontánea. Esto permitía la toma de las primeras muestras del animal, durante las cuales éste debía estar vivo, pero permitirnos realizar la maniobra. El primer paso realizado consistió en una laparotomía media (o relaparotomía, en los animales ya intervenidos). A continuación se extrajo sangre venosa mediante punción cardíaca a través del diafragma. La sangre se depositó en tubos al vacío con EDTA para su posterior procesamiento.

El siguiente paso tras la toma de muestras hemáticas consistió en la decapitación del animal, que originó su inmediato fallecimiento, mediante guillotinado. Seguidamente, otro de los investigadores se encargó de la toma de las biopsias del córtex cerebral, para lo que previamente hubo de abrir la cavidad craneal, sirviéndose de una gubia, que permitió la fragmentación del hueso y la exposición del encefálo. El encargado de realizar la laparotomía, tras la punción cardíaca para la toma de muestras sanguíneas, se encargó de la toma de muestras de los diferentes órganos abdominales. En todos los animales sometidos a DPC llamó poderosamente la atención el pequeño tamaño de sus hígados respecto al habitual de los animales sanos, si bien esto no podemos afirmarlo más que desde el punto de vista de la impresión subjetiva del equipo investigador, pues no llevamos a cabo ningún estudio comparativo entre los pesos de los hígados de los diferente grupos de animales (**Figura-M8**). Este aspecto resultó constante en todos los animales sometidos a DPC, incluso los tratados con IGF-1. Por estimación visual calculamos el tamaño de los hígados de las ratas DPC de aproximadamente la mitad que el de las ratas controles y *sham*. Se extrajeron los riñones para que otro de los investigadores tomara muestras de la corteza y se obtuvieron también muestras tisulares del propio hígado. Para extraer de manera aislada la corteza se procedió a la hemisección renal a lo largo de su eje mayor, disecando el plano de separación córtico-medular para obtener muestras de la primera, en cantidad aproximada de 0,5-1 ml. Del hígado se tomó una cantidad similar de tejido.

Seguidamente se identificaron el duodeno y el íleon terminal y se seccionaron sendos tramos de los mismos de unos 3-4 cm. de largo, los cuales fueron posteriormente abiertos longitudinalmente para tomar muestras de la mucosa por otro investigador. Por último se procedió a la toma de fragmentos del músculo vasto interno de la pata, generalmente

la derecha, para lo que se practicó antes una incisión en la cara interna del muslo. Las muestras fueron congeladas en nitrógeno líquido inmediatamente tras su extracción y conservadas a -80°C hasta emplearlas para las determinaciones.

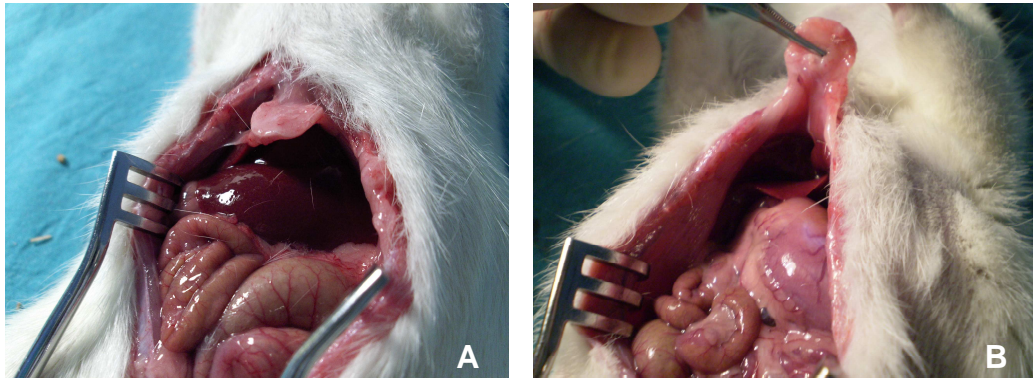


Figura-M8. Aspecto del hígado en las ratas controles (A) y sometidas a DPC (B). Nótese la diferencia de tamaño, mucho mayor en la rata control.

2.2. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS DE TEJIDO.

2.2.1. MUESTRAS DE ENTEROCITOS.

Las muestras de enterocitos se prepararon a partir de la mucosa del intestino de las ratas, utilizando por separado el duodeno y el íleon. Decidimos analizar datos de estos dos tramos intestinales por su diferente implicación en el metabolismo del AM a través de la síntesis y degradación del aminoácido glutamina por parte de las enzimas glutaminasa y glutamina-sintetasa. El duodeno es un área de gran consumo de glutamina y liberación de AM por acción de la enzima glutaminasa, aun mayor en la rata sometida a derivación portocava⁽¹⁵⁵⁾. El resto del intestino tiene una contribución menor en dicho

metabolismo del AM en la rata normal, siendo especialmente bajo en el íleon terminal⁽¹⁵³⁾.

Tras el sacrificio de los animales se les extrajo rápidamente tanto el primer tramo del intestino delgado como el último (duodeno e íleon terminal), tal y como se describe en el apartado anterior. Se lavó el interior de ambos tramos intestinales con tampón fosfato salino frío (PBS: ClNa 0,1M, KCl 3mM, Na₂HPO₄ 0,01M, KH₂PO₄ 0,002M, pH 7,4) en medio de aislamiento frío. Seguidamente se abrieron ambos en sentido longitudinal, exponiendo la superficie de las vellosidades intestinales. Se volvieron a lavar para terminar de eliminar los restos de material intestinal y con el canto de un porta para microscopía se arrastró la superficie de la mucosa, obteniendo un material mucoso por denudación de las microvellosidades, que se depositó en un tubo de Eppendorf para pesarlo antes de su congelación.

2.2.2. MUESTRAS DE CEREBRO.

Una vez decapitado el animal y abierta la cavidad craneal se procedió a la disección de las distintas áreas cerebrales. Se extrajo en primer lugar el cerebelo, que fue empleado para otras determinaciones dentro de diferentes estudios del grupo de investigación. Posteriormente tomamos las restantes áreas siguiendo el protocolo usado por el Dr. Vicente Felipe en Valencia, incluyendo muestras del córtex cerebral y los ganglios basales. Las diferentes áreas tomadas (córtex, ganglios basales y cerebelo) se muestran en el siguiente esquema (**Figura-M8**).

Una vez separadas las diferentes áreas, éstas fueron lavadas con con tampón fosfato salino frío (PBS: ClNa 0,1M, KCl 3mM, Na₂HPO₄ 0,01M, KH₂PO₄ 0,002M, pH 7,4) de manera análoga a la descrita para el caso de los enterocitos.

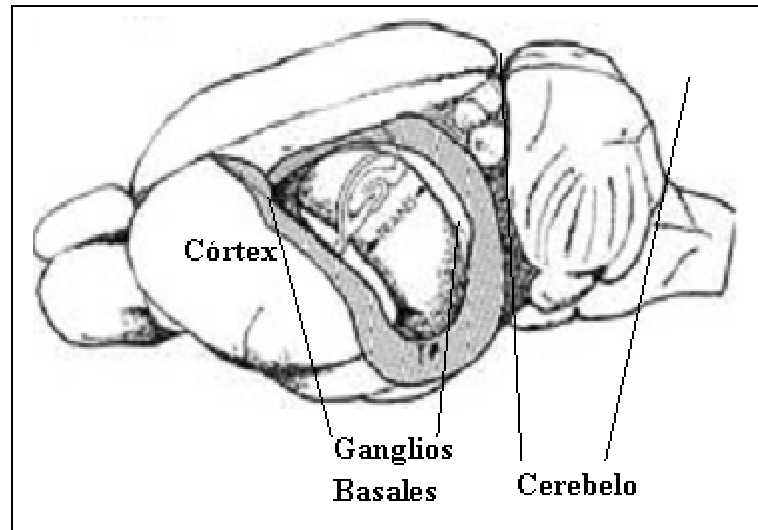


Figura-M8. Esquema de las áreas cerebrales de la rata. Se extrajeron por separado ambos hemisferios.

2.2.3. MUESTRAS DE RIÑÓN.

Una vez tomados los tramos intestinales referidos para extraer muestras de su mucosa se procedió a la liberación del riñón izquierdo, abriendo para ello la fina capa de peritoneo que lo cubría. Se seccionaron los elementos del pedículo renal a nivel hiliar (arteria, vena y uréter), extrayendo el órgano. Se colocó sobre un recipiente de vidrio con suero y sobre una base de hielo, practicándole una hemisección siguiendo su eje mayor y a través del hilio, quedando así el órgano separado en dos mitades simétricas. De esta forma eran fácilmente identificables las zonas de corteza, médula y pelvis renales. Mediante un bisturí se procedió a separar la corteza de la médula, para la toma de muestras selectivas de la misma, en cantidad similar a la que se obtuvieron de otros órganos (0,5-1 ml). El tratamiento dado a las

muestras fue el mismo al de las de enterocito y cerebro, con tampón fosfato salino frío, ya descrito.

2.2.4. MUESTRAS DE HÍGADO Y MÚSCULO.

Con estas muestras se procedió de similar manera a como se hizo con las demás, con la particularidad de que su obtención fue más sencilla que en los casos previos, por no precisar de ninguna técnica especial. El hígado quedó expuesto inmediatamente después de que la rata era sometida a la laparotomía, tomándose un fragmento de 0,5-1 ml de su borde libre, mientras que la muestra de músculo se tomó en cuantía similar de la cara anterior del muslo, previa incisión de la piel a dicho nivel. En ambos casos se procedió a tratarlas con tampón fosfato salino en medio frío tal y como se describió con otras muestras.

2.3. ESTUDIOS BIOQUÍMICOS.

2.3.1. DETERMINACIÓN DE AMONIO.

La cantidad de AM presente en la muestra se ha medido mediante el método enzimático de la glutamato-deshidrogenasa (GLDH) (laboratorios ROCHE, Barcelona), en un analizador COBAS Integra 700. La GLDH cataliza la aminación reductora del 2-oxoglutarato en presencia de ion AM y NADPH, para producir GLU y NADP⁺. La concentración del NADP⁺ es directamente proporcional a la concentración del AM consumido, por lo que la reacción se puede seguir midiendo la disminución de la absorbancia del NADPH a 340 nm⁽¹⁵⁶⁾. Para desplazar la reacción completamente hacia la derecha y poder hacerla cuantitativa, se la acopla a una segunda reacción, la de la

Glucosa-6P-deshidrogenasa, que consume el NADP⁺ que se forma en la primera.



2.3.1.1. DETERMINACIÓN DE AMONIO EN SANGRE.

Después de anestesiar y realizar una laparotomía media se procedió en primer lugar a la toma de muestras de sangre en todos los animales. Con el animal aun vivo se obtuvieron muestras de 2-3 ml mediante punción cardíaca directa. La sangre se recogió en tubos preparados con EDTA (10 mg por ml de sangre) que se centrifugaron a 3000 rpm. durante 5 minutos, para la obtención del plasma. Para ello se pipeteó el sobrenadante trasvasándolo a un tubo limpio. Estos tubos se utilizaron para medir la cantidad de AM presente en la muestra mediante el método enzimático de la GLDH, detallado con anterioridad.

2.3.1.2. DETERMINACIÓN DE AMONIO EN TEJIDOS.

Hemos utilizado las muestras de los tejidos congelados previamente, justo después del sacrificio de los animales de experimentación a -80°C, por lo que la homogenización se ha realizado en nitrógeno líquido y en mortero de cerámica. Para obtener el AM de los tejidos se añadieron 2 volúmenes de TCA al 10% por cada volumen de muestra y se *sonicó* la solución mediante 6 ciclos de 30 segundos cada uno. La *sonicación* consiste en agitar las muestras mediante la aplicación de ultrasonidos, de manera que las moléculas de agua en movimiento a la frecuencia transmitida por los ultrasonidos hacen

estallar las células, dejando libre su contenido. Seguidamente se centrifugó a 13000 x g durante 15 minutos a 4°C. El sobrenadante se neutralizó con KHCO_3 2M, realizando las determinaciones de las distintas cantidades de AM evitando la descongelación de los tejidos en su manipulación. La determinación de las concentraciones de AM en los tejidos se realizó como máximo dos días después del sacrificio para evitar contaminación de las muestras y pérdida del AM⁽¹⁵⁷⁾.

La cantidad de AM presente en la muestra se ha medido mediante el método enzimático de la GLDH tal y como se describe en el prospecto de la casa comercial (ROCHE) del analizador COBAS Integra 700, detallado con anterioridad.

2.3.2. DETERMINACIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO.

El óxido nítrico se ha determinado utilizando el suero como muestra de partida, por el método enzimático de la nitrato-reductasa en placas de 92 pocillos, mediante la determinación indirecta del paso de nitrato a nitrito. El nitrito se ha determinado mediante la reacción de diazotación de Griess-Illosay, en dos pasos, en los que el NO_2^- acidificado produce agentes nitrosantes, los cuales reaccionan con ácido sulfanílico para producir el ion diazonio. Este ión fue entonces acoplado a *N*-(1-naftil)-etilendiamina (*N*-NEDA) para formar el compuesto cromóforo azoderivado, un compuesto de color rosado, que absorbe luz a 565 nm (según las instrucciones del kit comercial, R&D System, Minneapolis⁽¹⁵⁸⁾).

En un primer paso se diluyeron las muestras de suero con tampón diluyente (R&D System, Minneapolis), se filtró a través de un filtro de Microcon YM-10 (Millipore Iberica). Se añadió sulfanilamida al

1% (peso/volumen) disuelta en HCl 2.5 M y cloruro de *N*-NEDA al 0.02% (peso/volumen). Se dejó desarrollar el color a temperatura ambiente durante 10 min. y se leyó a 565 nm.

La concentración de nitrito se determinó por extrapolación a partir de una recta de calibrado realizada con cantidades conocidas de nitrato en condiciones semejantes. El estándar también fue proporcionado por la casa comercial R&D System (Minneapolis).

2.4. TÉCNICAS ANALÍTICAS.

2.4.1. ANÁLISIS DE AMINOÁCIDOS POR HPLC

Para el análisis por HPLC se ha utilizado un sistema de Waters (Millipore Corporation, Milford, MA) para el análisis de aminoácidos por HPLC, equipado con una bomba Waters 600E (Multisolvent Delivery System), un detector de fluorescencia Waters-474 (Scanning Fluorescence Detector), un detector de UV Waters-2487 (Dual λ Absorbance Detector) y una columna de fase reversa (C18 Pico-Tag, P/N WAT010950 de 3,9 x 300 mm, Waters). Hemos utilizado el software Millennium-2000 para el registro y tratamiento de datos.

El paso previo para la determinación del contenido en aminoácidos libres mediante HPLC fue la desproteínización de la muestra con ácido tricloroacético (TCA) al 10%.

El siguiente paso realizado fue la **derivatización**, proceso químico mediante el cual se incorporó un grupo cromóforo (formándose un isoindolderivado) a cada aminoácido para poder cuantificarlo mediante un detector de fluorescencia. En este caso empleamos **AQC**,

siglas del reactivo 6-aminoquinolil-*N*-hidroxi-succinimidil-carbamato, derivado heterocíclico del *N*-hidroxi-succinimidil-carbamato, que reacciona tanto con aminas primarias como secundarias, convirtiéndolas en derivados estables de la urea, fácilmente detectables por fluorescencia a 395 nm, y liberando 6-aminoquinolina (AMQ), que no interfiere en la detección.

El proceso de derivatización tuvo lugar de acuerdo con la reacción representada en la **Figura-M9**.

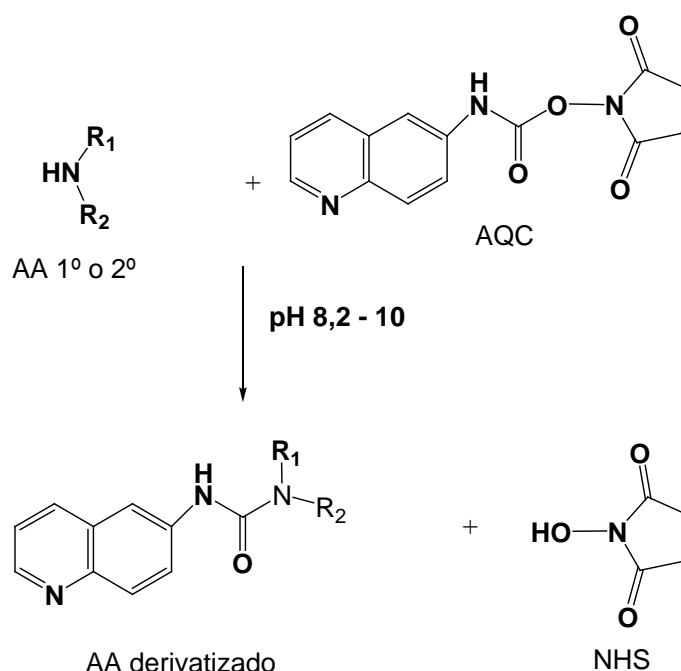


Figura-M9. Reacción de derivatización con AQC, liberando *N*-hidroxi-succinimidil (NHS)

Los derivados aminoácidos así obtenidos son estables a temperatura ambiente durante una semana.

Para la identificación y cuantificación de los aminoácidos se ha utilizado el **estándar de aminoácidos de Pierce (Figura-M10)**. El

contenido aminoacídico de las distintas muestras, expresado en porcentaje de aminoácido respecto al total de la muestra, se ha llevado a cabo mediante los softwares Millennium-2000 y Empower. El procedimiento seguido ha sido una modificación del descrito por Reverter⁽¹⁵⁹⁾ y el manual de Waters para la determinación de aminoácidos.

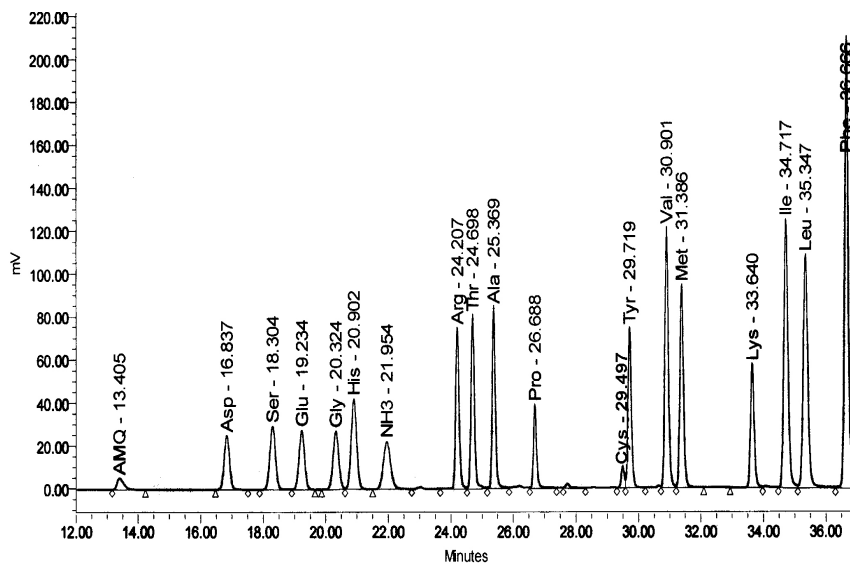


Figura-M10. Cromatograma de la solución estándar de aminoácidos (2,5 micromoles/ ml de aminoácidos).

El procedimiento se inició alicuoteando 35 μ l de muestra desproteinizada y 200 μ l de tampón Fluorborato ACQ para conseguir el pH óptimo de derivatización (entre 8,2 y 10). Las muestras así obtenidas se filtraron a través de 0,22 μ m, en tubos Microcon YM-10 (Millipore Iberica). A 70 μ l de esta solución filtrada se añadieron 37 μ l de reactivo fluorescente, se agitaron 15 segundos en vórtex, se dejó a temperatura ambiente durante 1 minuto y finalmente se introdujo 10 minutos en un bloque a 55°C. Se inyectaron 5 μ l del producto resultante en el HPLC.



Figura-M13. HPLC usado en los diferentes análisis.

2.4.2. PROTOCOLO DE MEDIDA DE IGF-1.

Se ha empleado el Kit comercial **Mouse/Rat IGF-1 RIA DSL-2900** (Diagnostic Systems Laboratorios, INC, USA). Para la lectura de los resultados se utilizó un analizador COBAS integra (Roche).

El proceso analítico seguido comenzó con el etiquetado de dos tubos de 1,5 ml, uno para la extracción y otro para la neutralización. Se pipetearon 25 μ L de muestra de plasma de rata en el primer tubo a la que se le añadieron 100 μ L de la solución de extracción. Se agitaron e incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugó a 10000 rpm durante 3 minutos a temperatura ambiente. Sin tocar el *pellet*, se transfirieron 50 μ l del sobrenadante al segundo tubo

etiquetado. Añadimos 250 µl de solución de neutralización al segundo tubo (que contenía el sobrenadante extraído). Se agitó en el vórtex suavemente, evitando la formación de espuma. Este extracto fue el utilizado en el ensayo. Todas las muestras se realizaron por duplicado.

Se añadieron 50 µl de estándar, control o muestras en su correspondiente tubo. Al control negativo se le añadió 150 µl de la misma concentración de Morse/Rat IGF-1 Standard.

Se añadieron 100 µl de reactivo Mouse/Rat IGF-I[1-125] en cada tubo. A esta mezcla se le adicionaron 100µl de Antisuero Mouse/Rat IGF-I a todos los tubos excepto al control negativo y se agitaron 1-2 segundos. Incubamos toda la noche a temperatura ambiente. Se añadieron 1 ml de reactivo de precipitación a todos los tubos y se agitó inmediatamente en vórtex. Se incubaron todos los tubos a temperatura ambiente durante 20 minutos. Se centrifugaron todos los tubos durante 20 minutos a 1500 g. Se decantaron todos los tubos en un soporte absorbente en un receptáculo para radioactividad. Se cuantificaron todos los tubos en un contador gamma durante un minuto.

Los resultados se calcularon por ajuste a una curva lineal logarítmica. Los estándares y controles fueron proporcionados por el kit comercial.

2.5. TRATAMIENTO CON IGF-1.

El grupo **problema** de los animales de experimentación, constituido por aquéllos sometidos a DPC se ha subdividido, a su vez, en dos subgrupos: un subgrupo que no recibió tratamiento farmacológico (grupo DPC) y otro subgrupo tratado con el factor de

crecimiento semejante a la insulina de tipo 1 recombinante humano (grupo DPC-IGF)

El segundo objetivo planteado en la presente tesis ha sido demostrar que en el modelo de hiperamoniemia de derivación porto-sistémica quirúrgica en ratas los niveles de IGF-1 estaban significativamente más bajos que en las ratas utilizadas como control. Como se detalla en el **apartado 6 de “Resultados”**, este objetivo se ha conseguido, por lo que el mencionado modelo quirúrgico resulta adecuado para reproducir la situación deficitaria en IGF-1 que padecen los pacientes hepatópatas. Basándonos en los resultados del equipo de investigación de la Facultad de Medicina de Pamplona (Conchillo y cols.), que demostraron la mejoría de los parámetros nutricionales y algunos otros de hepatopatía en los pacientes cirróticos tratados con IGF-1 recombinante humano (IGF-1rh), decidimos realizar un ensayo en los animales de experimentación sometidos a DPC, inyectándoles también IGF-1rh a las mismas dosis por Kg. de peso y siguiendo un protocolo similar al que en Pamplona se utilizó para el estudio en los pacientes cirróticos, con idea de analizar su efecto sobre el animal de experimentación. Estudios previos publicados por el mismo grupo de investigación demostraron su beneficio para la recuperación de múltiples parámetros (nutricionales, óseos, de fibrosis hepática, etc.) en ratas con cirrosis inducida por tetracloruro de carbono a dosis dobles a las administradas a los humanos. Decidimos, sin embargo tomar como referencia las dosis administradas a humanos por haberse demostrado en ellos su efecto beneficioso y sobre la base del elevadísimo coste del tratamiento con IGF-1rh.

El IGF-1 (GroPep, Australia), ha sido proporcionado por los Dres. Carlos Rodríguez y Jesús Prieto, del Centro de Investigaciones de Medicina Aplicada (CIMA) de Pamplona. El producto liofilizado se

disolvió en HCl 10 mM, a una concentración de 1 mg/ml y una vez alicuoteado (5 µl) lo conservamos a -80°C hasta su empleo. En estas condiciones el producto es estable durante 3 meses.

Para el tratamiento se han descongelado las alícuotas de IGF-1 necesarias, diluyéndose cada alícuota con 500 µl de suero fisiológico estéril. Se han inyectado a cada animal 250 µl de esta solución, por vía subcutánea (0,02 µg /g de peso del animal), cada 12 horas, durante 21 días, a partir del 7º día tras la intervención de DPC.

3. EQUIPOS UTILIZADOS.

Espectrofotómetro: capaz de analizar la franja de longitudes de onda entre la luz ultravioleta y la visible, modelo **Ultrospec 2100 Pro** (Amersham Biosciences). Se empleó para la determinación de óxido nítrico.

Medidor de pH: modelo **Crison MicropH-2000** (Crison Instruments S.A., Barcelona) de electrodo combinado, empleado para la estandarización de los tampones.

Bloque de calentamiento: modelo **Reacti-Therm™ Heating Module** (PIERCE), utilizado para la derivatización de los aminoácidos

Cromatógrafo: Sistema de **HPLC** (Waters, Milford, MA, USA), constituido por un detector de U.V. W 2487, un detector de fluorescencia Waters™ 474, un sistema de bombas “multisolvente” Waters™ 600 Pump controlado por los programas Millennium³² y Empower.

Analizador modelo **Cobas Integra**, de los laboratorios Roche. Para la determinación de IGF-1 y el AM.

Centrífuga

4. COMPUESTOS QUÍMICOS Y BIOQUÍMICOS EMPLEADOS.

Todos los reactivos y materiales utilizados han sido de máxima calidad, aptos para las determinaciones realizadas, de las siguientes empresas: Sigma-Aldrich, Bio-Rad, Amersaham-Biosciences, Invitrogen, Waters, Eppendorf, Beckam.

Detalles específicos sobre cada uno de ellos se han indicado en el correspondiente apartado.

5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Para el análisis estadístico y la generación de las gráficas se ha empleado el programa SPSS 15.0 (spss, Chicago, IL).

Se inició el estudio estadístico mediante el análisis descriptivo global y por grupos definidos por la variable grupo (control, *sham*, DPC y DPC-IGF1). Las variables cuantitativas se analizaron determinando medidas de tendencia central, como la media y la desviación estándar. Se introdujeron representaciones gráficas adecuadas según el tipo de información.

En primer lugar se determinó la homogeneidad de la muestra para la variable peso. Puesto que todos los animales incluidos fueron de sexo macho como requisito inexcusable, no fue preciso estudiar la homogeneidad de la muestra respecto de este rasgo. La ausencia de diferencias significativas para la variable peso entre los grupos de estudio fue de hecho uno de los condicionantes previos al estudio, por lo que su verificación estadística supuso necesariamente el punto de partida del mismo. Para determinar diferencias significativas entre los

grupos respecto al peso se procedió en primer lugar a determinar la idoneidad de aplicar un test estadístico paramétrico o bien uno no paramétrico. La aplicación de un test paramétrico exige tres condiciones previas: la aleatorización de la muestra (condición cumplida por el propio diseño del estudio), la existencia de una distribución normal de la variable así como la igualdad de sus varianzas (homocedasticidad) para los grupos estudiados. Para verificar la presencia de estas condiciones se realiza el test de normalidad de Shapiro-Wilk (por ser nuestro tamaño muestral para cada grupo inferior a 50) y el test para determinar la igualdad de varianzas de Lavene. Se estableció realizar un test de análisis de la varianza o ANOVA de un factor (test paramétrico) en caso de verificarse las condiciones necesarias o bien el test de la H de Kruskal-Wallis (no paramétrico) en caso contrario

Tras comprobarse la homogeneidad en relación con el peso de la muestra y como parte del diseño experimental se paso a **validar el modelo experimental** de anastomosis porto-cava para la reproducción de los efectos de la hepatopatía. Se efectuó para ello un estudio comparativo, teniendo en cuenta todas las variables medidas, del grupo control (grupo de ratas sanas) con respecto a los grupos *sham* y problema (DPC). El objetivo de este estudio estadístico fue determinar si el modelo de DPC reproducía los hallazgos de hepatopatía más representativos (descenso ponderal, hiperamonemia, aumento de los niveles de AM en ciertos tejidos, aumento de los niveles de óxido nítrico, niveles de IGF-1 y alteración la relación entre aminoácidos ramificados y aromáticos). Con posterioridad se realizó un estudio idéntico para todas las variables comparando en esta ocasión el grupo de DPC con el grupo de tratamiento (grupo DPC-IGF) para **comprobar el efecto del fármaco de estudio sobre el modelo experimental validado.**

A la luz de los resultados obtenidos en relación con los niveles de AM sanguíneo de las ratas intervenidas de DPC frente a las de ambos grupos controles, nos pareció interesante el análisis del “punto de corte” de los niveles de AM, a partir del cual podríamos considerar que un animal se encontraría, con mayor o menor fiabilidad, dentro de uno de estos grupos (DPC frente a controles, englobando éstos los grupos control y *sham*). La elección del “punto de corte” se ha realizado mediante la génesis de una **curva ROC** (*Receiver Operating Characteristics*, Características Operativas del Receptor). Éstas constituyen una herramienta fundamental en el proceso de evaluación de las pruebas diagnósticas y permiten conocer de forma global la calidad de una prueba en el espectro completo de puntos de corte, variables en función del criterio definitorio de la separación entre la población sana y la enferma⁽¹⁶⁰⁾.

La curva ROC es un gráfico en el que se observan todos los pares sensibilidad-especificidad resultantes de la variación continua de los puntos de corte en todo el rango de resultados observados. En el eje *y* de coordenadas se sitúa la *sensibilidad* (razón de verdaderos positivos, calculada en el grupo de pacientes enfermos), mientras que en el eje *x* se sitúa la fracción de falsos positivos o *1-especificidad*. Cada punto de la curva representa un par Sensibilidad/1-Especificidad correspondiente a un nivel de decisión determinado.



IV. RESULTADOS

1. ESTUDIO DE LA HOMOGENEIDAD DE LA MUESTRA.

Fueron incluidos en el estudio un total de 32 animales, divididos en 4 grupos de 8 cada uno, según se especificó en el **apartado 1 de "Material y Método"**. El primer paso fue la determinación de la homogeneidad de los animales empleados en relación con la variable peso, según se especificó en el **apartado 5 de "Material y Método"**, como condición previa al análisis estadístico del resto de las variables.

El peso medio de los animales del estudio fue muy cercano a los 300g (299,66), aunque con un rango muy amplio, incluyendo ratas desde los 235 hasta los 450g. Seguidamente se procedió a determinar la homocedasticidad y la normalidad del grupo respecto de esta variable (**Tabla-R1 y Tabla-R2**).

Valor del estadístico	Grado de libertad 1	Grado de libertad 2	Significación	Igualdad de varianzas
0.101	2	29	0.904 [¶]	Existe igualdad (p>0.05)

Tabla-R1: Análisis de la Homogeneidad de las Varianzas (test de Lavene).

¶ Con un valor crítico (valor p) mayor de 0.05 no existen diferencias significativas entre las varianzas de la variable peso para los grupos, existiendo, por tanto, igualdad de varianzas.

	Valor del estadístico	Grado de libertad	Significación asintótica (valor de p)	Hipótesis de normalidad
Controles	0.884	16	0.045†	Distribución No normal ($p < 0.05$)
DPC	0.840	8	0.076	Distribución normal
DPC-IGF	0.774	8	0.015†	Distribución No Normal ($p < 0.05$)

Tabla-R2: Análisis de la normalidad (test de Shapiro-Wilk).

† Solo en el caso del grupo DPC se observó la existencia de una $p > 0.05$ que demostraba ausencia de diferencias significativas, asumiendo por tanto la hipótesis de la existencia de normalidad en la distribución. En cambio el valor crítico (valor de p) para los grupos controles y DPC-IGF en el Tes. de Shapiro-Wilk presentó un valor inferior a 0.05 concluyéndose la no-aceptación de la hipótesis de normalidad para ellos.

La ausencia de normalidad en la distribución de los valores de la variable peso para los grupos de control y DPC-IGF obligó al empleo de un test no paramétrico, en este caso el de análisis de la varianza por rangos o test de la H de Kruskal-Wallis (**Tabla-R3**).

Valor del estadístico (Chi-cuadrado)	2.175
Grado de libertad	1
Significación asintótica (valor de p)	0.140‡

Tabla-R3: Test de Kruskal-Wallis para la variable Peso.

‡ Dado que el valor de p resultó mayor de 0.05 se estableció que **no existían diferencias estadísticamente significativas** entre los grupos para la variable peso del animal.

2. TIEMPO DE REALIZACIÓN DE LAS ANASTOMOSIS.

El grupo “problema” del estudio lo constituyeron los 18 animales a los que se les practicó una anastomosis porto-cava según la técnica descrita en el **apartado 1.2. de “Material y Métodos”**. Entre ellos se produjo una mortalidad postoperatoria global del 5,89%, es decir, que sobrevivieron 16 ratas, las cuales se subdividieron en los 2 grupos DPC y DPC-IGF1, con 8 individuos cada uno. En los animales que fallecieron coincidió la circunstancia de que se prolongó el tiempo de oclusión vascular, siendo superior a 20 minutos, durante la realización de la anastomosis entre la porta y la cava. Entre los animales que sobrevivieron y que fueron objeto del estudio, el tiempo medio de dicha oclusión vascular fue de 13,25 minutos y en el 93,8% de ellos, este tiempo fue igual o inferior a los 15 minutos.

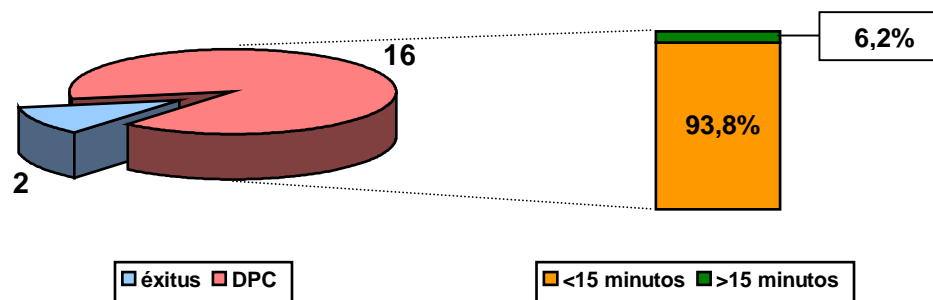


Figura-R1: supervivencia a la cirugía y relación con el tiempo de oclusión vascular

3. INFLUENCIA DE LA DERIVACIÓN PORTO-CAVA EN EL PESO.

En la **Figura-R2** se muestra la evolución de los pesos de los animales a lo largo del estudio, semana a semana. Todos los animales (controles sin operar, operadas *sham* y ratas con DPC) fueron pesados al inicio, justo antes de la intervención quirúrgica y una vez por semana hasta el momento del sacrificio, a las cuatro semanas.

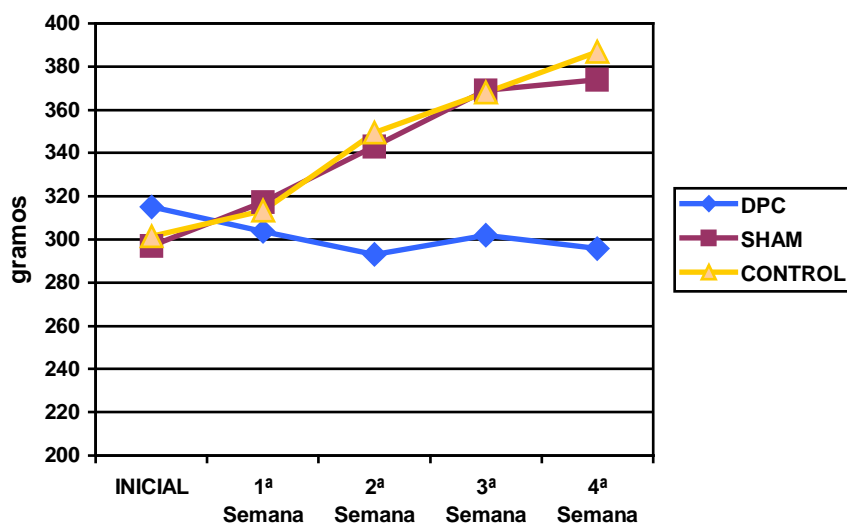


Figura-R2. Evolución ponderal semana a semana en los tres grupos de estudio.

Los resultados obtenidos fueron: **a) Animales control:** $301,6 \pm 67,58$ g al inicio del estudio y $386,95 \pm 54,23$ g en el momento de la finalización (diferencia + 85,35 g). **b) Animales *sham*:** $297,12 \pm 52,88$ g al inicio y $374,82 \pm 41,95$ g a las 4 semanas (diferencia + 77,7 g). **c) Animales con DPC:** $315,12 \pm 64,11$ g al inicio del estudio y $295,73 \pm 48,92$ g en el momento de su sacrificio (diferencia - 19,38 g).

En la **Figura-R3** se muestra el incremento del peso de los animales (>0) o la pérdida de peso (<0) en los tres grupos comparados, semana a semana, para un total de 24 ratas.

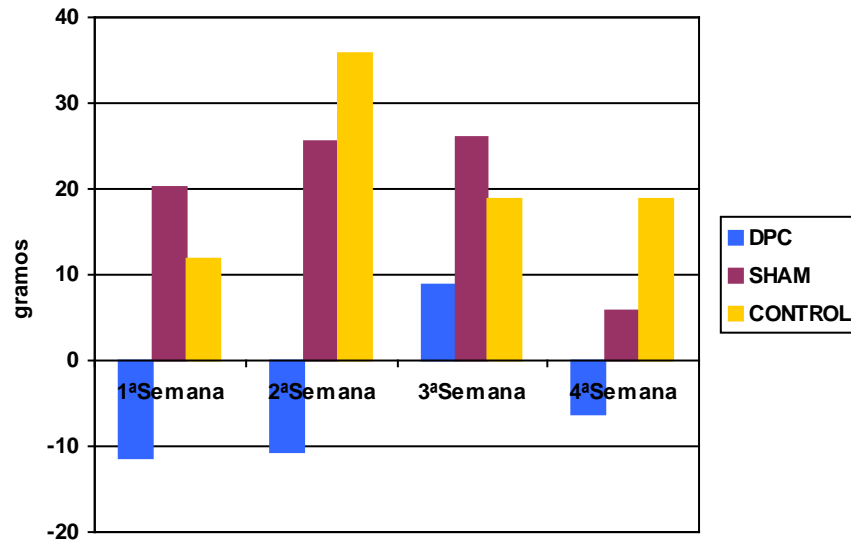


Figura-R3. Ganancia de peso en ratas control, sham y con DPC, semana a semana.

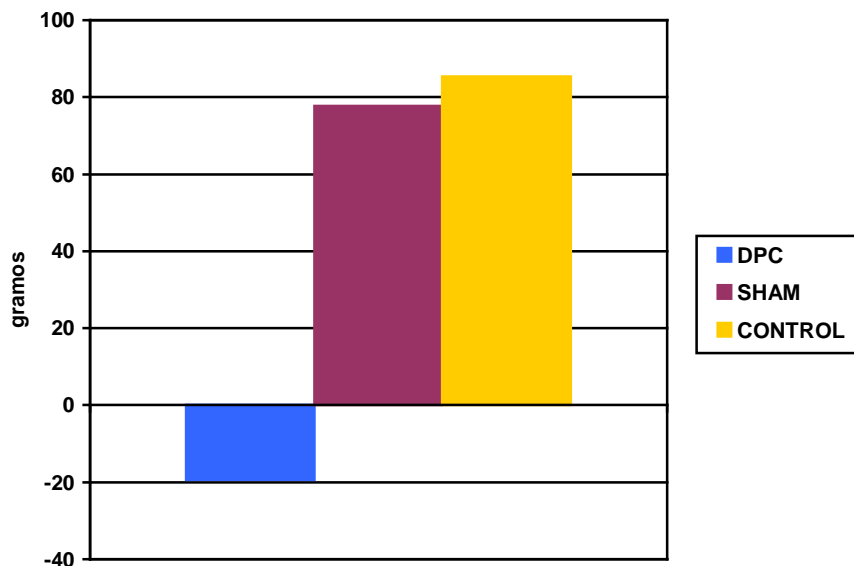


Figura-R4. Ganancia global de peso en ratas controles, sham y con DPC.

En la **Figura-R4** se muestra la ganancia (>0) o la pérdida de peso (<0) total, tras las cuatro semanas de estudio (diferencias entre el peso al inicio y al final del estudio), para los tres grupos y un total de 24 animales.

Estos resultados evidencian que los animales control (sin operar) y operados *sham* incrementaron de manera sostenida su peso a lo largo de los 28 días del estudio, mientras que los animales con DPC experimentaron una disminución global del peso, que analizada semana a semana, se comprobó especialmente acentuada en los primeros 14 días tras la intervención.

4. INFLUENCIA DE LA DERIVACIÓN PORTO-CAVA EN LOS NIVELES DE AMONIO.

El AM, principal agente causante de la encefalopatía hepática, se midió tanto en la sangre como en diferentes tejidos: cerebro, hígado, músculo, riñón e intestino (duodeno e íleon).

4.1. MEDIDA DE AMONIO EN SANGRE

La determinación de AM se llevó a cabo tal y como se describe en el **apartado 2.3.1.1 de “Material y Métodos”**. Se presentan los datos correspondientes a los niveles de AM en plasma. Los valores obtenidos han sido: $146,37 \pm 62,82$ $\mu\text{g/dl}$ en el grupo de controles, $120,31 \pm 60,76$ $\mu\text{g/dl}$ en el grupo de las ratas *sham*, y de $616,37 \pm 327,38$ $\mu\text{g/dl}$ en el grupo de las ratas con DPC.

Los valores medios \pm desviación estándar (DE) de las diferentes concentraciones de AM en plasma se muestran en la **Figura-R5**.

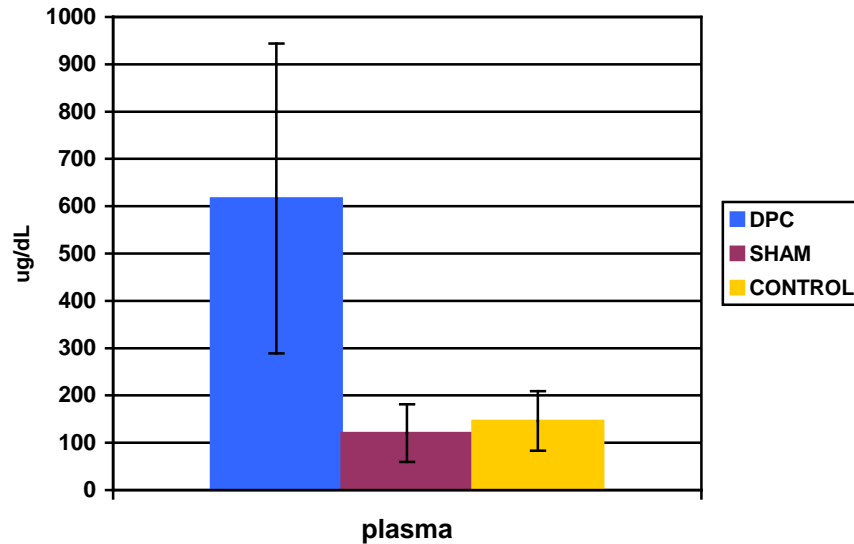


Figura-R5. AM en plasma de ratas DPC frente a controles y *sham*.

Como puede observarse, las diferencias entre los valores obtenidos para ratas controles (no operados y *sham*) y ratas con DPC son estadísticamente significativas, con un valor de $p \leq 0.01$, en ambos casos. Sin embargo, no existe diferencia estadísticamente significativa entre sí de los valores obtenidos para los dos grupos control.

4.1.1. DEFINICIÓN DEL PUNTO DE CORTE DEL AMONIO PLASMÁTICO.

En la **Figura-R6** se representa la curva **COR** empleada para generar el punto de corte de los niveles de AM plasmático.

En la **Tabla-R4** se muestran los resultados de sensibilidad y especificidad para cada cifra de AM plasmático. Elegimos el punto de corte en 255,5 $\mu\text{g/dl}$, pues en él coincidieron tanto la especificidad como la sensibilidad del 100%. Así pues, el área bajo la curva fue del 100%, con un intervalo de confianza del 95% de también el 100%.

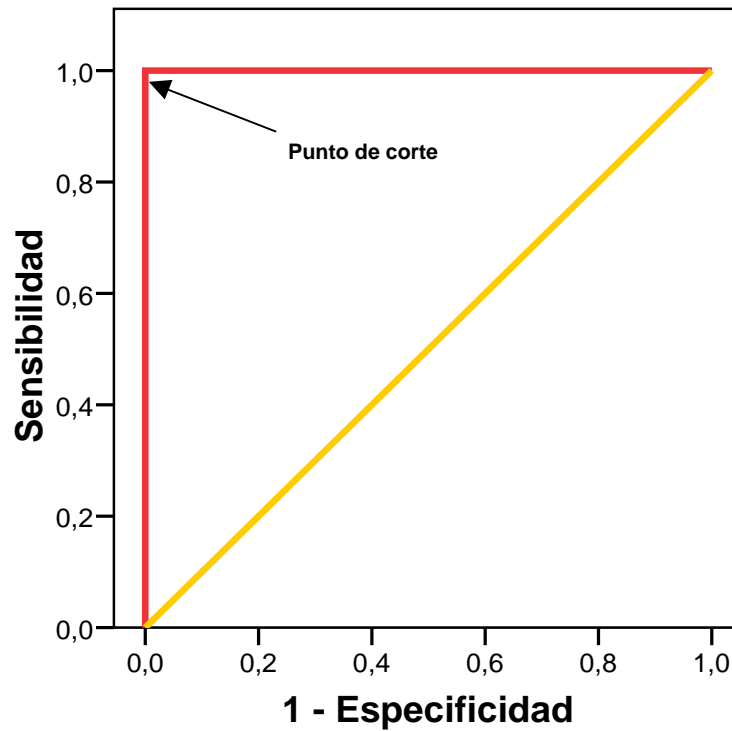


Figura-R6. Curva COR para sensibilidad y especificidad del AM plasmático.

Positivo si es mayor o igual que	Sensibilidad	Especificidad	Positivo si es mayor o igual que	Sensibilidad	Especificidad
61	100	0	189,5	100	75
63	100	6,2	204	100	81,2
70,75	100	12,5	215	100	87,5
78,25	100	18,7	234,5	100	93,7
82	100	25	255,5	100	100
89,5	100	31,2	331,5	87,5	100
96	100	37,5	411,5	75	100
101	100	43,7	474,5	62,5	100
108,5	100	50	528,5	50	100
128	100	56,2	566	37,5	100
149,5	100	62,5	754,5	25	100
168,5	100	68,7	1093,5	12,5	100
			1281	0	100

Tabla-R4. Punto de corte de los valores de AM plasmático.

4.2. MEDIDA DE AMONIO EN TEJIDOS.

Los niveles de AM también se han medido en diferentes tejidos: cerebro, hígado, músculo, riñón e intestino (duodeno e íleon por separado), cuya determinación se llevó a cabo tal y como se describe en el apartado 2.3.1.2 de “Material y Métodos”. En la **Tabla-R5** se muestran de manera resumida los resultados. Como puede observarse, en la práctica totalidad de los tejidos estudiados, salvo el músculo, la concentración de AM estuvo más elevada en los animales con DPC que en los dos grupos control (ratas sin operar y *sham*).

	Control	Sham	DPC
Cerebro	0,92±0,22	1,02±0,45	1,67±1,04
Hígado	2,09±0,56	2,13±0,31	2,89±1,75
Músculo	1,72±0,65	2,14±1,21	2,03±1,40
Riñón	4,12±0,60	3,93±0,96	4,98±0,69
Duodeno	1,98±0,47	1,91±0,37	4,24±5,62
Ileon	2,20±0,96	2,15±0,67	2,44±0,68

Tabla-R5. Tabla resumen de los niveles de AM en los diferentes tejidos.

Los niveles de AM encontrados en el **cerebro**, medido a nivel del córtex, fueron: 1,67±1,04 μ moles/g de tejido en ratas con DPC *versus* 1,02±0,45 μ moles/g de tejido en ratas *sham* y 0,92±0,22 μ moles/g de tejido en ratas controles. Para estos valores el valor de p no fue estadísticamente significativo en ninguna de las comparaciones (p= 0.06 para ratas control frente a ratas DPC y p= 0,12 para ratas *sham* frente a ratas DPC).

En la **Figura-R7** se muestra el incremento de la concentración de AM \pm DE en el cerebro de las ratas con DPC frente a las ratas controles y *sham*.

Como puede observarse, los niveles de AM en el cerebro de las ratas con DPC fueron mayores que en las ratas controles y *sham*, si bien esta diferencia no alcanzó significación estadística. Se considera secundario a la mayor concentración plasmática de AM en las ratas con DPC y, por tanto, causa de encefalopatía hepática en este grupo.

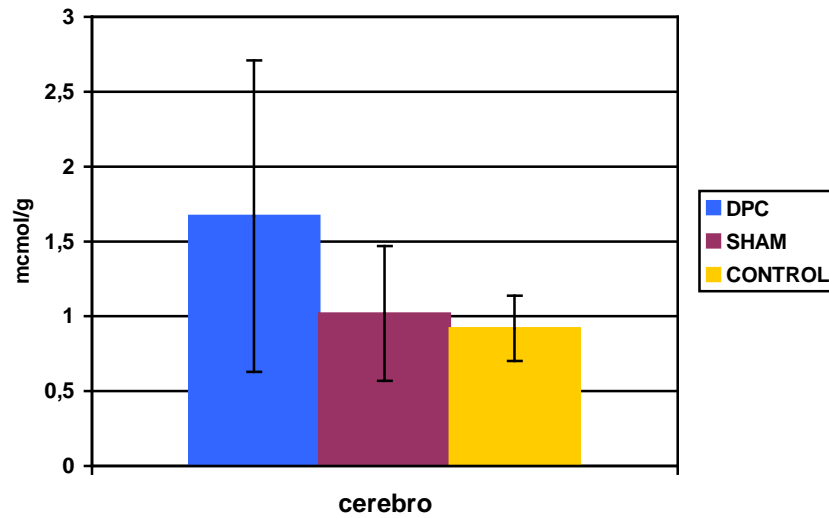


Figura-R7. Representación de los valores medios \pm DE del AM en el córtex cerebral de los diferentes grupos.

Los niveles de AM en el **hígado** de las ratas con DPC fueron de $2,57 \pm 1,63$ μ moles/g de tejido frente a los $2,01 \pm 0,52$ μ moles/g de tejido y $2,11 \pm 0,29$ μ moles/g de tejido observados en ratas sin operar y en ratas *sham*, respectivamente. En ambas comparaciones, el valor de p resultó significación estadística ($p= 0,27$ para grupo DPC frente a control y $p= 0,24$ frente a sham).

En la **Figura-R8** se muestra el incremento de la concentración de AM \pm DE en el hígado de las ratas con DPC frente a las ratas controles y *sham*. Como puede observarse, los niveles de AM en el hígado de las ratas con DPC fueron mayores que en las ratas controles y *sham*, si bien esta diferencia no alcanzó significación estadística.

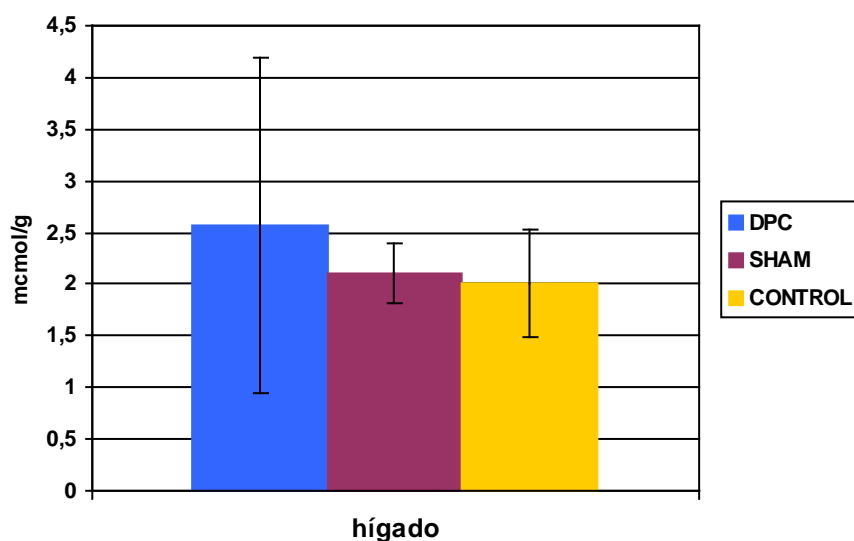


Figura-R8. Representación de los valores medios \pm DE del AM en el hígado de los diferentes grupos.

En el **músculo**, los niveles de AM observados en los tres grupos de animales estudiados, controles, *sham* y DPC fueron muy similares: $1,72 \pm 0,65$ μ moles/g de tejido, $2,14 \pm 1,21$ μ moles/g de tejido y $2,03 \pm 1,40$ μ moles/g de tejido, respectivamente, siendo el valor de p no significativo estadísticamente en ninguna de las dos comparaciones.

En la **Figura-R9** se muestran los valores de la concentración de AM \pm DE en el músculo de las ratas con DPC frente a las ratas controles y *sham*. Como puede apreciarse, éstos fueron muy similares en todos los grupos, menor en grupo DPC que en el grupo *sham* y prácticamente equivalente al del grupo control.

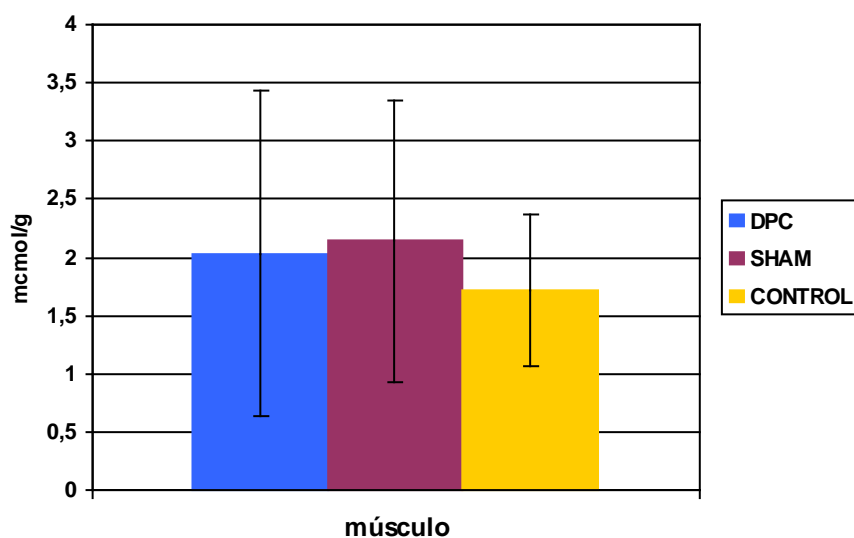


Figura-R9. Representación de los valores medios \pm DE del AM en el músculo de los diferentes grupos.

La concentración de AM en la corteza **renal** presentó los siguientes valores para ratas con DPC frente a los obtenidos en ratas controles y *sham*: $4,98 \pm 0,69$ μ moles/g de tejido, frente a $4,12 \pm 0,60$ μ moles/g de tejido y $3,93 \pm 0,96$ μ moles/g de tejido, respectivamente. Las diferencias observadas entre los animales con DPC y ambos grupos control fueron estadísticamente significativas ($p < 0,05$ en ambos casos).

En la **Figura-R10** se muestra el incremento de la concentración de AM \pm DE en el riñón de las ratas con DPC frente a las ratas controles y *sham*. Podemos apreciar que existe mayor contenido de AM en las ratas DPC que ambos grupos control.

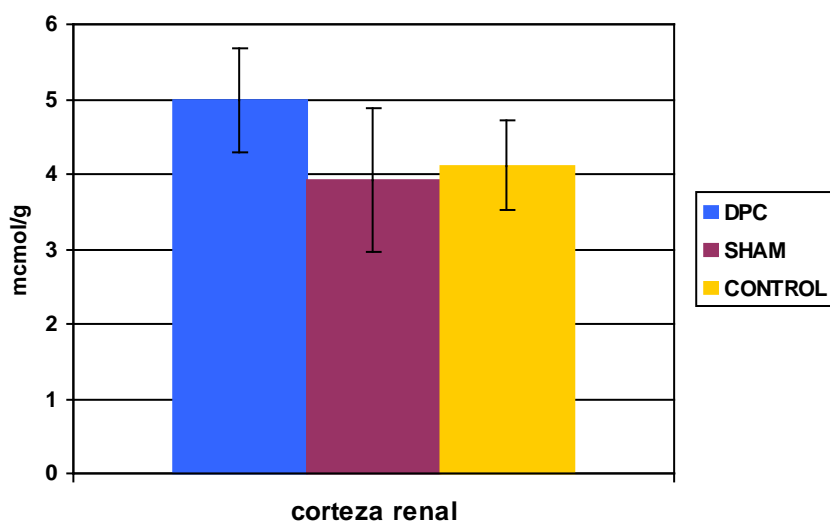


Figura-R10. Representación de los valores medios \pm DE del AM en el riñón de los diferentes grupos.

Los niveles de AM también se midieron en la mucosa del **duodeno**. Los valores obtenidos en las ratas con DPC frente a ambos grupos utilizados como control (sham y sin operar) fueron, respectivamente $4,24 \pm 5,62$ μ moles/g de tejido frente a $1,91 \pm 0,37$ μ moles/g de tejido y $1,98 \pm 0,47$ μ moles/g de tejido. Las diferencias observadas no resultaron, en ninguno de los dos enfrentamientos, estadísticamente significativas.

En la **Figura-R11** se muestra el incremento de la concentración de AM \pm DE en el duodeno de las ratas con DPC frente a las ratas controles y *sham*. Podemos apreciar que existe mayor contenido de AM en las ratas DPC que en ambos grupos control.

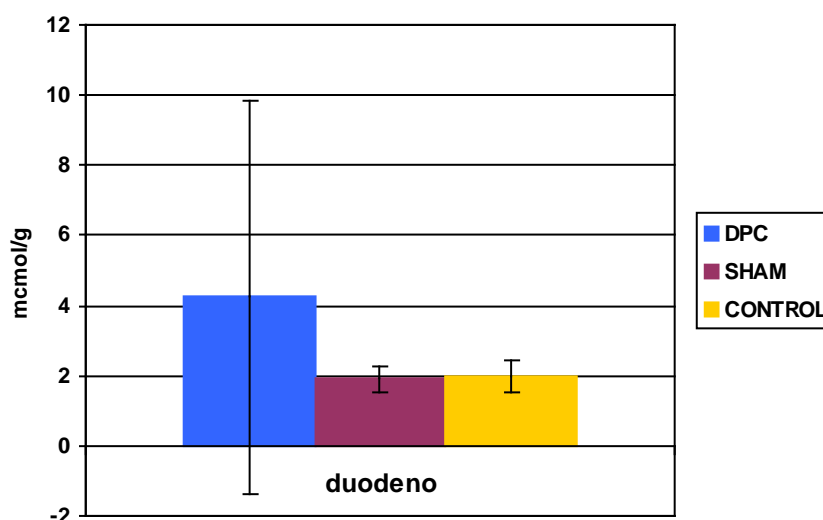


Figura-R11. Representación de los valores medios \pm DE del AM en el duodeno de los diferentes grupos.

Por último, se realizaron determinaciones de AM en la mucosa del **íleon**. Los valores encontrados en los diferentes grupos DPC, control y *sham* fueron $2,44 \pm 0,68$ μ moles/g de tejido, $2,20 \pm 0,96$ μ moles/g de tejido y $2,15 \pm 0,67$ μ moles/g de tejido, respectivamente. Las diferencias fueron, en ambas comparaciones, estadísticamente no significativas.

En la **Figura-R12** se muestra el incremento de la concentración de AM \pm DE en el íleon de las ratas con DPC frente a las ratas controles y *sham*. Podemos apreciar que existe cierto mayor contenido de AM en las ratas DPC que en ambos grupos control, aunque a efectos prácticos podrían considerarse unos niveles equivalentes.

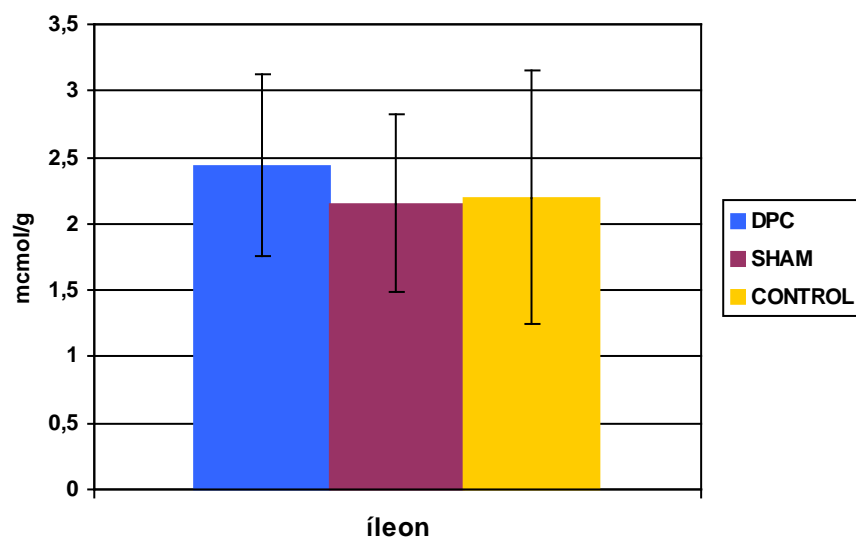


Figura-R12. Representación de los valores medios \pm DE del AM en el íleon de los diferentes grupos.

5. INFLUENCIA DE LA DERIVACIÓN PORTO-CAVA EN EL PERFIL DE AMINOÁCIDOS EN SANGRE.

Además de la HAM, los enfermos con EH se caracterizan por presentar un aminograma desequilibrado en el que la concentración de aminoácidos aromáticos (AAAs: Fenilalanina, Tirosina, Triptófano) está significativamente elevada, mientras que la concentración de aminoácidos ramificados (AARs: Leucina, Isoleucina, Valina) está significativamente disminuida⁽¹⁶¹⁾.

Por este motivo hemos medido los niveles de aminoácidos plasmáticos en nuestros grupos de ratas, con el fin de ratificar que también cumplen dicha condición, contribuyendo a validar el modelo experimental. Los niveles de los diferentes aminoácidos se analizaron

mediante el sistema HPLC, tal y como se describe en el **apartado 2.4.1 de “Material y Métodos”**.

En la **Figura-R13** se muestra de una manera gráfica el perfil de los principales aminoácidos en los diferentes grupos de animales (DPC, *sham* y control). Los valores de cada uno de ellos están expresados en forma porcentual respecto del total de los aminoácidos determinados para cada uno de los individuos, tal y como se especifica en el apartado “material y métodos”. Para todos los aminoácidos referidos se observa una diferencia clara entre los niveles encontrados en ratas con DPC y las ratas controles o *sham* ($p \leq 0,001$).

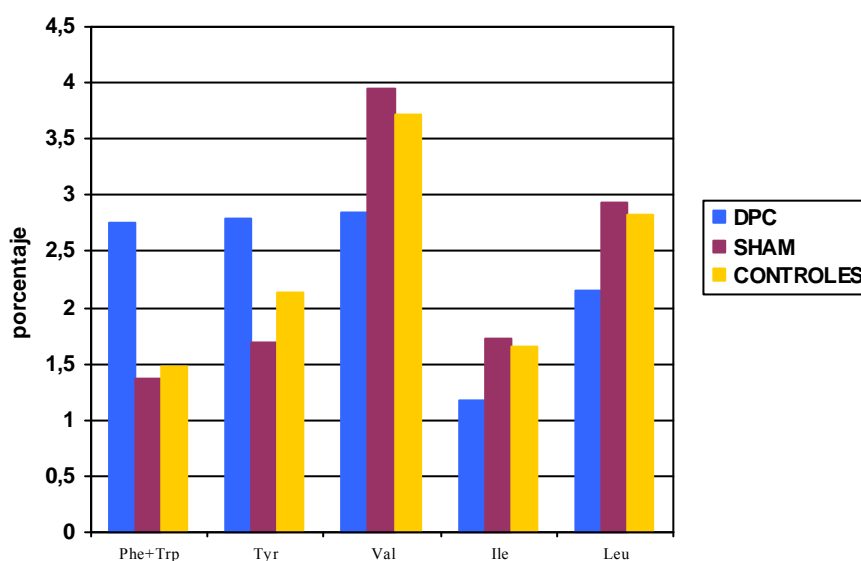


Figura-R13. Perfil de aminoácidos en sangre de ratas con DPC frente controles y *sham*.

En la **Figura-R14** se muestran representadas las razones de Fisher (relación entre los AARs y los AAAs) para los diferentes grupos de animales intervenidos (DPC, control y *sham*).

La Razón o Cociente de Fisher [cociente entre los aminoácidos ramificados (AARs) y los aminoácidos aromáticos (AAAs)] fue de $1,13 \pm 0,21$ en ratas con DPC frente a $2,29 \pm 0,41$ en ratas controles y $2,81 \pm 0,32$ en las *sham*. En ambas comparaciones la diferencia fue significativa desde el punto de vista estadístico ($p < 0,001$ en ambos casos), consecuencia del alto nivel relativo de AAAs encontrados en las ratas con DPC respecto de los niveles encontrados en las ratas controles, tanto sin operar como *sham*.

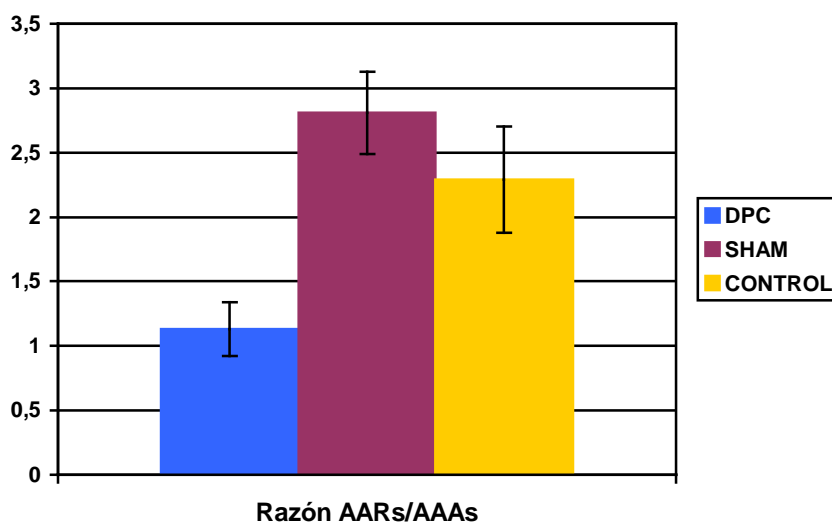


Figura-R14. Representación de los diferentes Cocientes de Fisher.

6. INFLUENCIA DE LA DERIVACIÓN PORTO-CAVA EN LOS NIVELES DE ÓXIDO NÍTRICO EN LA SANGRE.

La metodología de la determinación del óxido nítrico en la sangre de las ratas se describe en el **apartado 2.3.2 de “Material y Métodos”**.

Sus niveles en los animales sometidos a DPC fueron $116,32 \pm 60,07 \mu\text{mol/l}$, mayores que los de las ratas control ($89,91 \pm 13,32 \mu\text{mol/l}$) y *sham* ($94,53 \pm 16,72 \mu\text{mol/l}$), pero sin presentar significación estadística en ninguna de las dos comparaciones.

En la **Figura-R15** se muestran los valores medios \pm DS para la concentración de óxido nítrico en sangre de los tres grupos de animales estudiados.

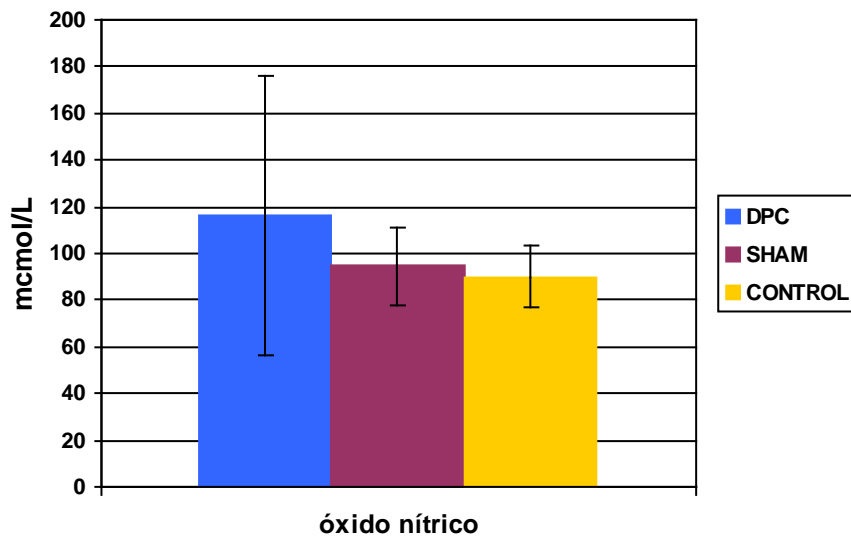


Figura-R15. Niveles de óxido nítrico en sangre.

7. INFLUENCIA DE LA DERIVACIÓN PORTO-CAVA SOBRE LOS NIVELES DE IGF-1.

La determinación de IGF-1 se realizó siguiendo las especificaciones detalladas en el apartado 2.4.2 de “Material y Métodos”.

Los niveles de IGF-1 en la sangre de las ratas sometidas a DPC fueron de $557,37 \pm 437,91$ frente a $1505,75 \pm 444,16$ de los animales control y $1109,85 \pm 706,02$ de los sham, con significación estadística ($p < 0,01$) en la comparación entre el grupo DPC y los dos grupos controles.

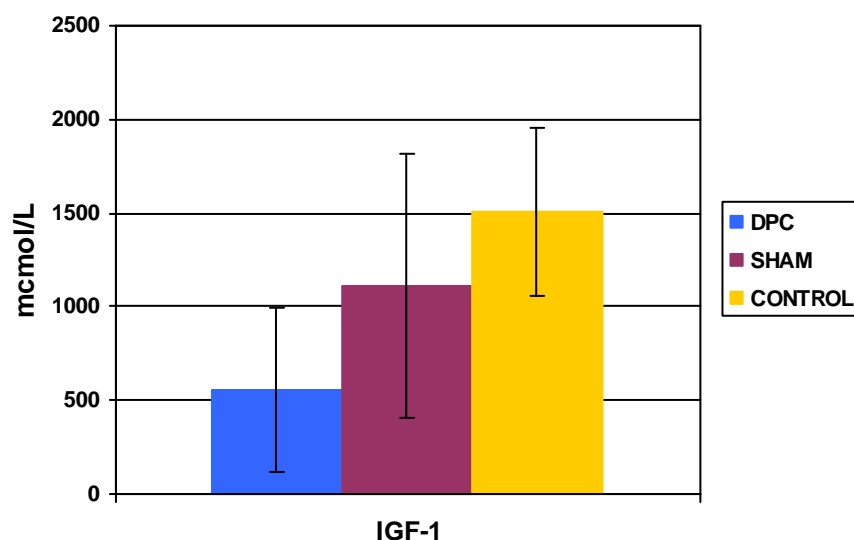


Figura-R16. Niveles de IGF-1 en sangre.

En la **Figura-R16** se muestran gráficamente los niveles de IGF-1 \pm DE en los 3 grupos de animales estudiados. Los niveles fueron mucho más bajos en el grupo de ratas DPC, especialmente frente al grupo control.

7.1. RELACIONES DE LOS NIVELES DE IGF-1.

7.1.1. RELACIÓN CON EL AMONIO PLASMÁTICO.

En la **Figura R-17** se muestra la correlación con los niveles de AM en plasma. Se detectó una correlación significativa entre ambos ($r=$

0,55; $p= 0,002$), de manera que encontramos valores de AM plasmático más bajos en las ratas que presentaban niveles de IGF-1 más altos.

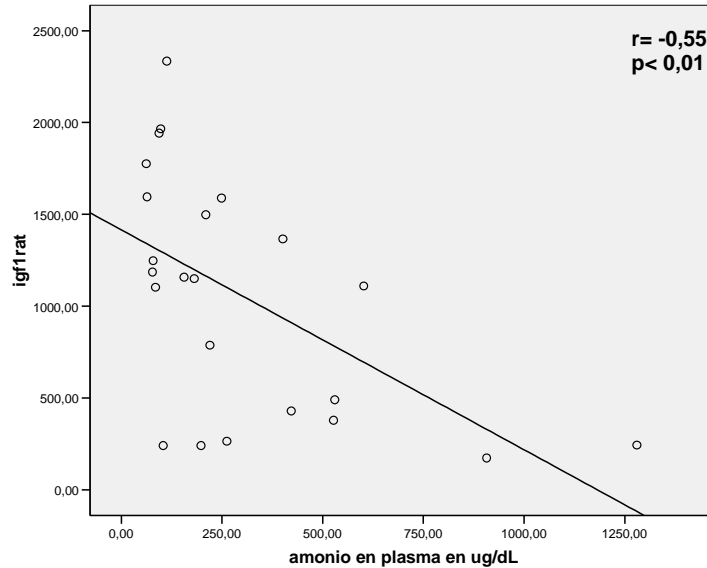


Figura-R17: Correlación entre los niveles de AM plasmático y los de IGF-1.

7.1.2. RELACIÓN CON EL COCIENTE AARs/AAAs.

En la **Figura-R18** se muestra la correlación con el Cociente de Fisher (relación AARs/AAAs). Se detectó una correlación significativa entre la relación AARs/AAAs y los niveles de IGF-1 ($r= 0,37$; $p< 0,05$), de manera que corresponden valores mas altos de la relación AARs/AAAs a los niveles más altos de IGF-1.

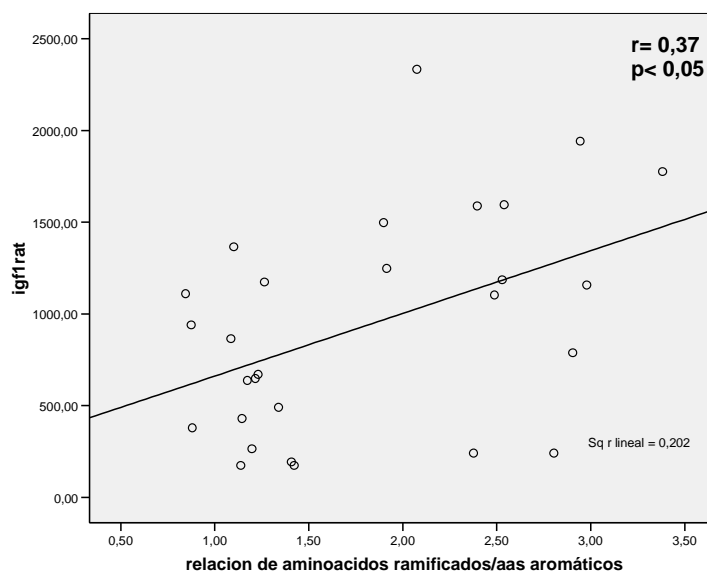


Figura-R18: Correlación entre la relación de Fisher y los niveles de IGF-1.

7.2. DEFINICIÓN DEL PUNTO DE CORTE DEL NIVEL DE IGF-1.

En la **Figura-R19** se representa la curva **COR** empleada para generar el punto de corte de los niveles de IGF-1.

En la **Tabla-R6** se muestran los resultados de sensibilidad y especificidad para cada cifra de AM plasmático. Elegimos el punto de corte en 1130 $\mu\text{g}/\text{dl}$, pues en él coincidieron una especificidad de 87,5% y una sensibilidad de 73,3%. De esta forma, el área bajo la curva fue del 81%, con un intervalo de confianza del 95% para entre el 66,3 y 99,8% de los casos.

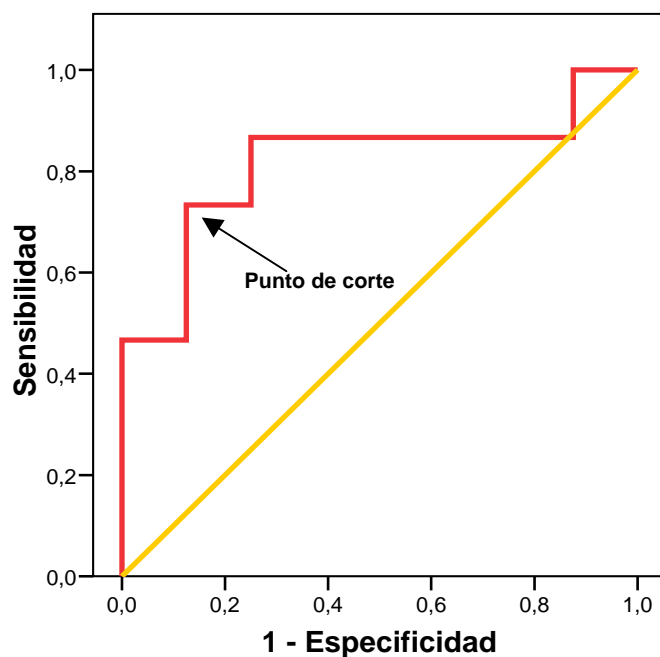


Figura-R19. Curva COR para sensibilidad y especificidad del AM plasmático.

Positivo si es mayor o igual que	Sensibilidad	Especificidad	Positivo si es mayor o igual que	Sensibilidad	Especificidad
173	100	0	1172	60	87,5
207,5	100	12,5	1217	53,3	87,5
242,5	86,7	12,5	1307	46,7	87,5
254,5	86,7	25	1432	46,7	100
322	86,7	37,5	1543,5	40	100
404,5	86,7	50	1592	33,3	100
460,5	86,7	62,5	1685,5	26,7	100
639,5	86,7	75	1859	20	100
945,5	80	75	1954	13,3	100
1106,5	73,3	75	2150	6,7	100
1130	73,3	87,5	2335	0	100
1154	66,7	87,5			

Tabla-R6. Punto de corte de los valores de IGF-1.

8. EFECTO DEL TRATAMIENTO CON IGF-1 EN LAS RATAS CON DERIVACIÓN PORTO-CAVA.

En esta fase del estudio se añadió un grupo de animales, a los que también se les realizó una DPC, según la descripción que aparece en el apartado **1.2 de “Material y Métodos”**, con la especificación de que recibieron durante las siguientes semanas tratamiento exógeno con IGF-1. Por tanto, en este caso los datos estarán referidos a 32 animales: 8 ratas controles, 8 *sham* y 16 ratas con DPC, 8 de ellas tratadas con IGF-1 y 8 sin él.

Ninguna de las ratas tratadas con IGF-1rh presentó problemas ostensibles que pudiesen atribuirse a la administración del fármaco, ni se perdieron individuos del grupo por fallecimiento durante las 4 semanas que se prolongó el estudio.

8.1. EFECTO DEL IGF-1 SOBRE EL PESO.

En el análisis de la evolución del peso se observa que las ratas tratadas con IGF-1rh ganan peso ($9,9 \pm 0,8$ gramos; valor > 0), mientras que las ratas no tratadas pierden peso ($40,0 \pm 1,2$ gramos: valor < 0). Además hay que destacar que el aspecto externo (sobre todo el pelaje) y la sensación de salubridad fue mejor en los animales tratados que en los sin tratar.

En la **Figura-R20** se muestran los incrementos de los pesos (en forma de ganancia >0 o pérdida < 0) para todos los grupos estudiados: ratas controles, *sham* y con DPC, tratadas con IGF-1 y sin tratar.

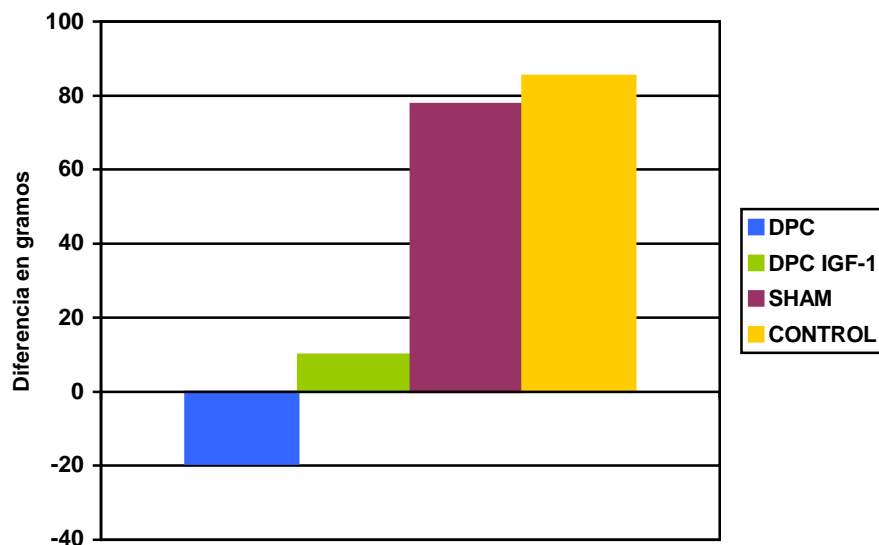


Figura-R20. Estudio de ganancia (>0) y pérdida (<0) de peso.

En la **Figura-R21** se muestra la variación del peso de los animales desde el inicio hasta el final del experimento. Como se puede observar, tanto en la **Figura-R20** como en la **-R21**, en las ratas con DPC no tratadas con IGF-1 el peso disminuyó desde un valor inicial medio de $315,12 \pm 64,11$ g a un valor final medio de $295,73 \pm 48,92$ g, mientras que en el grupo de las ratas con DPC tratadas con IGF-1 el peso inicial medio aumentó ligeramente desde $283,06 \pm 60,50$ g hasta $293,05 \pm 51,12$ g al final del estudio. Aunque este incremento de peso fue mucho menor que el observado en los grupos controles (sin operar y *sham*), se apreció la peculiaridad de que el tratamiento con IGF-1 invirtió el proceso de pérdida de peso, haciéndolo, al contrario, aumentar levemente.

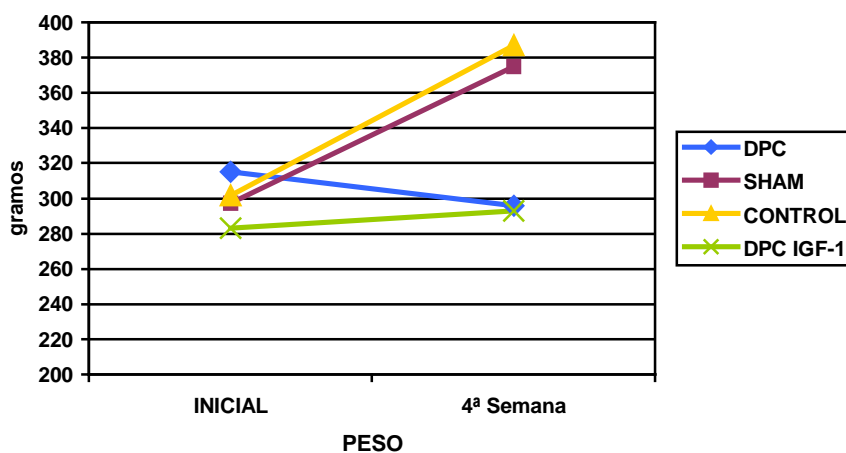


Figura-R21. Estudio ponderal total al inicio y final del tratamiento.

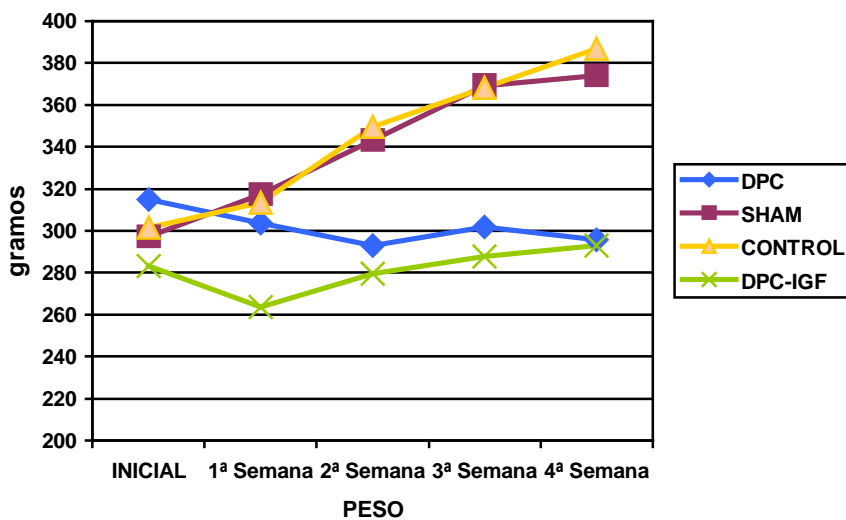


Figura-R22. Evolución ponderal semana a semana.

En la **Figura-R22** se representa de manera gráfica la evolución ponderal de todas las ratas intervenidas, semana a semana. Nótese la ganancia de peso de las ratas del grupo DPC-IGF a partir del momento

en que inician el tratamiento con IGF-1 (7^o día postoperatorio), con una tendencia paralela al de los grupos controles.

8.2. EFECTO DEL IGF-1 SOBRE LA CONCENTRACIÓN DE AMONIO EN SANGRE.

Al igual que para la validación del modelo de anastomosis portocava, los valores de AM sanguíneo presentados en este apartado están referidos a los medidos en el plasma.

Los valores medios de AM plasmático de los animales con DPC tratados y sin tratar con IGF-1 se muestran en la **Figura-R23**. Los valores de AM para las ratas con DPC tratadas con IGF-1 y sin tratar no presentaron diferencias estadísticamente significativas entre sí. Las diferencias fueron estadísticamente significativas de ambos grupos operados frente a ambos grupos control.

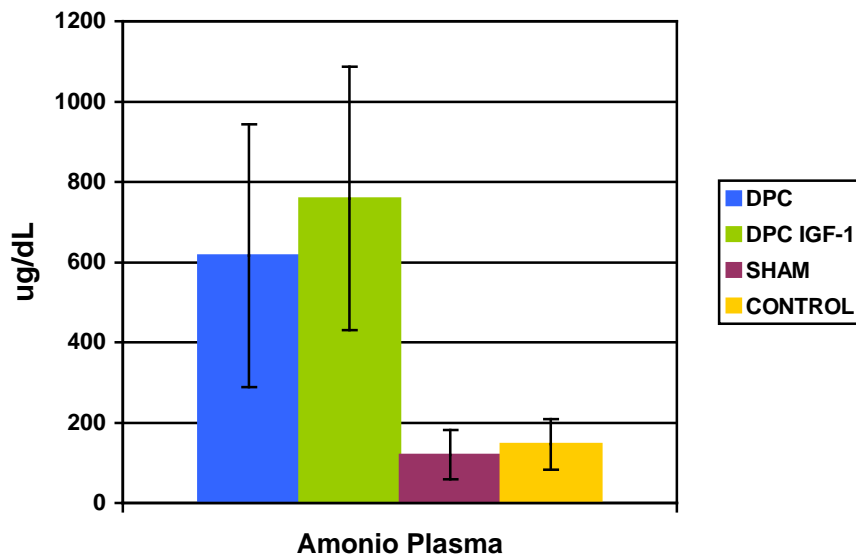


Figura-R23. Niveles de AM en plasma de ratas control, *sham*, DPC y DPC tratadas con IGF-1.

8.3. EFECTO DEL IGF-1 SOBRE LA CANTIDAD DE AMONIO PRESENTE EN DIFERENTES TEJIDOS.

Los valores de AM en los diferentes tejidos de ratas tratadas con IGF-1rh y sin tratar se muestran en la **Tabla-R7**. No hay diferencias estadísticamente significativas en el valor del AM en los diferentes tejidos en ratas tratadas y sin tratar. Los valores medios en córtex, hígado, riñón, músculo, duodeno e íleon son menores en las ratas tratadas que en las ratas sin tratar.

En la **Figura-R24** se representan de manera gráfica los valores de AM medidos en los diferentes tejidos de las ratas sometidas a DPC, divididas en los dos grupos que habían recibido o no tratamiento con IGF-1rh.

	DPC	DPC-IGF1
Cerebro:	1,67±1,04	1,65±0,43
Hígado	2,89±1,75	2,27±0,69
Músculo	2,03±1,40	2,01±1,16
Riñón:	4,98±0,69	5,23±1,81
Duodeno:	4,24±5,62	2,32±1,06
Íleon:	2,44±0,68	2,30±1,29

Tabla-R7. Contenido de AM en diferentes tejidos de ratas sometidas a DPC, con y sin tratamiento con IGF-1.

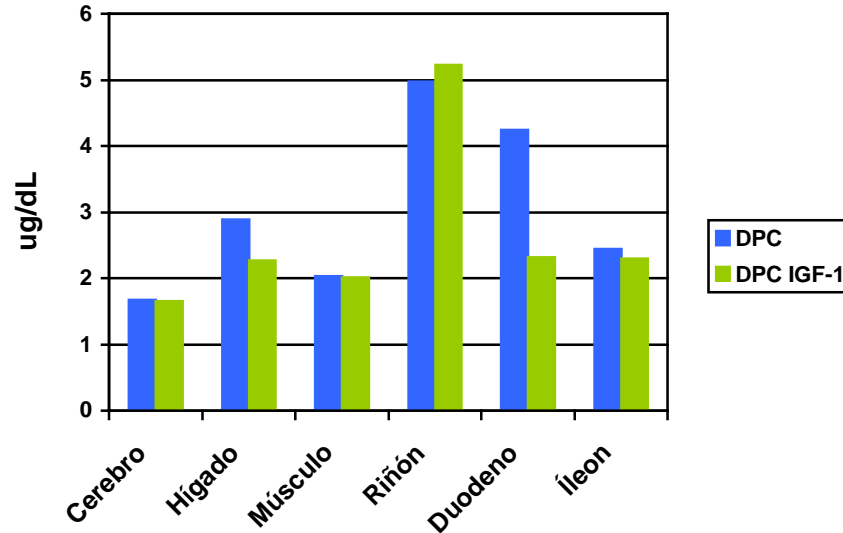


Figura R-24. AM en diferentes tejidos de ratas sometidas a DPC, tratadas y no tratadas con IGF-1.

8. 4. EFECTO DEL IGF-1 EN EL PERFIL DE AMINOÁCIDOS DE LA SANGRE.

En la **Tabla-R25** se muestran de forma gráfica los valores de los principales aminoácidos plasmáticos de las ratas sometidas a DPC, tratadas con IGF-1rh y no tratadas. Las diferencias encontradas en los valores de los diferentes aminoácidos resultaron no poseer significación estadística en todos los casos.

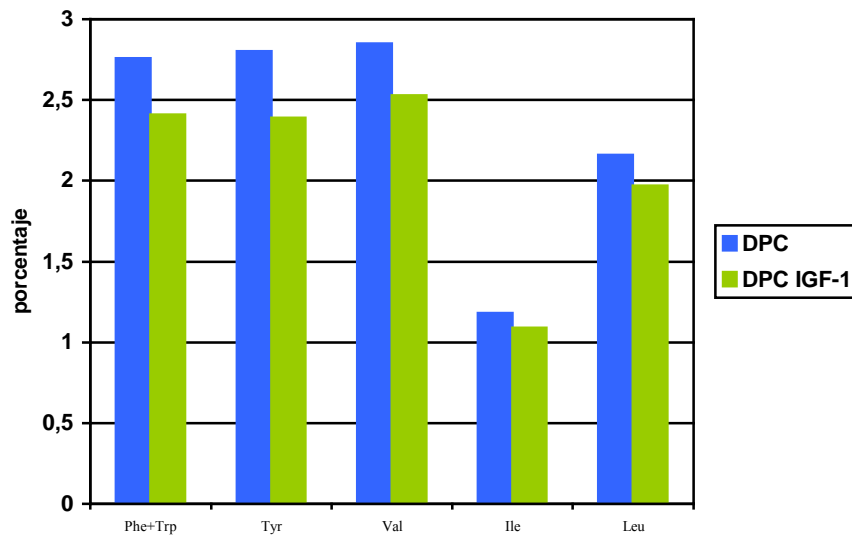


Figura-R25. Niveles sanguíneos de aminoácidos en animales DPC tratados con IGF-1 frente animales sin tratar

En la **Figura-R26** se representan las razones de Fisher (cociente AARs/AAAs) \pm DE de las ratas con DPC, tratadas con IGF-1rh y no tratadas. La diferencia entre ambos grupos no alcanzó significación estadística.

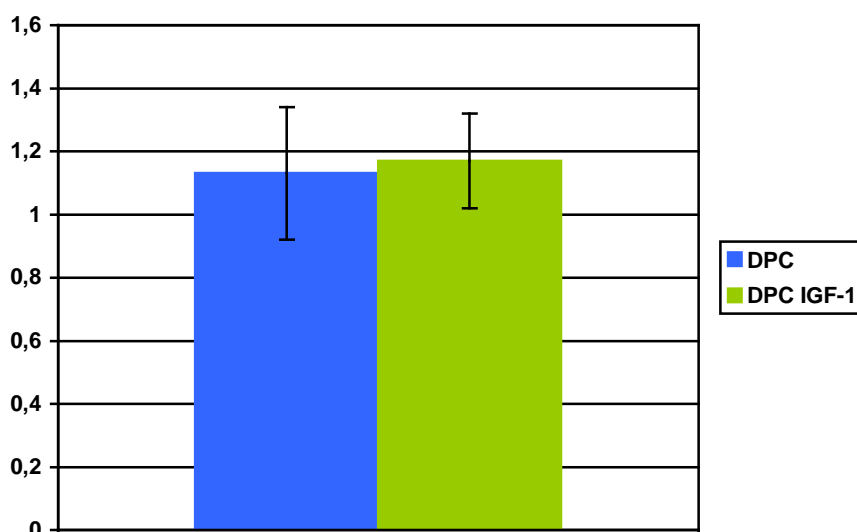


Figura-R26. Razones de Fisher de las ratas sometidas a DPC, con y sin tratamiento con IGF-1.

8.5. EFECTO DEL TRATAMIENTO CON IGF-1 SOBRE LOS NIVELES DE ÓXIDO NÍTRICO EN SANGRE.

En la **Figura-R27** se muestran los resultados obtenidos para los niveles de óxido nítrico en sangre \pm DE de ratas con DPC tratadas con IGF-1 comparados con los niveles en ratas con DPC sin tratamiento. Los niveles de óxido nítrico para las ratas con DPC tratadas fueron de $85,66 \pm 26,24 \mu\text{mol/l}$ frente a $116,32 \pm 60,07 \mu\text{mol/l}$ en ratas con DPC no tratadas.

A partir de estos resultados podemos observar que los valores de óxido nítrico presentan una tendencia al decrecimiento en las ratas tratadas, respecto de las ratas sin tratar, si bien estos valores no son estadísticamente significativos.

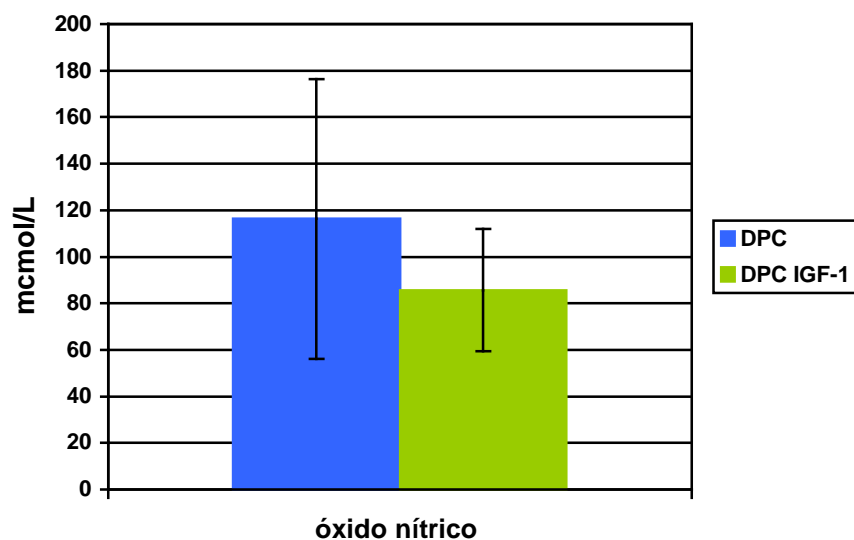


Figura-R27. Niveles de óxido nítrico en animales con DPC, tratados con IGF-1 y sin tratar.



V. DISCUSIÓN

1. RESULTADOS DE LA ANASTOMOSIS PORTO-CAVA SIGUIENDO LA MODIFICACIÓN TÉCNICA PROPUESTA POR NUMATA.

1.1. RESULTADOS DE LA TÉCNICA MICROQUIRÚRGICA.

El presente estudio experimental se realizó sobre 4 grupos de 8 ratas Wistar macho cada uno. La elección de animales del mismo sexo, concretamente machos, se hizo atendiendo a la literatura previa sobre este modelo experimental de HC. Conjeevaram⁽¹³²⁾ y Mullen⁽¹¹⁸⁾ postularon que ambos sexos no se comportan de igual manera ante la intervención. En concreto, tanto los patrones de pérdida de peso postoperatorio como el de pérdida de la actividad motora espontánea resultan distintos para las ratas operadas de ambos géneros.

El desarrollo del shunt portocava en las ratas ha seguido un proceso gradual que se inició en 1946, cuando Whitaker ideó un método en dos tiempos con elevada mortalidad⁽¹⁴³⁾, describiéndose la técnica que en la actualidad consideramos “estándar” a principio de los años 60, por Lee y Fisher⁽¹⁴⁶⁾ en Estados Unidos y que ha jugado un importante papel en la investigación hepática. Desde entonces, el modelo de derivación portosistémica en las ratas ha sido desarrollado ampliamente por numerosos investigadores, evolucionando principalmente en dos líneas, en función de que la unión entre los vasos se llevase a cabo con sutura o mediada por una prótesis (ver **Apartado 3.1.3 de “Introducción”**). Múltiples modificaciones de la técnica se han propuesto con el fin de simplificarla, mejorar la permeabilidad del shunt, disminuir la mortalidad postoperatoria o facilitar la reproducibilidad de los resultados. La mayor parte de ellas requiere entre 10 y 15 minutos

de oclusión venosa, con una mortalidad que ronda el 15-20%⁽¹⁶²⁾. En nuestro estudio realizamos una anastomosis entre la porta y la cava a 2 de los 4 grupos de ratas estudiadas, implicando a un total de 16 animales. Entre estas ratas intervenidas la mortalidad fue del 5,89%, lo que implicó la necesidad de intervenir 18 para que sobreviviesen las necesarias para el desarrollo del experimento. Al correlacionar la supervivencia de los animales con el tiempo de clampaje de los vasos, se apreció que todos los animales que fallecieron sufrieron una oclusión vascular mayor de 20 minutos, mientras que en el grupo que sobrevivió, tan sólo un animal tuvo los vasos ocluidos 20 minutos, siendo en el resto de las ratas el tiempo de oclusión igual o inferior a 15 minutos (media 13,25, rango 11-15). Puesto que el tiempo de oclusión vascular es uno de los factores determinantes en la mortalidad postoperatoria, pensamos que nuestras cifras son mejores respecto a las de otros autores debido a unos tiempos cortos sustentados en una estandarización de la técnica realizada siempre por la misma persona.

La oclusión vascular que implica la técnica conlleva un alto riesgo para desarrollar eventos trombóticos, ya que no empleamos anticoagulación local ni sistémica, con suero heparinizado o similar. Así pues, si el tiempo de la oclusión vascular supera un cierto dintel, que para nosotros se situó en los 20 minutos, las ratas tienen mucho mayor riesgo de no superar la intervención, muy probablemente por producirse trombosis en el estoma o en su vecindad. De hecho, en aquellos casos en que se prolongó la oclusión, la rata no llegó ni a despertar de la anestesia, probablemente por extensión de la trombosis al eje vascular de la porta y/o la cava. Una vez el cirujano que se dedica a la realización de las derivaciones porto-cava microquirúrgicas ve superada su curva de aprendizaje, suele emplear entre 10 y 15 minutos en la confección de la misma, por lo que los eventos trombóticos pueden

dejar de ser el principal factor limitante de la viabilidad de los animales tras la intervención.

Finalizada la anastomosis y liberada la oclusión vascular, se facilitaba la coagulación del estoma con una maniobra de compresión suave con una gasa durante 2 ó 3 minutos, que a la vez absorbía la sangre extravasada. La pequeña hemorragia periestomal cedía sin excesiva dificultad si la técnica quirúrgica había sido esmerada y no ocurrieron eventos contradictorios (tales como pequeños desgarros en las paredes de las venas anastomosadas). Por ello, la hemorragia postoperatoria, una vez terminado el estoma, puede considerarse el verdadero “caballo de batalla” de esta intervención. La velocidad con la que han de realizarse todas y cada una de las maniobras tras la oclusión vascular no puede estar reñida con la precisión de los movimientos, imprescindible para un resultado óptimo de la técnica. Las hemorragias suelen originarse principalmente en 2 problemas. Por un lado se pueden producir pequeños desgarros en las paredes de los vasos, a veces tan pequeños que pasen inadvertidos incluso durante la propia intervención y, por lo general, relacionados con la manipulación de la aguja de la sutura. Por otra parte se originarían en un espacio excesivo entre las “puntadas” de la sutura continua. Por tanto, con relación a esta técnica experimental podríamos concluir que, al igual que en otras técnicas microquirúrgicas, de anastomosis vasculares o de otro tipo, la precisión de los movimientos debe ser absoluta, para garantizar unos resultados óptimos.

1.2. EFECTO DE LA DERIVACIÓN PORTO-CAVA SOBRE LOS PARÁMETROS PROPIOS DE LA HEPATOPATÍA.

El primer objetivo de este estudio, tal y como se expuso en el apartado **“Hipótesis y Objetivos”**, ha sido la validación del modelo de DPC utilizado. La información sobre los efectos de la DPC en las ratas es abundante por su amplia difusión como modelo experimental de HC. Sin embargo, pese a ser publicada en 1983, la variación técnica propuesta por Numata⁽¹⁴⁹⁾ no ha sido utilizada o, al menos, no han sido publicados sus resultados, según hemos conocido. Tan sólo hemos encontrado una publicación que propone otra modificación técnica al Shunt clásico de Lee y Fisher, muy similar a la de Numata, pero sin sección de la porta⁽¹⁶²⁾, que no profundiza tampoco en los resultados fisiopatológicos de la intervención y tan sólo comentando el número de intervenciones completadas con éxito. Creemos que este aspecto es de importancia capital, pues existiría la posibilidad, al menos teórica, de que se restableciese el flujo a través de la porta ligada sin seccionar. Tras haber aprendido la técnica de anastomosis porto-cava termino-lateral clásica en el Centro de Investigaciones Biomédicas de Valencia, con el grupo de trabajo del Dr. Vicente Felipo y posteriormente haber ensayado la modificación propuesta por Numata, encontramos que este detalle técnico facilitaba enormemente la confección del shunt, redundando esencialmente en un menor tiempo para su confección, por lo que nos propusimos su validación en el presente estudio. Además, desde un estricto punto de vista anatómico y fisiológico, la anastomosis, a pesar de ser de tipo látero-lateral, tras la ligadura y sección de la porta, pasa a ser en todos los sentidos término-terminal, tal y como también describió Sharma⁽¹⁶²⁾, con la diferencia de que él sólo ligaba la porta, sin seccionarla, como antes se apuntó.

La evaluación de cualquier modelo experimental pasa por la verificación de la presencia de los efectos de cierta patología humana en el animal de laboratorio. En el caso de los modelos animales de HC con HAM, se trataría de documentar en éstos los cambios

comportamentales relevantes que tienen lugar en los pacientes. Obviamente, puesto que ni los tests psicométricos ni la exploración clínica empleados en el diagnóstico de la EH son realizables en las ratas, nos hemos de servir de otros métodos de validación. Múltiples autores han detallado ciertos tests valorando reflejos y respuestas a estímulos⁽¹⁶³⁾, de difícil interpretación, o mediciones computerizadas de la actividad^(127,128) o de los ritmos circadianos⁽¹³³⁾, lo que ha supuesto, sin duda, un avance en este sentido. Según Mullen⁽¹¹⁸⁾, las ratas sometidas a DPC tienen una respuesta de la actividad motora espontánea incierta, de manera que aun realizando el shunt de forma adecuada, se precisa intervenir un gran número de animales para demostrar cambios comportamentales significativos entre los animales intervenidos y los controles, pese al uso de los más sofisticados métodos de medida. Han sido también postulados sistemas de medida de los potenciales evocados⁽¹⁶⁴⁾ o el análisis de los patrones encefalográficos⁽¹⁶⁵⁾, con resultados escasamente validados en los modelos animales de HC. Otro aspecto de capital importancia es la correcta técnica de realización del shunt. Un estoma suturado amplio, realizado con escasa oclusión vascular y por un cirujano experto son la base de un cortocircuito porto-sistémico duradero en el tiempo y capaz de reproducir adecuadamente los efectos de la EH, frente a técnicas en las que el shunt está mediado por un “botón” o confeccionado con cianoacrilato, asociadas con reversibilidad de sus efectos⁽¹¹⁸⁾.

Tal y como se ha expuesto ampliamente en el **Apartado 1.1 de la “Introducción”**, la hepatopatía avanzada se caracteriza esencialmente por unas alteraciones bioquímicas responsables finales de los trastornos comportamentales de la EH, con un papel central indiscutible del AM hoy en día. La complejidad de la realización de estudios para valorar la encefalopatía en la rata desde el punto de vista de sus cambios de comportamiento y la falta de estandarización en los

mismos nos ha llevado a limitar la validación del modelo a la pérdida ponderal y al estudio de las alteraciones bioquímicas que tienen lugar en el síndrome de encefalopatía hepática.

De esta manera, hemos analizado en primer lugar la **evolución del peso** a lo largo del estudio, reflejo del efecto sobre el comportamiento de las ratas de la técnica quirúrgica de shunt, focalizada en este caso en la conducta alimentaria. Como comentamos en el **apartado 3 de “Resultados”**, las ratas sometidas a DPC se caracterizaban, además, por presentar un peor aspecto físico general, llamando la atención en especial el aspecto sucio de su pelaje, en comparación con los animales de los grupos control y *sham*, en concordancia con lo publicado en relación con las consecuencias extrahepáticas de la derivación porto-sistémica⁽¹⁶⁶⁻¹⁶⁸⁾.

Como se observa en las **Figuras-R2, -R3 y -R4**, los animales de los grupos controles, sin operar o *sham*, presentaron un incremento de peso uniforme a lo largo de las 4 semanas del estudio. En el caso de los animales con DPC, sin embargo, el efecto global de la DPC fue la pérdida neta de peso para este grupo. En la curva de evolución comparativa de los pesos de los animales semana a semana (**Figura-R3**) se aprecia una momentánea inversión de esta tendencia entre los sometidos a DPC, pues la pérdida global apreciada en las 2 semanas previas pasó a una ligera ganancia en el grupo durante la tercera semana, si bien en ningún caso ésta supuso la recuperación de los valores ponderales de partida. La pérdida ponderal de las ratas tras la DPC está ampliamente documentada en la literatura, si bien existen datos contradictorios en cuanto a la evolución de dicho peso conforme transcurre el postoperatorio. La mayoría de autores admite una pérdida ponderal máxima los primeros 15 días tras la intervención, pero a partir de este momento hay algunos que reconocen una recuperación de la

ganancia de peso, de menor cuantía que la que experimentan los animales sanos⁽¹⁶⁸⁾, frente a otros que describen una pérdida ponderal sostenida, aunque de menor intensidad que la inicial⁽¹⁶⁶⁾. Así pues, respecto a la evolución global del peso en los animales sometidos a DPC, pensamos que se cumplen adecuadamente los criterios exigibles a un modelo de HAM crónica.

Avanzando en la línea argumental de la fisiopatología de la EH, hemos decidido tomar como su principal control bioquímico positivo los **niveles de AM en la sangre** de los animales estudiados. La concentración de AM se ha determinado en el plasma tal y como se describió en el **apartado 2.3.1.1 de “Material y Métodos”**.

Como puede apreciarse en el **apartado 4.1 de “Resultados”**, las diferencias entre los valores obtenidos para las ratas controles (146,37±62,82 µg/dl en controles no operados y 120,31±60,76 µg/dl en las *sham*) y las ratas con DPC (616,37±327,38 µg/dl) son estadísticamente significativos, con un valor de $p \leq 0.01$. Sin embargo, no existe diferencia estadística entre los valores obtenidos para las ratas *sham* y las controles no operadas entre sí, lo que nos está indicando, con escaso margen para la duda, que los altos niveles de AM plasmático se deben a la técnica quirúrgica de DPC realizada en este grupo, siendo éstas, por tanto, ratas con EH.

Recientemente ha sido publicado un artículo de revisión en relación con los modelos animales para el estudio de la EH⁽¹⁶⁹⁾ en el que se estipula que la DPC en ratas sería un modelo adecuado para la EH de tipo B, es decir, aquella en la que existe un *by-pass* portosistémico sin fallo hepático. Sin embargo, como apuntó Gandhi⁽¹⁷⁰⁾, *“la DPC es un modelo de atrofia hepática desde hace más de 100 años”*, refiriéndose a los trabajos de Hahn en el siglo XIX⁽¹⁷¹⁾ y

caracterizado de manera muy detallada a partir de los estudios de Bismuth⁽¹⁷²⁾ en los años 60 del pasado siglo. En sus primeros trabajos ya se describía que *“el aspecto del hígado en la laparotomía realizada pocos días después a las ratas sometidas antes a DPC es pálido y, tras sacrificar al animal y pesarlo, se constata una importante reducción de su tamaño”*. Esta pérdida de tamaño del hígado no es paralela a la reducción del peso de la rata, pues la relación *peso del hígado/peso del animal* también se reduce⁽¹⁷³⁾. En el ámbito microscópico hepático se produce, esencialmente, una atrofia secundaria que no se acompaña de cambios en la composición en cuanto a los constituyentes celulares básicos se refiere (agua, lípidos, glúcidos o proteínas) ni en la arquitectura hepática. Parece estar relacionada con una atrofia hepatocitaria, que se inicia muy precozmente tras la intervención quirúrgica y que puede prolongarse durante varios meses postoperatorios⁽¹⁷⁴⁾. En los estudios de funcionalidad hepatocitaria se han demostrado ciertos cambios en estas ratas, como un descenso en la producción de bilis en torno al 40%, una pérdida de la conjugación de la bilirrubina, una alteración del metabolismo de ciertos colorantes de eliminación biliar, como el verde de indocianina (utilizado frecuentemente como método diagnóstico para la valoración de la reserva funcional hepática previa a la hepatectomía de los pacientes cirróticos⁽¹⁷⁵⁾), alteraciones de la agregación plaquetaria y del metabolismo hepático de drogas⁽¹⁶⁸⁾.

En la génesis de este fenómeno pueden estar involucrados factores de tipo hemodinámico y hormonal. La derivación sanguínea portal conlleva una pérdida de flujo a través del hígado, a pesar del aumento importante, aunque insuficiente, del mismo a través de la arteria hepática. Los principales argumentos a favor de esta hipótesis derivan de las observaciones experimentales según las que la atrofia se corrige casi por completo tras la realización de una transposición porto-

cava o una arteriolización de la vena porta⁽¹⁷⁶⁾. Por otro lado, puede argumentarse la responsabilidad en el fenómeno de la pérdida de paso a través del hígado de ciertas sustancias con efecto hepatotrofo, principalmente de origen pancreático y con efectos sobre la regeneración hepática. Entre ellas, las más estudiadas han sido la insulina y el glucagón⁽¹⁷⁷⁾. Coincidimos con Bircher en que *“los hechos más destacados que tienen lugar en este modelo son el shunt porto-sistémico y la pérdida de parénquima hepático funcionando”*⁽¹⁶⁶⁾, lo que implica que el modelo puede considerarse apropiado para representar las alteraciones presentes en la EH de tipo C (aquella que se asocia a trastorno de la función del parénquima hepático, frecuentemente cirrosis).

La encefalopatía que acompaña a las enfermedades hepáticas resulta en lesiones neuroanatómicas de características similares a las encontradas en los pacientes con una grave HAM congénita, secundaria a defectos hereditarios de los enzimas del ciclo de la urea. En los hepatópatas, dichas lesiones suelen ser reversibles tras la corrección del aumento del AM. Las lesiones características que aparecen en los cerebros de los pacientes hiperamoniémicos afectan a los astrocitos y fueron descritas por vez primera por Von Hosslin y Alzheimer en 1912⁽¹⁷⁸⁾. Estas células aparecen con un núcleo pálido muy agrandado, a veces deformado, con un nucléolo prominente y con un patrón marginal de su cromatina, rodeado por una capa citoplasmática fina, que recibieron el nombre de *Células Alzheimer tipo II*⁽¹⁷⁹⁾. Además es frecuente encontrar en estos pacientes una degeneración esponjiforme de las capas más profundas del córtex cerebral y de la glía basal⁽¹⁸⁰⁾. No se conoce ningún modelo experimental que reproduzca por completo estos cambios neuroanatómicos⁽¹⁸¹⁾, aunque hay autores que si han constatado la presencia de las células características de tipo Alzheimer II tras la

realización de DPC a ratas, considerada la alteración neuroanatómica más característica de la EH⁽¹⁸²⁻¹⁸⁵⁾. Pilbeam en 1983 publicó un estudio en cerebros de ratas sometidas a DPC y sacrificadas en diferentes períodos de tiempo tras la intervención que pone en duda la presencia de los Astrocitos tipo II en los cerebros de ratas sometidas a DPC. Su trabajo estudió los cerebros de tan solo 8 ratas (2 tras 2 semanas de postoperatorio, 2 a las 4 semanas, 2 a las 16 y otras 2 a las 30), además de que en ninguno de los grupos los valores de AM plasmático estuvieron excesivamente elevados frente al grupo control (en ninguno de ellos el valor medio del AM plasmático llegó siquiera a doblar al del grupo control). En nuestro estudio empleamos 24 ratas, 8 sometidas a DPC y 16 en dos grupos de control de 8 cada uno (controles y *sham*), siendo los valores del AM plasmático de las derivadas frente a las controles entre 4 y 5 veces superiores. Dado que ciertos detalles de la técnica quirúrgica, como por ejemplo la amplitud del estoma entre la porta y la cava, suelen tener importancia en los resultados en cuanto a la capacidad de reproducir la HAM de la hepatopatía^(134;135), pensamos que quizás hayan existido problemas en este sentido a los que achacar los bajos valores de AM plasmático obtenidos en las ratas del estudio mencionado, responsables en último caso de las alteraciones histológicas cerebrales.

Sobre los valores de AM plasmático se generó una curva ROC, herramienta fundamental en el proceso de evaluación de las pruebas diagnósticas, que permite conocer de forma global la calidad de una prueba en el espectro completo de puntos de corte, variables en función del criterio definitorio de la separación entre la población sana y la enferma⁽¹⁶⁰⁾. Las curvas ROC se desarrollaron en los años cincuenta como herramientas para el estudio de la detección e interpretación de señales de radar. El objetivo de los operadores de estas instalaciones era diferenciar las verdaderas señales del ruido de fondo⁽¹⁸⁶⁾. Así, al

modificar la amplitud de la señal definida para considerar un pico de señal como misil, variaban la sensibilidad y la especificidad del sistema de recepción. De la misma forma que en las señales de radar se producía un solapamiento entre las verdaderas señales y el ruido de fondo, al realizar pruebas diagnósticas se solapan los resultados de los pacientes con una determinada condición y las de aquéllos que no la tienen. Por ello se extendió la aplicación de las curvas ROC a múltiples sistemas diagnósticos, entre ellos muchas técnicas radiológicas y pruebas de laboratorio.

La curva ROC es un gráfico en el que se observan todos los pares sensibilidad-especificidad resultantes de la variación continua de los puntos de corte en todo el rango de resultados observados. En el eje "y" de coordenadas se sitúa la *sensibilidad* (razón de verdaderos positivos, calculada en el grupo de pacientes enfermos), mientras que en el eje "x" se sitúa la fracción de falsos positivos o *1-especificidad*. Cada punto de la curva representa un par Sensibilidad/1-Especificidad correspondiente a un nivel de decisión determinado. Una prueba con una discriminación perfecta, sin solapamiento de resultados en las dos poblaciones, tiene una curva ROC que pasa por la esquina superior izquierda, pues allí la sensibilidad y especificidad toman sus valores máximos (ambos tendrían un valor igual a 1). Por el contrario, una prueba sin discriminación, con igual distribución de los resultados en ambos subgrupos, daría lugar a una línea diagonal de 45°, desde la esquina inferior izquierda hasta la superior derecha. Cualitativamente, cuanto más se aproxima la curva a la esquina superior izquierda, más alta es la exactitud global de la prueba.

Se puede afirmar que las curvas ROC aportan un índice de la exactitud diagnóstica y proporcionan un criterio unificador en el proceso de evaluación de una prueba, sobre la base de sus múltiples

aplicaciones, que van desde la evaluación visual de la exactitud, a la posibilidad de comparación cuantitativa o visual entre pruebas, la selección de niveles de decisión o “puntos de corte” o el análisis de la regresión logística o discriminante. Sorprendentemente, estas curvas ROC han sido infrautilizadas por los investigadores a pesar de constituir herramientas fundamentales en la evaluación de pruebas diagnósticas, lo que quizá se deba a sus aparentes desventajas. Entre ellas podemos encontrar que los puntos de corte S/1-E, utilizados para generar el gráfico, no aparecen en él, a diferencia con otros sistemas de representación gráfica; tampoco aparece el número de sujetos de la muestra estudiada; al disminuir el tamaño de la muestra la curva tiende a hacerse escalonada y desigual y, por último, su cálculo es difícil sin programas informáticos específicos.

Así pues, en el análisis de la potencia diagnóstica de los niveles de AM sanguíneo de todos los animales del estudio se ha encontrado que en 255 $\mu\text{g/dl}$ se encontraban los máximos valores tanto de sensibilidad como de especificidad, en ambos casos de 1, con lo cual el poder discriminatorio de este valor es completo en nuestra serie. Ello se traduce en que todos los animales que presentaron cifras superiores de AM fueron animales intervenidos para realizarles DPC, mientras que todos los que las tenían por debajo pertenecían a los grupos controles. Al comparar esta cifra con los valores de AM sanguíneo medios de las ratas de los grupos control ($146,87 \pm 62,82 \mu\text{g/dl}$) y *sham* ($120,31 \pm 60,76 \mu\text{g/dl}$), apreciamos que el valor del “punto de corte” viene a ser de aproximadamente el doble de los valores de AM sanguíneo de estos grupos.

Las primeras aplicaciones de la curvas ROC en medicina se produjeron en el campo del radiodiagnóstico. Robertson y Zweig las utilizaron por vez primera en la evaluación de pruebas de laboratorio en

1981⁽¹⁸⁷⁾, aplicándolas al estudio de las concentraciones séricas de la mioglobina y la creatinquinasa MB (CK-MB) en pacientes con sospecha de infarto agudo de miocardio, comunicando sus resultados en forma de curvas ROC. Realizaron interpretaciones sólo cualitativas, pero más tarde, Carson y colaboradores⁽¹⁸⁸⁾ las emplearon por vez primera para el análisis cuantitativo en la comparación de cuatro técnicas analíticas para la determinación de la fosfatasa ácida prostática en casos de sospecha de cáncer de próstata. El principal avance de nuestros días en este sentido ha sido la aplicación de las técnicas estadísticas de análisis multivariante a las curvas ROC, especialmente aplicado a diferentes parámetros implicados en la enfermedad coronaria, tales como los niveles de colesterol y sus fracciones LDL y HDL, apolipoproteína A-I, triglicéridos o apolipoproteína B.

En resumen, las curvas ROC, una generalización de los conceptos básicos de sensibilidad y especificidad, constituyen un moderno enfoque epidemiológico para la evaluación de pruebas diagnósticas, ya que permiten conocer su capacidad para discriminar entre dos estados alternativos, generalmente de salud frente a enfermedad.

El siguiente aspecto que hemos analizado ha sido la afectación de los diferentes órganos implicados en la homeostasis del AM, midiendo en ellos sus niveles tal y como se describe en el **Apartado 2.2 de “Material y Método”**. Así pues, se han medido en cerebro (córtex), hígado, músculo, riñón (corteza) e intestino (duodeno e íleon por separado).

En el **cerebro** hemos estudiado la cantidad de AM presente a nivel del córtex, con el fin de analizar su relación con los niveles del AM en la sangre e intentar corroborar su responsabilidad en el síndrome de

EH. Los valores de AM en el córtex fueron más altos en las ratas DPC ($1,67 \pm 1,04 \mu\text{moles/g}$) que en ambos grupos controles ($0,92 \pm 2,22 \mu\text{moles/g}$ en el grupo control y $1,02 \pm 0,45 \mu\text{moles/g}$ en el sham). La diferencia no alcanzó la magnitud suficiente para lograr potencia estadística, aunque estuvo muy cerca en el enfrentamiento del grupo problema frente al control ($p = 0,06$ en controles vs. DPC y $p = 0,12$ en sham frente a DPC). Estos datos pueden considerarse acordes con la hipótesis de que la HAM cerebral sea el elemento disparador en el inicio y desarrollo del síndrome de EH^(15;34). Sin embargo, pensamos que los valores de AM cerebral que hemos obtenido son sin duda inferiores a los esperados, basándonos en los resultados previamente publicados. Butterworth y Gigère⁽¹⁸⁹⁾ encontraron que el contenido de AM en la corteza cerebral de ratas sometidas a DPC y a intervención sham era diferente con significación estadística importante ($p < 0,01$), con valores de AM de alrededor del doble en las ratas derivadas. La diferencia en las cifras de AM tisular obtenidas en el presente estudio, que no han llegado a alcanzar la significación estadística, la hemos atribuido a problemas metodológicos en su determinación. El amoníaco es un gas muy volátil que tiende a difundir rápidamente desde una disolución al aire. La inevitable manipulación de las muestras hasta la determinación final implica que ciertas cantidades del mismo se puedan perder durante el propio proceso, por más que la técnica sea rápida y esmerada, lo que podría llevar a que los resultados se vean artefactados. Para evitar este fenómeno se han ideado procedimientos para la obtención y procesado de muestras de forma más precisa y fiable, como por ejemplo la microdiálisis cerebral, muy extendida para el análisis de sustancias a dicho nivel. Su realización necesita de una pequeña intervención al animal de experimentación, para la colocación de pequeñas cánulas específicas en el área cerebral concreta en el que nos interese realizar la determinación del contenido de AM, mediante técnica esteroatáxica. Una vez se reanima al animal de dicha intervención se procede, en

esencia, a la instilación de un medio de disolución, generalmente líquido cefalorraquídeo artificial, a través de dichas cánulas y a la recogida del efluente obtenido por “lavado” del área a estudiar a través de otra de ellas, procesando inmediatamente las muestras⁽¹⁹⁰⁾. Para aumentar la sensibilidad y realizar determinaciones a gran cantidad de muestras se establecería un procedimiento de determinación simultánea de muestras utilizando placas de 96 pocillos y midiendo fluorescencia mediante un fluorómetro. Este método, sin duda más exacto, implicaría un incremento de la complejidad del diseño de los estudios y una infraestructura de la que aun no disponemos. Desde luego, hubiese sido interesante obtener unos valores del AM cerebral significativamente mayores en las ratas DPC frente a las de los grupos controles, pues sería un punto a favor de la demostración de la validez del modelo en nuestras manos y con la variación técnica empleada, pero creemos que los demás datos obtenidos pueden suplir la carencia en este aspecto.

A pesar de que hoy por hoy no existen dudas de la responsabilidad del AM en la génesis del síndrome de EH, aun no se conocen con certeza los mecanismos moleculares a través de los cuales éste y el fallo hepático conducen a las alteraciones neurológicas y a la disminución de las funciones intelectuales. Aunque el mecanismo aun no está completamente establecido, cada vez existen más datos que apuntan hacia la posible intervención del glutamato y del óxido nítrico^(15;34). La eliminación del AM en el sistema nervioso central tiene lugar a través de la formación de GLN mediante la acción de la enzima GS, presente en el cerebro de forma exclusiva en los astrocitos. El primer paso de este proceso es la aminación reductiva del α -cetoglutarato para producir GLU, la mayor parte del cual se combina con una 2ª molécula de NH_4 para dar GLN. Existen también evidencias sobre la inhibición de la degradación de la GLN por acción de la GMS como respuesta a los altos niveles de AM, que también pueden

contribuir a encontrar aumentada esta en los cerebros de las ratas sometidas a DPC. Además, los niveles elevados de GLN se han encontrado tanto en el LCR y en el sistema nervioso central de los pacientes hepatópatas como en diferentes áreas cerebrales de ratas sometidas a DPC⁽¹⁷⁹⁾. Los receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) están implicados en ciertos tipos de aprendizaje, por lo que se piensa que podrían jugar un papel importante en los problemas neurológicos e intelectuales observados en la EH. La activación de los receptores NMDA por glutamato incrementa los niveles de Ca^{2+} en las neuronas postsinápticas. El Ca^{2+} se une a la calmodulina y activa a la óxido-nítrico sintetasa cerebral (ONS), que activa a la guanilato ciclasa, incrementándose la producción de guanidín-mono-fosfato-cíclico (cGMP), y parte de este cGMP es liberado al espacio extracelular sináptico. La activación de esta vía glutamato-NO-cGMP parece estar implicada en el desarrollo de ciertos tipos de aprendizaje, ya que, estudios recientes indican que la guanilato ciclasa y el cGMP son elementos importantes en los procesos de aprendizaje y memoria⁽¹⁹¹⁻¹⁹³⁾.

El **tubo digestivo** se considera la principal fuente del AM del organismo. La teoría “clásica” establece que el AM se origina por la acción de las bacterias intestinales sobre las proteínas de la dieta, hidrolizándolas y liberando amoníaco a la luz digestiva. Éste sería absorbido por la mucosa y, en función del grado de hepatopatía y de la magnitud del shunt porto-sistémico, alcanzaría el cerebro sin ser “detoxificado” en el hígado en cantidades variables, dando lugar al síndrome de EH⁽¹⁹⁾. Recientemente, sin embargo, nuevos descubrimientos han llevado a pensar que el tubo digestivo puede ser responsable en sí mismo de la producción de gran cantidad de AM, especialmente en los enterocitos, con diferente implicación en función del tramo digestivo a tener en cuenta. Se ha comprobado que la HAM

en animales sometidos a DPC era similar en aquéllos libres de gérmenes y en los que no lo estaban⁽¹⁹⁴⁾, proporcionando un soporte racional al hecho de que la misma y la EH pueden desarrollarse sin la participación de las bacterias. Por otro lado, en pacientes cirróticos con TIPS se comprobó que el mayor incremento del AM se producía en la sangre portal proveniente de las vísceras que desaminaban glutamina⁽¹⁹⁵⁾ y, finalmente, el escaso tiempo requerido para el aumento del AM plasmático (alrededor de 1 hora) tras *la prueba oral de la glutamina*⁽¹⁹⁶⁾.

Las células de la mucosa intestinal consumen glutamina, principal fuente energética de los enterocitos, a través de la acción de la encima GMS, muy especialmente en pacientes hepatópatas y en ratas sometidas a DPC, como ya ha sido demostrado por nuestro grupo de trabajo⁽¹⁹⁷⁾ y otros⁽¹⁹⁸⁾. La actividad de la enzima GMS en biopsias de la mucosa intestinal de la primera porción del intestino delgado se ha encontrado 4 veces superior en pacientes cirróticos frente a controles sanos^(155;199). Existen dos isoformas principales de la enzima: la de tipo renal y la de tipo hepático. La primera se encuentra en el riñón, cerebro, y enterocitos, mientras la hepática está sólo localizada en el hígado. La mayor parte de la actividad de la GMS renal (alrededor del 84%) está localizada en el intestino delgado, especialmente en el duodeno. Por el contrario la actividad en tramos distales del tubo digestivo, como íleon o colon, es menor, lo que nos hace sospechar que la participación de estos tramos en la génesis de AM tenga también menos importancia⁽¹⁵³⁾.

Con estas premisas, la utilidad de algunas de las medidas terapéuticas empleadas de forma habitual en el tratamiento de los pacientes con EH podría ser cuestionable, caso de aquéllas que pretenden el arrastre mecánico del contenido intestinal, como la

administración de laxantes. Respecto al uso de antibióticos como la neomicina, su utilidad podría deberse más que al efecto decontaminador de la flora intestinal que por lo general se le atribuye, a su capacidad demostrada de inhibición de la enzima GMS⁽¹⁹⁸⁾. Por estos motivos decidimos evaluar el contenido en AM de muestras separadas de dos tramos intestinales, por un lado de la mucosa del duodeno y por otro de la del íleon terminal.

En el presente estudio encontramos unos niveles de AM muy elevados en la **mucosa duodenal** de las ratas sometidas a DPC ($4,24 \pm 5,62$ $\mu\text{moles/g}$), tanto en comparación con los niveles de AM presente en otros tejidos, en concordancia con la idea de su implicación en los niveles elevados de AM sanguíneo en las ratas DPC, como al compararlos con los de ambos grupos utilizados como controles ($1,98 \pm 0,47$ $\mu\text{moles/g}$ en el grupo control y $1,91 \pm 0,37$ $\mu\text{moles/g}$ *sham*). Ambas comparaciones no presentaron significación estadística, probablemente debido a la magnitud de la desviación estándar de los valores de AM en el duodeno de nuestras ratas DPC, motivado por la alta cifra de AM duodenal de una de las ratas ($18,12$ $\mu\text{g/dl}$), fuera de todo rango.

En la **mucosa del íleon terminal** se encontraron unos valores de AM muy similares en los tres grupos ($2,44 \pm 0,68$ $\mu\text{moles/g}$ en las ratas DPC, $2,20 \pm 0,96$ $\mu\text{moles/g}$ en el grupo control y $2,15 \pm 0,67$ $\mu\text{moles/g}$ en las ratas *sham*). Según el nuevo enfoque que hemos establecido de la génesis de la HAM de la hepatopatía, la contribución de los tramos más distales del intestino a la producción de AM por la acción de la GMS renal sería anecdótica en comparación con la aportación del duodeno, donde tiene gran actividad^(153;155). En este sentido, los resultados obtenidos se encontrarían dentro de lo esperado, es decir, es lógico que las células de la mucosa de los tramos distales del intestino de las ratas

DPC tengan unos niveles de AM similares a las de ambos grupos control. Constituiría una evidencia más que vendría a apoyar nuestra teoría, en contra de lo establecido acerca de la causa del aumento del AM plasmático en la hepatopatía. Si el incremento de la amoniemia dependiese principalmente de la absorción aumentada en la mucosa intestinal del formado en su luz por la acción de los gérmenes, sería de esperar que los niveles en la mucosa de los tramos más distales, como el íleon o incluso el colon, fuesen los más altos de todos, pues es bien conocido que el contenido en gérmenes del efluente intestinal se incrementa conforme nos encontremos más cercanos al ano y las heces tengan mayor consistencia.

El **hígado** es el principal órgano “detoxificador” del AM sanguíneo a través de la síntesis de urea y su implicación en su metabolismo es bien conocido, por lo que parece bastante razonable su estudio en un modelo de aumento de AM sanguíneo. La contribución del riñón al equilibrio ácido-básico se debe, en parte, a su capacidad de síntesis y eliminación de AM, además de ser el órgano encargado de la eliminación de la urea, viéndose implicado en la detoxificación del AM en la hepatopatía, por el deterioro de la síntesis de urea en el hígado. Por último, hemos incluido estudios del músculo estriado, por haberse demostrado su contribución a la detoxificación del AM a través de la síntesis de GMN por la enzima GS durante los estados de HAM⁽¹⁹⁰⁾.

Los niveles de AM encontrados en el hígado de las ratas con DPC ($2,57 \pm 1,63$ $\mu\text{moles/g}$) fueron algo mayores que los de las ratas sin operar ($2,01 \pm 0,52$ $\mu\text{moles/g}$) o las *sham* ($2,11 \pm 0,29$ $\mu\text{moles/g}$), si bien esta diferencia no alcanzó significación estadística. En el estudio clásico de Lockwood y colaboradores sobre la distribución del metabolismo del AM en humanos, se encontró que el amoniaco se concentraba en el hígado de pacientes con hepatopatía moderada y severa más que en

los controles, estudiado mediante gammagrafía realizada tras la inyección intravenosa de AM con $^{13}\text{N}^{(23)}$. Los valores del AM en el hígado fueron alrededor del 50% mayores en presencia de hepatopatía frente a los controles sanos. La DPC provoca en la rata que la sangre proveniente de las vísceras abdominales, rica en amoniaco, llegue antes a la circulación sistémica que al propio hígado, por lo que éste no puede cumplir su función de eliminación a través del ciclo de la urea. Esto facilita la llegada de sangre con elevado contenido en AM a los diferentes órganos, incluido el cerebro, muy sensible al mismo. La pérdida del flujo sanguíneo al hígado a través de la porta se ha esgrimido como una de las principales causas de la atrofia de éste órgano después de la intervención de DPC. En conclusión, nos encontraríamos ante dos posibles circunstancias que explicarían la escasa diferencia de contenido de AM observado en las ratas de los distintos grupos: por un lado la llegada tardía de la sangre con AM al hígado en las ratas DPC, a través de la arteria hepática y después de un primer paso por todos los tejidos de la economía, entre ellos el músculo y el riñón, que en ausencia de capacidad de eliminación por parte del hígado adquieren especial protagonismo en la “detoxificación” de amoniaco y, por otro, la propia pérdida de capacidad detoxificadora de unos hepatocitos atroficos, con pérdida de un 30-40% del volumen del hígado normal, secundaria a la propia técnica de DPC, según se ha detallado antes. Sharma y colaboradores demostraron que la pérdida hepatocitaria secundaria a la derivación de la sangre portal en ratas sometidas a DPC se relacionaba con un descenso del empleo del AM y de la síntesis de urea en el hígado⁽²⁰⁰⁾.

A nivel del **músculo esquelético** no observamos diferencias para los niveles de AM entre los tres grupos de animales estudiados: controles ($1,72 \pm 0,65$ $\mu\text{moles/g}$), *sham* ($2,14 \pm 1,21$ $\mu\text{moles/g}$) y animales con DPC ($2,03 \pm 1,40$ $\mu\text{moles/g}$). El aclaramiento del AM circulante es

directamente proporcional a su concentración arterial, siguiendo una relación lineal. En presencia de shunt portosistémico se pierde la mayor parte de la capacidad de eliminación que ejerce el hígado a través de la síntesis de urea, según hemos argumentado antes, convirtiéndose el músculo esquelético en el principal órgano para el mantenimiento de la homeostasis del AM y responsabilizándose de eliminar alrededor del 50% del circulante⁽²³⁾. En este sentido, los valores obtenidos en el AM muscular de los tres grupos de ratas, atendiendo en especial a la inexistencia de diferencia entre el de las ratas DPC frente al de los grupos control, se justificarían por un incremento de la utilización del AM muscular para hacer frente a los altos niveles de AM plasmático.

En el **riñón** los niveles de amonio encontrados fueron para ratas con DPC, controles y *sham*: $4,98 \pm 0,69$ μ moles/g de tejido, $4,12 \pm 0,60$ μ moles/g de tejido y $3,93 \pm 0,96$ μ moles/g de tejido, respectivamente. (diferencia significativa). Estos datos pueden ser explicados por el papel especialmente relevante que adquiere el riñón para la eliminación del amonio en ausencia de esta función en el hígado.

El siguiente aspecto que hemos analizado ha sido los **cambios ocurridos en los niveles de los aminoácidos en la sangre**, así como en la relación entre los aminoácidos ramificados y aromáticos (AARs / AAAs). En los pacientes cirróticos se altera el normal aminoacidograma, de manera que tienden a aumentar los niveles circulantes de AAAs (fenilalanina, tirosina y triptófano) de similar manera al descenso que se aprecia en los AARs (leucina, isoleucina y valina). De esta forma, es característico de la hepatopatía evolucionada la modificación del llamado Cociente de Fischer (relación AARs/AAAs), significativamente más intensa en pacientes con grados cada vez mayores de enfermedad hepática⁽²⁰¹⁾. En el **apartado 5 de “Resultados”** se exponen los valores

obtenidos del análisis de los principales aminoácidos del plasma, tanto ramificados como aromáticos. En la **Figura-R13** se muestran gráficamente los niveles porcentuales respecto del total de los plasmáticos de los aminoácidos mencionados, apreciándose claramente la diferencia existente entre los niveles en las ratas DPC y los dos grupos control. Para todos los aminoácidos estudiados se observó una diferencia significativa ($p \leq 0,001$) entre los niveles encontrados en ratas con DPC y los de las ratas controles sin operar y *sham*. En las ratas DPC aumentaron los aminoácidos aromáticos a la vez que disminuyeron los ramificados, situación similar a la que tiene lugar en los pacientes hepatópatas. La relación AARs/AAAs o Cociente de Fisher fue de $1,13 \pm 0,21$ en ratas DPC, frente a $2,29 \pm 0,41$ en controles y $2,81 \pm 0,30$ en *sham*. La diferencia fue estadísticamente significativa, con un valor de $p < 0,001$ para ambas comparaciones. A partir de los datos referidos podemos concluir que el modelo de DPC en ratas que hemos empleado reproduce fielmente los mismos hallazgos presentes en los pacientes hepatópatas.

Campollo y colaboradores demostraron que la relación AARs/AAAs era significativamente menor en los hepatópatas con EH, los más evolucionados, frente a los controles y los enfermos compensados. En este hecho se basa la teoría de los falsos neurotransmisores, que propone la formación de estas sustancias, anormales desde un punto de vista metabólico, como una de las posibles causas del síndrome de EH. El metabolismo anómalo de los AAAs, al no funcionar adecuadamente el hígado, podría conducir a la generación de falsos neurotransmisores como la octopamina, la beta-feniletilamina, etc., que reemplazarían a los verdaderos (dopamina, etc.)⁽²⁰²⁾.

En este hecho se fundamentan también los abordajes nutricionales de la EH, centrados en el uso de preparados proteicos (generalmente de aminoácidos y, más recientemente, de péptidos) ricos en AARs y con una baja concentración de AAAs, es decir, con una razón de Fischer muy baja, con el fin de favorecer el paso al cerebro, a través de la barrera hematoencefálica, de los AARs frente a los AAAs, ya que ambos tipos de aminoácidos comparten el mismo tipo de transportador⁽²⁰³⁾.

La mayoría de las enfermedades hepáticas progresan lentamente desde la inflamación a la fibrosis y, en muchos casos, hacia la cirrosis y la HTP causante del shunt portosistémico. La HTP resulta, por un lado, del aumento de las resistencias vasculares intrahepáticas debido no sólo a los cambios arquitecturales inherentes a la fibrosis, sino también a la contracción de las células del músculo liso de la pared vascular, los miofibroblastos y los pericitos del espacio presinusoidal. Éstos no sólo están implicados en el desarrollo de la fibrosis hepática, sino que también influyen en la regulación del flujo sanguíneo intrehepático mediante la contracción-restricción del sinusoides. El **óxido nítrico**, un potente vasodilatador, se ha demostrado recientemente implicado en los fenómenos de modulación del tono intravascular de las ratas normales. Se le han encontrado además efectos anti-fibróticos en relación con su capacidad de eliminar radicales oxigenados libres. Las evidencias más recientes sugieren que la HTP de la cirrosis se debe, en parte, a un descenso de la producción hepática de ON por parte de las células endoteliales del sinusoides. La deficiencia de del ON del hígado cirrótico puede también estar implicada en la fibrosis del hígado⁽²⁰⁴⁾.

En contraste con lo que ocurre en el hígado, el ON sistémico se encuentra incrementado en la enfermedad hepática crónica, causando efectos perniciosos importantes en la hemodinámica sistémica. La

vasodilatación generalizada que desencadena redonda en un incremento de la circulación por las vísceras esplácnicas que viene a agravar el cuadro de HTP. Por tanto, los tratamientos basados en drogas que afecten a la producción de ON para tratamiento de la HTP deben estar dirigidos sobre su producción en el hígado, sin liberación sistémica del mismo⁽²⁰⁵⁾. El origen de los niveles sistémicos elevados de ON parece radicar en una producción incrementada a nivel esplácnico, de causa sin aclarar por completo y que puede implicar a múltiples mediadores celulares⁽²⁰⁶⁾.

Hemos querido conocer de qué forma se verían afectados los niveles sistémicos de ON en un modelo de hepatopatía como la DPC en ratas, en el que no existe HTP, aunque sí sus consecuencias, que son el shunt porto-sistémico y la encefalopatía. En el **apartado 6 de “Resultados”** se presentan los valores obtenidos para el ON en sangre venosa sistémica. Las ratas DPC presentaron $116,32 \pm 60,07 \mu\text{mol/l}$, mayores que los de las ratas control ($89,91 \pm 13,32 \mu\text{mol/l}$) y *sham* ($94,53 \pm 16,72 \mu\text{mol/l}$), pero sin presentar significación estadística en ninguna de las dos comparaciones. Dado que la implicación del ON en la génesis de la HTP se relaciona con la presencia de daño hepático, podemos entender que en un modelo de shunt portocava sin fibrosis no exista un incremento importante de sus niveles. Como anteriormente se comentó, este modelo experimental no reproduce los trastornos histológicos de las hepatopatías humanas que conducen a la EH, generalmente en relación con la cirrosis, lo que no implica que la funcionalidad hepática esté conservada. Ya se detallaron los numerosos estudios que sostienen la existencia de trastornos histológicos y funcionales después de la derivación portosistémica en el animal de experimentación. En este sentido, hemos querido conocer el comportamiento del ON en este modelo experimental, encontrando cierta tendencia a tener valores más elevados en las ratas DPC frente a

ambos grupos control, pero sin demostrarse una diferencia de tal magnitud para ser estadísticamente significativa.

2. INFLUENCIA DE LA DERIVACIÓN PORTO-CAVA SOBRE LOS NIVELES DE IGF-1.

En el **apartado 7 de “Resultados”** se detallan los valores de IGF-1 plasmático obtenidos en los 3 grupos de ratas estudiados. Las ratas sometidas a DPC presentaron $557,37 \pm 437,91$ $\mu\text{M/l}$, frente a los $1505,75 \pm 444,16$ $\mu\text{M/l}$ del grupo control y los $1109,85 \pm 706,02$ $\mu\text{M/l}$ del *sham*, valores que presentaron diferencia estadísticamente significativa para ambas comparaciones ($p < 0,01$). Estos datos avalan la hipótesis que nos planteamos al inicio del estudio de la posible idoneidad del modelo de la DPC en ratas para reproducir los hallazgos encontrados en los hepatópatas en cuanto a los niveles de IGF-1 se refiere que, como se detalló en la el **Apartado 2.2 de la Introducción**, se encuentran muy descendidos.

El IGF-1 es una hormona circulante, más del 90% sintetizada en el hígado y estimulada por la GH. La cirrosis hepática es una situación deficitaria en IGF-1, de intensidad mayor conforme progresa la enfermedad⁽¹⁵⁰⁾. En los pacientes cirróticos se encuentra disminuidos los niveles de IGF-1 y, los de GH, aumentados. El déficit de IGF-1 se debe a dos factores: la disminución de receptores de GH en los hepatocitos del hígado cirrótico y la progresiva reducción de la capacidad de síntesis hepática al disminuir la masa hepatocelular en estadios avanzados de la enfermedad. El incremento de GH se explica por la falta de retroalimentación negativa que ocasionan los niveles bajos de IGF-1 en el plasma. Algunas de las características del

metabolismo intermediario y de la desnutrición que se producen en la cirrosis podrían estar justificadas, en parte, por el déficit de IGF-1; de hecho, los cirróticos con desnutrición presentan las características del ayuno prolongado. La producción de glucosa por la vía de la gluconeogénesis hepática está aumentada, al igual que la proteólisis del músculo. Sin embargo, al contrario de lo que ocurre en sujetos sanos en ayunas, los cirróticos tienen niveles elevados de insulina y glucosa, característicos de la situación de resistencia a la insulina, de la que no se conoce de manera detallada su origen. Como responsables se han invocado los altos niveles de GH, glucagón y catecolaminas, así como el déficit de IGF-1, si bien los estudios más recientes han sugerido que ni el glucagón ni la GH tienen una influencia determinante en la RI⁽²⁰⁷⁾. A pesar de que la cirrosis es una situación deficitaria en IGF-1, nunca se ha planteado un tratamiento sustitutivo con administración de IGF-1 exógeno en esta enfermedad. Esto contrasta con la norma clínica según la que todas las deficiencias hormonales se tratarían de forma primaria administrando de forma externa la sustancia deficitaria, como ocurre en el hipotiroidismo, la insuficiencia suprarrenal o la diabetes. Hasta el momento sólo tenemos conciencia de la realización de un ensayo clínico administrando IGF-1 de forma crónica a pacientes cirróticos etílicos o biliares primarios, en los que se evaluaron sus efectos sobre el sistema IGF-1/IGFBP, la función hepática y el estado nutricional. En todos ellos, la administración de IGF-1 recombinante humano provocó mejoría significativa, pese a las limitaciones del estudio derivadas de la escasez de pacientes incluidos⁽¹⁵¹⁾.

El modelo de hepatopatía que, en teoría, reflejaría mejor los hallazgos del paciente con enfermedad hepática crónica debería ser, a priori, aquel que se asemejase lo más posible a la enfermedad de los humanos. En este caso debería ser el de cirrosis inducida por tetracloruro de carbono en las ratas. Tal y como se ha detallado en el

apartado 3.1.2 de la “Introducción”, este modelo tiene múltiples limitaciones que van desde las técnicas, derivadas del manejo del tetracloruro por parte del personal que trabaja con las ratas, dada su toxicidad por vía inhalatoria para los humanos, pasando por la elevada mortalidad de los animales durante el período de inducción de la cirrosis o la dificultad de conseguir niveles elevados de AM que induzcan EH. Cuando lo que se pretende estudiar es la EH, el modelo preferido, sin embargo, suele ser el de DPC en las ratas o, menos frecuentemente, en otras especies animales, pues raramente aparece encefalopatía en el modelo de cirrosis tóxica, a pesar de inducir una hepatopatía evolucionada con importante ascitis. Hasta el momento, todos los estudios sobre IGF-1 en modelos animales de hepatopatía han sido llevados a cabo, hasta donde conocemos, en ratas con cirrosis inducida por tetracloruro de carbono, es decir, en un modelo de hepatopatía sin encefalopatía. Puesto que nuestro grupo viene trabajando desde hace años en encefalopatía hepática^(8;155;196;197;199;208), nos interesaba determinar el comportamiento del IGF-1 en la rata con DPC, modelo de la misma.

Además de los valores absolutos de IGF-1, quisimos relacionar éstos con los otros dos trastornos esenciales presentes en la hepatopatía, como eran los niveles elevados del AM plasmático y la relación entre AARs y AAAs en la sangre, que como extensamente se ha detallado con anterioridad, se encuentran alterados tanto en los pacientes con fallo hepático y EH como en el modelo experimental validado en este trabajo. Al correlacionar los niveles plasmáticos de IGF-1 con los de AM se apreció una relación significativa entre ambos ($r= 0,55$; $p= 0,002$), de manera que encontramos valores de AM plasmático más bajos en las ratas cuándo éstas presentaban niveles de IGF-1 más altos. Estos resultados nos llevan a reforzar nuestro convencimiento del adecuado modelo de déficit de IGF-1 en relación

con la hepatopatía que estamos empleando. De igual forma, se realizó una correlación entre los niveles de IGF-1 y la relación AARs/AAAs, detectándose una relación significativa entre ambos ($r= 0,37$; $p< 0,05$), de manera que correspondieron valores mas altos de la relación AARs/AAAs a los niveles más altos de IGF-1. También en esta ocasión los resultados nos refuerzan en nuestra teoría.

3. EFECTO DEL TRATAMIENTO CON IGF-1rh EN LAS RATAS SOMETIDAS A DPC.

Tal y como se detalló en el **apartado 2.5 de “Material y Métodos”**, los animales que recibieron tratamiento con IGF-1 recibieron 2 inyecciones diarias con el fármaco, a dosis de $0,02 \mu\text{g/g}$ de peso del animal, durante 21 días, desde el 7º día postoperatorio hasta el 28º, día de la eutanasia.

A partir de la representación de los datos mostrados en las **Figura-R20 y –R21** podemos deducir el efecto que tuvo el tratamiento con IGF-1 sobre las ratas sometidas a DPC, en relación con la **evolución del peso** de los animales hasta el momento de su sacrificio. Se aprecia que en el caso de las ratas con DPC no tratadas éste disminuyó desde los $315,12\pm 64,11$ g al principio del estudio hasta los $295,73\pm 48,92$ g al final del mismo, mientras que en las ratas sometidas a DPC y tratadas con IGF-1rh, el peso de los animales pasó de $283,06\pm 60,5$ g al principio hasta $293,05\pm 51,12$ g finales. En términos absolutos, las ratas DPC no tratadas perdieron una media de 19,39 g, mientras las que recibieron tratamiento ganaron 9,99 g como promedio (diferencia global de 29,38 g de media entre ambos grupos). Este incremento de peso fue, sin embargo, mucho menor que el acontecido en ambos grupos control (sin operar y *sham*), de una cuantía muy

superior. Sin embargo, es interesante resaltar la peculiaridad de que el tratamiento con IGF-1 revirtió el proceso de pérdida ponderal de las ratas con DPC, provocando incluso ganancia de peso, lo que interpretamos como un cambio cualitativamente importante en el metabolismo de los animales, probablemente haciendo predominar los procesos anabólicos sobre los catabólicos más propios los animales con DPC.

En la gráfica que muestra la evolución de los pesos semana a semana (**Figura-R22**) se aprecia que tanto las ratas DPC como las DPC tratadas con IGF-1, a lo largo de la primera semana, siguen un patrón superponible, con una misma tendencia hacia la pérdida del peso con el que partían en el estudio. Este hecho es lógico, pues el grupo DPC-IGF1 no inició el tratamiento hasta el 7^o día tras la intervención, siendo, hasta entonces, ambos grupos exactamente iguales. Sin embargo, a partir de la segunda semana el patrón cambió, de manera que las ratas DPC prosiguieron la tendencia hacia la pérdida ponderal, mientras que las tratadas con IGF-1 invirtieron esta tendencia, apreciándose un claro y paulatino incremento del peso durante las restantes semanas del estudio.

En cuanto al efecto del tratamiento con IGF-1 sobre la **producción de AM en las ratas con DPC**, hay que admitir que los valores de AM en sangre fueron prácticamente iguales en los animales tratados con IGF-1 y en los no tratados ($616,37 \pm 327,38$ $\mu\text{g/dl}$ para el grupo DPC y $758,50 \pm 328,80$ $\mu\text{g/dl}$ para las DPC tratadas con IGF-1). Es necesario resaltar el hecho de que en el grupo que recibió tratamiento se obtuviesen valores de AM en sangre menores que en el grupo de animales DPC no tratados. La tendencia es similar a la apreciada en el peso de las ratas tratadas con IGF-1, es decir, a mostrar cierta mejoría, pero sin que los datos permitan la extracción de conclusiones. Podría

explicarse por un efecto positivo del IGF-1 sobre la síntesis de proteínas musculares, lo que conllevaría un aumento de la utilización del AM plasmático y por tanto a una disminución de la concentración plasmática de éste, aunque esta disminución no sea estadísticamente significativa.

Al analizar los resultados de los valores de AM en los diferentes tejidos de ratas DPC tratadas con IGF-1 y sin tratar (**Tabla-R4**) puede apreciarse que entre ambos grupos no existió diferencia estadísticamente significativa para ninguno de las determinaciones de los tejidos estudiados. A pesar de ello, la tendencia vislumbrada en el peso y AM plasmático también se apuntó en la determinación del AM tisular de cerebro, hígado, músculo, íleon y duodeno, que siempre fueron menores en las ratas tratadas que en las sin tratar. Esto podría interpretarse como una consecuencia de una cierta disminución del AM plasmático en las ratas tratadas.

De igual manera, cuando se analizaron los efectos en la **relación de aminoácidos plasmáticos** de las ratas DPC tratadas frente a las no tratadas, podemos apreciar en las **Figura R-25** y **R-26** que no se produjeron diferencias destacables ni en los principales aminoácidos de la sangre ni en las relaciones AARs/AAAs. Se apreció un ligero descenso de todos los aminoácidos en la sangre de los animales tratados con IGF-1, pero de escasa cuantía, lo que motivó la ausencia de significación estadística. Así mismo, la relación AARs/AAAs fue muy similar para ambos grupos.

Por último se analizó el efecto del tratamiento de las ratas DPC con IGF-1 en relación con los niveles de óxido nítrico en sangre. Las ratas no tratadas presentaron un valor de $116,32 \pm 60,07 \mu\text{M/l}$ frente a $85,66 \pm 26,24 \mu\text{M/l}$ de las que recibieron tratamiento con IGF-1. En la **Figura R-27** puede apreciarse la magnitud de la diferencia, lo que viene

a corroborar los anteriores indicios ya comentados en el sentido de cierta mejoría de los parámetros, pero, al igual que en las situaciones previas, sin lograr una magnitud que permita una significación estadística.

Sin duda, hay que admitir que en nuestro estudio no se ha logrado poner de manifiesto un efecto beneficioso del tratamiento de las ratas sometidas a DPC con IGF-1rh. Quizás uno de los errores haya partido del planteamiento de la dosis empleada para el tratamiento de los animales. Basándonos en los buenos resultados encontrados en cirróticos tratados con IGF-1rh con relación a la síntesis proteica del hígado y los parámetros del metabolismo energético⁽¹⁵¹⁾, intentamos extrapolar las dosis empleadas en los humanos para tratar las ratas. Además, en los estudios realizados por el grupo de la Universidad de Navarra^(91;102;105-109;111;114) se utilizó esa misma dosis sobre un modelo de cirrosis inducida mediante tetracloruro de carbono, con buenos resultados en cuanto a transporte intestinal de aminoácidos y monosacáridos, efecto antioxidante, osteopenia, atrofia de microvellosidades intestinales, atrofia testicular, retención de nitrógeno y eficacia de la alimentación. Esta diferencia podría ser debida al mayor deterioro de la función hepática que pudiese acontecer tras la derivación DPC, en función del razonamiento expuesto en el **apartado 1** de la presente discusión, respecto de la que ocurriría en la cirrosis tóxica inducida. Por tanto, el déficit de IGF-1 del modelo de DPC sería de mayor cuantía y necesitado quizás, por este motivo, de unas mayores dosis de IGF-1rh para conseguir resultados estadísticamente significativos en las ratas tratadas. En nuestro estudio se han constatado unos niveles de amonio en sangre significativamente más altos, trastornos comportamentales de la esfera alimentaria e inversión del cociente de Fisher en las ratas DPC respecto de las controles y *sham*, concordantes con un adecuado modelo de hepatopatía crónica. En el

futuro tenemos previsto la realización de nuevos estudios ensayando dosis superiores del fármaco para corroborar nuestras sospechas.



VI. CONCLUSIONES

Las conclusiones de este estudio experimental en ratas sometidas a DPC son las siguientes:

1. La técnica quirúrgica de derivación porto-cava en ratas es reproducible por personal experimentado. El tiempo de oclusión vascular superior a 20 minutos durante la intervención es el principal factor limitante para la supervivencia postoperatoria de los animales.

2. El modelo de derivación porto-cava propuesto, siguiendo la variación técnica descrita por Numata, reproduce los trastornos presentes en la encefalopatía hepática mínima del cirrótico, tales como alteraciones de la conducta alimentaria que llevan finalmente a una pérdida ponderal, hiperamonemia y alteraciones del cociente en la relación AARs / AAAs.

3. Existe un "punto de corte" para los niveles sanguíneos de amonio que segrega los animales intervenidos para derivación porto-cava del grupo sometido a intervención simulada o del grupo control no operado. Este nivel de hiperamonemia podría utilizarse como control de calidad de la técnica quirúrgica.

4. La derivación porto-cava en ratas es un modelo de déficit de IGF-1. Así mismo, los niveles de IGF-1 correlacionan de manera inversa con la concentración de amonio en la sangre.

5. La administración de IGF-1rh a ratas sometidas a DPC, por vía subcutánea, a dosis de 0,02 µg /g de peso, cada 12 horas, durante 21 días, a partir del 7º día tras la intervención de DPC no tiene beneficios significativos en las manifestaciones clínicas o analíticas de la encefalopatía hepática.



VII. BIBLIOGRAFÍA

- (1) Chung R., Podolsky D. Cirrosis y sus complicaciones. In: Isselbacher K.J., Braunwald E., Wilson J.D., Martin J.B, Fauci A.S., Kasper D.L., editors. Harrison. Principios de Medicina Interna. Nueva York: Interamericana. McGraw-Hill, 2004: 2050-2064.
- (2) Pugh RN, Murray-Lyon IM, Dawson JL, Pietroni MC, Williams R. Transection of the oesophagus for bleeding oesophageal varices. *Br J Surg* 1973; 60(8):646-649.
- (3) Ferenci P, Lockwood A, Mullen K, Tarter R, Weissenborn K, Blei AT. Hepatic encephalopathy--definition, nomenclature, diagnosis, and quantification: final report of the working party at the 11th World Congresses of Gastroenterology, Vienna, 1998. *Hepatology* 2002; 35(3):716-721.
- (4) Bustamante J, Rimola A, Ventura PJ, Navasa M, Cirera I, Reggiardo V et al. Prognostic significance of hepatic encephalopathy in patients with cirrhosis. *J Hepatol* 1999; 30(5):890-895.
- (5) Gitlin N, Lewis DC, Hinkley L. The diagnosis and prevalence of subclinical hepatic encephalopathy in apparently healthy, ambulant, non-shunted patients with cirrhosis. *J Hepatol* 1986; 3(1):75-82.
- (6) Das A, Dhiman RK, Saraswat VA, Verma M, Naik SR. Prevalence and natural history of subclinical hepatic encephalopathy in cirrhosis. *J Gastroenterol Hepatol* 2001; 16(5):531-535.
- (7) Hartmann IJ, Groeneweg M, Quero JC, Beijeman SJ, de Man RA, Hop WC et al. The prognostic significance of subclinical hepatic encephalopathy. *Am J Gastroenterol* 2000; 95(8):2029-2034.
- (8) Romero-Gomez M, Boza F, Garcia-Valdecasas MS, Garcia E, Aguilar-Reina J. Subclinical hepatic encephalopathy predicts the development of overt hepatic encephalopathy. *Am J Gastroenterol* 2001; 96(9):2718-2723.
- (9) Schomerus H, Hamster W, Blunck H, Reinhard U, Mayer K, Dolle W. Latent portasystemic encephalopathy. I. Nature of cerebral functional defects and their effect on fitness to drive. *Dig Dis Sci* 1981; 26(7):622-630.
- (10) Srivastava A, Mehta R, Rothke SP, Rademaker AW, Blei AT. Fitness to drive in patients with cirrhosis and portal-systemic

- shunting: a pilot study evaluating driving performance. *J Hepatol* 1994; 21(6):1023-1028.
- (11) Wein C, Koch H, Popp B, Oehler G, Schauder P. Minimal hepatic encephalopathy impairs fitness to drive. *Hepatology* 2004; 39(3):739-745.
- (12) Groeneweg M, Quero JC, De B, I, Hartmann IJ, Essink-bot ML, Hop WC et al. Subclinical hepatic encephalopathy impairs daily functioning. *Hepatology* 1998; 28(1):45-49.
- (13) Groeneweg M, Moerland W, Quero JC, Hop WC, Krabbe PF, Schalm SW. Screening of subclinical hepatic encephalopathy. *J Hepatol* 2000; 32(5):748-753.
- (14) Schomerus H, Hamster W. Quality of life in cirrhotics with minimal hepatic encephalopathy. *Metab Brain Dis* 2001; 16(1-2):37-41.
- (15) Butterworth RF. Pathophysiology of hepatic encephalopathy: a new look at ammonia. *Metab Brain Dis* 2002; 17(4):221-227.
- (16) Hahn M., Massen O., Nenecki M., Pavlov J. Die Eck's he fistel zwischen der unteren hohlvene und der pfortade und ihre folgen für den organismus. *Arch Exp Pathol Pharm* 1893; 32:161-210.
- (17) McDermott W., Adams R. Episodic stupor associated with an Eck fistula in the human with particular reference to the metabolism of ammonia. *J Clin Invest* 1954; 33:1-9.
- (18) Philips G., Schwartz R., Gabuzda G., Davidson C. The syndrome of impending hepatic coma in patients with cirrhosis of the liver given certain nitrogenous substances. *New England Journal of Medicine* 1952; 247:239-246.
- (19) Ong JP, Aggarwal A, Krieger D, Easley KA, Karafa MT, Van Lente F et al. Correlation between ammonia levels and the severity of hepatic encephalopathy. *Am J Med* 2003; 114(3):188-193.
- (20) Clemmesen JO, Kondrup J, Ott P. Splanchnic and leg exchange of amino acids and ammonia in acute liver failure. *Gastroenterology* 2000; 118(6):1131-1139.
- (21) Plauth M, Roske AE, Romaniuk P, Roth E, Ziebig R, Lochs H. Post-feeding hyperammonaemia in patients with transjugular intrahepatic portosystemic shunt and liver cirrhosis: role of small intestinal ammonia release and route of nutrient administration. *Gut* 2000; 46(6):849-855.

- (22) Clemmesen JO, Larsen FS, Kondrup J, Hansen BA, Ott P. Cerebral herniation in patients with acute liver failure is correlated with arterial ammonia concentration. *Hepatology* 1999; 29(3):648-653.
- (23) Lockwood AH, McDonald JM, Reiman RE, Gelbard AS, Laughlin JS, Duffy TE et al. The dynamics of ammonia metabolism in man. Effects of liver disease and hyperammonemia. *J Clin Invest* 1979; 63(3):449-460.
- (24) Alman R.W., Ehrmantraut W.R., azekas J.F., icktin H.E. Cerebral metabolism in hepatic insufficiency. *Am J Med* 1956; 21(6):843-849.
- (25) Bessman S.P., Bradley J.E. Uptake of ammonia by muscle; its implications in ammoniogenic coma. *N Engl J Med* 1955; 253(26):1143-1147.
- (26) Cooper AJ, Plum F. Biochemistry and physiology of brain ammonia. *Physiol Rev* 1987; 67(2):440-519.
- (27) Stabenau JR, Warren K.S., Rall D.P. The role of pH gradient in the distribution of ammonia between blood and cerebrospinal fluid, brain and muscle. *J Clin Invest* 1959; 38(2):373-383.
- (28) Martinez-Hernandez A, Bell KP, Norenberg MD. Glutamine synthetase: glial localization in brain. *Science* 1977; 195(4284):1356-1358.
- (29) Norenberg MD, Martinez-Hernandez A. Fine structural localization of glutamine synthetase in astrocytes of rat brain. *Brain Res* 1979; 161(2):303-310.
- (30) Waagepetersen HS, Sonnewald U, Larsson OM, Schousboe A. A possible role of alanine for ammonia transfer between astrocytes and glutamatergic neurons. *J Neurochem* 2000; 75(2):471-479.
- (31) Lin S, Raabe W. Ammonia intoxication: effects on cerebral cortex and spinal cord. *J Neurochem* 1985; 44(4):1252-1258.
- (32) Lai JC, Cooper AJ. Brain alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex: kinetic properties, regional distribution, and effects of inhibitors. *J Neurochem* 1986; 47(5):1376-1386.
- (33) Hindfielt B., Plum F., Duffy T.E. Effect of acute ammonia intoxicación on cerebral metabolism in rats with portocaval shunts. *J Clin Invest* 1977; 59:386-396.

- (34) Felipo V, Butterworth RF. Neurobiology of ammonia. *Prog Neurobiol* 2002; 67(4):259-279.
- (35) Butterworth RF. Pathogenesis of hepatic encephalopathy: new insights from neuroimaging and molecular studies. *J Hepatol* 2003; 39(2):278-285.
- (36) Therrien G, Giguere JF, Butterworth RF. Increased cerebrospinal fluid lactate reflects deterioration of neurological status in experimental portal-systemic encephalopathy. *Metab Brain Dis* 1991; 6(4):225-231.
- (37) Norenberg MD. The role of astrocytes in hepatic encephalopathy. *Neurochem Pathol* 1987; 6(1-2):13-33.
- (38) Gregorios JB, Mozes LW, Norenberg MD. Morphologic effects of ammonia on primary astrocyte cultures. II. Electron microscopic studies. *J Neuropathol Exp Neurol* 1985; 44(4):404-414.
- (39) Sobel RA, DeArmond SJ, Forno LS, Eng LF. Glial fibrillary acidic protein in hepatic encephalopathy. An immunohistochemical study. *J Neuropathol Exp Neurol* 1981; 40(6):625-632.
- (40) Rama Rao KV, Chen M, Simard JM, Norenberg MD. Increased aquaporin-4 expression in ammonia-treated cultured astrocytes. *Neuroreport* 2003; 14(18):2379-2382.
- (41) Kim JS, He L, Qian T, Lemasters JJ. Role of the mitochondrial permeability transition in apoptotic and necrotic death after ischemia/reperfusion injury to hepatocytes. *Curr Mol Med* 2003; 3(6):527-535.
- (42) Rama Rao KV, Jayakumar AR, Norenberg DM. Ammonia neurotoxicity: role of the mitochondrial permeability transition. *Metab Brain Dis* 2003; 18(2):113-127.
- (43) Haussinger D, Schliess F, Kircheis G. Pathogenesis of hepatic encephalopathy. *J Gastroenterol Hepatol* 2002; 17 Suppl 3:S256-S259.
- (44) Spahr L, Vingerhoets F, Lazeyras F, Delavelle J, DuPasquier R, Giostra E et al. Magnetic resonance imaging and proton spectroscopic alterations correlate with parkinsonian signs in patients with cirrhosis. *Gastroenterology* 2000; 119(3):774-781.
- (45) Blei AT, Olafsson S, Therrien G, Butterworth RF. Ammonia-induced brain edema and intracranial hypertension in rats after portacaval anastomosis. *Hepatology* 1994; 19(6):1437-1444.

- (46) Kosenko E, Llansola M, Montoliu C, Monfort P, Rodrigo R, Hernandez-Viadel M et al. Glutamine synthetase activity and glutamine content in brain: modulation by NMDA receptors and nitric oxide. *Neurochem Int* 2003; 43(4-5):493-499.
- (47) Brusilow SW. Hyperammonemic encephalopathy. *Medicine (Baltimore)* 2002; 81(3):240-249.
- (48) Bai G, Rama Rao KV, Murthy CR, Panickar KS, Jayakumar AR, Norenberg MD. Ammonia induces the mitochondrial permeability transition in primary cultures of rat astrocytes. *J Neurosci Res* 2001; 66(5):981-991.
- (49) Haussinger D, Kircheis G, Fischer R, Schliess F, vom DS. Hepatic encephalopathy in chronic liver disease: a clinical manifestation of astrocyte swelling and low-grade cerebral edema? *J Hepatol* 2000; 32(6):1035-1038.
- (50) Morgan MY, Milsom JP, Sherlock S. Plasma ratio of valine, leucine and isoleucine to phenylalanine and tyrosine in liver disease. *Gut* 1978; 19(11):1068-1073.
- (51) James J.H., Zipparo V., Jeppson B. Hyperammonemia, plasma amino acid imbalance and blood-brain amino acid transport: a unified theory of portalsystemic encephalopathy. *Lancet* 1979; 2:772-775.
- (52) Erecinska M, Silver IA. Metabolism and role of glutamate in mammalian brain. *Prog Neurobiol* 1990; 35(4):245-296.
- (53) Ahboucha S, Desjardins P, Chatauret N, Pomier-Layrargues G, Butterworth RF. Normal coupling of brain benzodiazepine and neurosteroid modulatory sites on the GABA-A receptor complex in human hepatic encephalopathy. *Neurochem Int* 2003; 43(6):551-556.
- (54) Butterworth RF. Neurotransmitter dysfunction in hepatic encephalopathy: new approaches and new findings. *Metab Brain Dis* 2001; 16(1-2):55-65.
- (55) Knecht K, Michalak A, Rose C, Rothstein JD, Butterworth RF. Decreased glutamate transporter (GLT-1) expression in frontal cortex of rats with acute liver failure. *Neurosci Lett* 1997; 229(3):201-203.
- (56) Zwingmann C, Desjardins P, Hazell A, Chatauret N, Michalak A, Butterworth RF. Reduced expression of astrocytic glycine

- transporter (Glyt-1) in acute liver failure. *Metab Brain Dis* 2002; 17(4):263-273.
- (57) Neuronal effect of amonio. In: Soeters P.D., Wilson J.H.P., Meijer A.F., Holm, editors. *Advances in ammonia metabolism and hepatic encephalopathy*. Amsterdam: Elsevier, 1988: 349-355.
- (58) Fan P, Lavoie J, Le NL, Szerb JC, Butterworth RF. Neurochemical and electrophysiological studies on the inhibitory effect of ammonium ions on synaptic transmission in slices of rat hippocampus: evidence for a postsynaptic action. *Neuroscience* 1990; 37(2):327-334.
- (59) Rao VL, Audet RM, Butterworth RF. Portacaval shunting and hyperammonemia stimulate the uptake of L-[3H] arginine but not of L-[3H]nitroarginine into rat brain synaptosomes. *J Neurochem* 1997; 68(1):337-343.
- (60) Mans AM, DeJoseph MR, Hawkins RA. Metabolic abnormalities and grade of encephalopathy in acute hepatic failure. *J Neurochem* 1994; 63(5):1829-1838.
- (61) Master S, Gottstein J, Blei AT. Cerebral blood flow and the development of ammonia-induced brain edema in rats after portacaval anastomosis. *Hepatology* 1999; 30(4):876-880.
- (62) O'Carroll RE, Hayes PC, Ebmeier KP, Dougall N, Murray C, Best JJ et al. Regional cerebral blood flow and cognitive function in patients with chronic liver disease. *Lancet* 1991; 337(8752):1250-1253.
- (63) Rao VL. Nitric oxide in hepatic encephalopathy and hyperammonemia. *Neurochem Int* 2002; 41(2-3):161-170.
- (64) Vallance P, Moncada S. Hyperdynamic circulation in cirrhosis: a role for nitric oxide? *Lancet* 1991; 337(8744):776-778.
- (65) Norenberg M.D. The astrocyte in the liver disease. In: Fedoroff S., Hertz L., editors. *Advances in cellular neurobiology*. New York: Academic Press, 1981: 303-352.
- (66) Murthy CR, Rama Rao KV, Bai G, Norenberg MD. Ammonia-induced production of free radicals in primary cultures of rat astrocytes. *J Neurosci Res* 2001; 66(2):282-288.
- (67) Rao VL, Audet RM, Butterworth RF. Increased nitric oxide synthase activities and L-[3H]arginine uptake in brain following portacaval anastomosis. *J Neurochem* 1995; 65(2):677-678.

- (68) Mates JM, Perez-Gomez C, Nunez dC, I, Asenjo M, Marquez J. Glutamine and its relationship with intracellular redox status, oxidative stress and cell proliferation/death. *Int J Biochem Cell Biol* 2002; 34(5):439-458.
- (69) Amores-Sanchez MI, Medina MA. Glutamine, as a precursor of glutathione, and oxidative stress. *Mol Genet Metab* 1999; 67(2):100-105.
- (70) Shawcross D., Deutz N.E.P., Olde Damink S.W.M., Jalan R. Hepatic encephalopathy in liver failure. A multiorgan perspective. In: Arroyo V., Forns X., García Pagan J.C., Rodés J., editors. *Progress in the treatment of liver diseases*. 2005.
- (71) Muckart DJ, Bhagwanjee S. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference definitions of the systemic inflammatory response syndrome and allied disorders in relation to critically injured patients. *Crit Care Med* 1997; 25(11):1789-1795.
- (72) Hu S, Sheng WS, Ehrlich LC, Peterson PK, Chao CC. Cytokine effects on glutamate uptake by human astrocytes. *Neuroimmunomodulation* 2000; 7(3):153-159.
- (73) Bender A.S., Rivera I.V., Norenberg M.D. Tumor necrosis factor induces astrocyte swelling. *Trans Am Neurochem* 1992; 23:113.
- (74) Nicolao F, Efrati C, Masini A, Merli M, Attili AF, Riggio O. Role of determination of partial pressure of ammonia in cirrhotic patients with and without hepatic encephalopathy. *J Hepatol* 2003; 38(4):441-446.
- (75) Daughaday WH, Rotwein P. Insulin-like growth factors I and II. Peptide, messenger ribonucleic acid and gene structures, serum, and tissue concentrations. *Endocr Rev* 1989; 10(1):68-91.
- (76) Sandhu MS, Dunger DB, Giovannucci EL. Insulin, insulin-like growth factor-I (IGF-I), IGF binding proteins, their biologic interactions, and colorectal cancer. *J Natl Cancer Inst* 2002; 94(13):972-980.
- (77) Salmon Jr.W.D., Daughaday W.H. A hormonally controlled serum factor which stimulates sulfate incorporation by cartilage in vitro. *J Lab Clin Med* 1957; 49:825-836.

- (78) Jones JI, Clemmons DR. Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. *Endocr Rev* 1995; 16(1):3-34.
- (79) Daughaday WH, Hall K, Raben MS, Salmon WD, Jr., van den Brande JL, van Wyk JJ. Somatomedin: proposed designation for sulphation factor. *Nature* 1972; 235(5333):107.
- (80) Froesch ER, Muller WA, Burgi H, Waldvogel M, Labhart A. Non-suppressible insulin-like activity of human serum. II. Biological properties of plasma extracts with non-suppressible insulin-like activity. *Biochim Biophys Acta* 1966; 121(2):360-374.
- (81) Rinderknecht E, Humbel RE. The amino acid sequence of human insulin-like growth factor I and its structural homology with proinsulin. *J Biol Chem* 1978; 253(8):2769-2776.
- (82) Rinderknecht E, Humbel RE. Primary structure of human insulin-like growth factor II. *FEBS Lett* 1978; 89(2):283-286.
- (83) Le Roith D. Seminars in medicine of the Beth Israel Deaconess Medical Center. Insulin-like growth factors. *N Engl J Med* 1997; 336(9):633-640.
- (84) Jacob R, Barrett E, Plewe G, Fagin KD, Sherwin RS. Acute effects of insulin-like growth factor I on glucose and amino acid metabolism in the awake fasted rat. Comparison with insulin. *J Clin Invest* 1989; 83(5):1717-1723.
- (85) Tomas FM, Knowles SE, Owens PC, Chandler CS, Francis GL, Read LC et al. Insulin-like growth factor-I (IGF-I) and especially IGF-I variants are anabolic in dexamethasone-treated rats. *Biochem J* 1992; 282 (Pt 1):91-97.
- (86) Pell JM, Bates PC. Differential actions of growth hormone and insulin-like growth factor-I on tissue protein metabolism in dwarf mice. *Endocrinology* 1992; 130(4):1942-1950.
- (87) Olanrewaju H, Patel L, Seidel ER. Trophic action of local intraileal infusion of insulin-like growth factor I: polyamine dependence. *Am J Physiol* 1992; 263(2 Pt 1):E282-E286.
- (88) Clemmons DR, Thissen JP, Maes M, Ketelslegers JM, Underwood LE. Insulin-like growth factor-I (IGF-I) infusion into hypophysectomized or protein-deprived rats induces specific IGF-binding proteins in serum. *Endocrinology* 1989; 125(6):2967-2972.

- (89) Scheiwiller E, Guler HP, Merryweather J, Scandella C, Maerki W, Zapf J et al. Growth restoration of insulin-deficient diabetic rats by recombinant human insulin-like growth factor I. *Nature* 1986; 323(6084):169-171.
- (90) Sinha MK, Buchanan C, Leggett N, Martin L, Khazanie PG, Dimarchi R et al. Mechanism of IGF-I-stimulated glucose transport in human adipocytes. Demonstration of specific IGF-I receptors not involved in stimulation of glucose transport. *Diabetes* 1989; 38(10):1217-1225.
- (91) Cemborain A, Castilla-Cortazar I, Garcia M, Quiroga J, Muguerza B, Picardi A et al. Osteopenia in rats with liver cirrhosis: beneficial effects of IGF-I treatment. *J Hepatol* 1998; 28(1):122-131.
- (92) Rosen CJ, Donahue LR, Hunter SJ. Insulin-like growth factors and bone: the osteoporosis connection. *Proc Soc Exp Biol Med* 1994; 206(2):83-102.
- (93) Grinspoon SK, Baum HB, Peterson S, Klibanski A. Effects of rhIGF-I administration on bone turnover during short-term fasting. *J Clin Invest* 1995; 96(2):900-906.
- (94) Ebeling PR, Jones JD, O'Fallon WM, Janes CH, Riggs BL. Short-term effects of recombinant human insulin-like growth factor I on bone turnover in normal women. *J Clin Endocrinol Metab* 1993; 77(5):1384-1387.
- (95) Johansson AG, Lindh E, Ljunghall S. Insulin-like growth factor I stimulates bone turnover in osteoporosis. *Lancet* 1992; 339(8809):1619.
- (96) Scharf JG, Schmitz F, Frystyk J, Skjaerbaek C, Moesus H, Blum WF et al. Insulin-like growth factor-I serum concentrations and patterns of insulin-like growth factor binding proteins in patients with chronic liver disease. *J Hepatol* 1996; 25(5):689-699.
- (97) Schwander JC, Hauri C, Zapf J, Froesch ER. Synthesis and secretion of insulin-like growth factor and its binding protein by the perfused rat liver: dependence on growth hormone status. *Endocrinology* 1983; 113(1):297-305.
- (98) Caufriez A, Reding P, Urbain D, Golstein J, Copinschi G. Insulin-like growth factor I: a good indicator of functional hepatocellular capacity in alcoholic liver cirrhosis. *J Endocrinol Invest* 1991; 14(4):317-321.

- (99) Cuneo RC, Hickman PE, Wallace JD, Teh BT, Ward G, Veldhuis JD et al. Altered endogenous growth hormone secretory kinetics and diurnal GH-binding protein profiles in adults with chronic liver disease. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1995; 43(3):265-275.
- (100) Schmid C. Insulin-like growth factors. *Cell Biol Int* 1995; 19(5):445-457.
- (101) Donaghy A, Ross R, Wicks C, Hughes SC, Holly J, Gimson A et al. Growth hormone therapy in patients with cirrhosis: a pilot study of efficacy and safety. *Gastroenterology* 1997; 113(5):1617-1622.
- (102) Picardi A, de Oliveira AC, Muguerza B, Tosar A, Quiroga J, Castilla-Cortazar I et al. Low doses of insulin-like growth factor-I improve nitrogen retention and food efficiency in rats with early cirrhosis. *J Hepatol* 1997; 26(1):191-202.
- (103) McCullough AJ, Tavill AS. Disordered energy and protein metabolism in liver disease. *Semin Liver Dis* 1991; 11(4):265-277.
- (104) Kondrup J, Nielsen K, Hamberg O. Nutritional therapy in patients with liver cirrhosis. *Eur J Clin Nutr* 1992; 46(4):239-246.
- (105) Castilla-Cortazar I, Prieto J, Urdaneta E, Pascual M, Nunez M, Zudaire E et al. Impaired intestinal sugar transport in cirrhotic rats: correction by low doses of insulin-like growth factor I. *Gastroenterology* 1997; 113(4):1180-1187.
- (106) Castilla-Cortazar I, Pascual M, Urdaneta E, Pardo J, Puche JE, Vivas B et al. Jejunal microvilli atrophy and reduced nutrient transport in rats with advanced liver cirrhosis: improvement by Insulin-like Growth Factor I. *BMC Gastroenterol* 2004; 4:12.
- (107) Castilla-Cortazar I, Picardi A, Tosar A, Ainzua J, Urdaneta E, Garcia M et al. Effect of insulin-like growth factor I on in vivo intestinal absorption of D-galactose in cirrhotic rats. *Am J Physiol* 1999; 276(1 Pt 1):G37-G42.
- (108) Pascual M, Castilla-Cortazar I, Urdaneta E, Quiroga J, Garcia M, Picardi A et al. Altered intestinal transport of amino acids in cirrhotic rats: the effect of insulin-like growth factor-I. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000; 279(2):G319-G324.
- (109) Diez-Caballero F, Castilla-Cortazar I, Garcia-Fernandez M, Puche JE, Diaz-Sanchez M, Casares AD et al. Little effects of

- insulin-like Growth Factor-I on testicular atrophy induced by hypoxia. *BMC Urol* 2006; 6:4.
- (110) Laron Z, Klinger B. Effect of insulin-like growth factor-I treatment on serum androgens and testicular and penile size in males with Laron syndrome (primary growth hormone resistance). *Eur J Endocrinol* 1998; 138(2):176-180.
- (111) Castilla-Cortazar I, Garcia M, Quiroga J, Diez N, Diez-Caballero F, Calvo A et al. Insulin-like growth factor-I reverts testicular atrophy in rats with advanced cirrhosis. *Hepatology* 2000; 31(3):592-600.
- (112) Muguerza B, Castilla-Cortazar I, Garcia M, Quiroga J, Santidrian S, Prieto J. Antifibrogenic effect in vivo of low doses of insulin-like growth factor-I in cirrhotic rats. *Biochim Biophys Acta* 2001; 1536(2-3):185-195.
- (113) Castilla-Cortazar I, Garcia M, Muguerza B, Quiroga J, Perez R, Santidrian S et al. Hepatoprotective effects of insulin-like growth factor I in rats with carbon tetrachloride-induced cirrhosis. *Gastroenterology* 1997; 113(5):1682-1691.
- (114) Garcia-Fernandez M, Castilla-Cortazar I, Diaz-Sanchez M, Navarro I, Puche JE, Castilla A et al. Antioxidant effects of insulin-like growth factor-I (IGF-I) in rats with advanced liver cirrhosis. *BMC Gastroenterol* 2005; 5:7.
- (115) Le Roith D. Seminars in medicine of the Beth Israel Deaconess Medical Center. Insulin-like growth factors. *N Engl J Med* 1997; 336(9):633-640.
- (116) Chamuleau RA. Animal models of hepatic encephalopathy. *Semin Liver Dis* 1996; 16(3):265-270.
- (117) Mullen KD, McCullough AJ. Problems with animal models of chronic liver disease: suggestions for improvement in standardization. *Hepatology* 1989; 9(3):500-503.
- (118) Mullen K.D., Birgisson S., Gacad R.C., Conjeevaram H. Animals models of hepatic encephalopathy and hyperammonemia. In: Felipo V., Grisolia S., editors. *Hepatic encephalopathy, hyperammonemia and ammonia toxicity*. New York: Plenum Press, 1994: 1-10.
- (119) Maddison JE. Canine congenital portosystemic encephalopathy. *Aust Vet J* 1988; 65(8):245-249.

- (120) Thompson JS, Schafer DF, Haun J, Schafer GJ. Adequate diet prevents hepatic coma in dogs with Eck fistulas. *Surg Gynecol Obstet* 1986; 162(2):126-130.
- (121) McLean EK, McLean AE, Sutton PM. Instant cirrhosis. An improved method for producing cirrhosis of the liver in rats by simultaneous administration of carbon tetrachloride and phenobarbitone. *Br J Exp Pathol* 1969; 50(5):502-506.
- (122) Proctor E, Chatamra K. High yield micronodular cirrhosis in the rat. *Gastroenterology* 1982; 83(6):1183-1190.
- (123) Proctor E, Chatamra K. Standardized micronodular cirrhosis in the rat. *Eur Surg Res* 1984; 16(3):182-186.
- (124) Bengtsson F, Bugge M, Vagianos C, Jeppsson B, Nobin A. Brain serotonin metabolism and behavior in rats with carbon tetrachloride-induced liver cirrhosis. *Res Exp Med (Berl)* 1987; 187(6):429-438.
- (125) Snodgrass PJ. Urea cycle enzyme activities are normal and inducible by a high-protein diet in CCl₄ cirrhosis of rats. *Hepatology* 1989; 9(3):373-379.
- (126) Cooper AJ, Lai JC. Cerebral ammonia metabolism in normal and hyperammonemic rats. *Neurochem Pathol* 1987; 6(1-2):67-95.
- (127) Bengtsson F, Nobin A, Falck B, Gage FH, Jeppsson B. Portacaval shunt in the rat: selective alterations in behavior and brain serotonin. *Pharmacol Biochem Behav* 1986; 24(6):1611-1616.
- (128) Bengtsson F, Nobin A, Falck B, Gage FH, Jeppsson B. Effect of oral branched chain amino acids on behavior and brain serotonin metabolism in portacaval shunted rats. *World J Surg* 1988; 12(2):246-254.
- (129) Bengtsson F, Bugge M, Brun A, Falck B, Henriksson KG, Nobin A. The impact of time after portacaval shunt in the rat on behavior, brain serotonin, and brain and muscle histology. *J Neurol Sci* 1988; 83(1):109-122.
- (130) Tricklebank MD, Smart JL, Bloxam DL, Curzon G. Effects of chronic experimental liver dysfunction and L-tryptophan on behaviour in the rat. *Pharmacol Biochem Behav* 1978; 9(2):181-189.

- (131) Herz R, Sautter V, Robert F, Bircher J. The Eck fistula rat: definition of an experimental model. *Eur J Clin Invest* 1972; 2(6):390-397.
- (132) Conjeevaram HS, Nagle A, Katz A, Kaminsky-Russ K, McCullough AJ, Mullen KD. Reversal of behavioral changes in rats subjected to portacaval shunt with oral neomycin therapy. *Hepatology* 1994; 19(5):1245-1250.
- (133) Coy DL, Mehta R, Zee P, Salchli F, Turek FW, Blei AT. Portal-systemic shunting and the disruption of circadian locomotor activity in the rat. *Gastroenterology* 1992; 103(1):222-228.
- (134) Coy DL, Srivastava A, Gottstein J, Butterworth RF, Blei AT. Postoperative course after portacaval anastomosis in rats is determined by the portacaval pressure gradient. *Am J Physiol* 1991; 261(6 Pt 1):G1072-G1078.
- (135) Jerkins AA, Steele RD. Diet composition and surgical technique influence the postoperative recovery of portacaval shunted rats. *Hepatology* 1988; 8(4):855-860.
- (136) Azorin I, Minana MD, Felipo V, Grisolia S. A simple animal model of hyperammonemia. *Hepatology* 1989; 10(3):311-314.
- (137) Zeneroli ML, Baraldi M, Ventura E, Vezzelli C, Tofanetti O, Germini M et al. Alterations of GABA-A and dopamine D-2 brain receptors in dogs with portal-systemic encephalopathy. *Life Sci* 1991; 48(1):37-50.
- (138) Maddison JE, Dodd PR, Morrison M, Johnston GA, Farrell GC. Plasma GABA, GABA-like activity and the brain GABA-benzodiazepine receptor complex in rats with chronic hepatic encephalopathy. *Hepatology* 1987; 7(4):621-628.
- (139) Child C.G. Eck's fistula. *Surg Gynecol Obstet* 1953; 96:375-376.
- (140) Vidal M. Le traitement chirurgicale des ascites. *Presse Med* 1903;747.
- (141) Whipple A.O. Problem of portal hypertension in relation to hepatosplenopathies. *Ann Surg* 1945; 122:445-475.
- (142) Blakemore A.H. The surgical treatment of cirrhosis of the liver. *J Chron Dis* 1955; 2:70-75.
- (143) Whitaker W.L. Portal vein ligation and Eck's fistula in the rat. *Proc Soc Exp Biol Med* 1946; 67:420-423.

- (144) Reinhard W.O., Bazell A.H. One stage functional hepatectomy in the rat. *Proc Soc Exp Biol Med* 1946; 62:270.
- (145) Berstein D.E. Simple technique for porta-caval shunt in the rat. *J App Physiol* 1959; 14:469-473.
- (146) Lee S.H., Fisher B. Portacaval shunt in the rat. *Surgery* 1961; 50:668-672.
- (147) Bismuth H., Benhamou J.P., Lataste J. [Experimental portacaval anastomosis in the normal rat. Technic and preliminary results.]. *Presse Med* 1963; 71:1859-1861.
- (148) Funovics JM, Cummings MG, Shuman L, James JH, Fischer JE. An improved nonsuture method for portacaval anastomosis in the rat. *Surgery* 1975; 77(5):661-664.
- (149) Numata M. A modified technique to make a portacaval shunt in rats. *Microsurgery* 1983; 4(4):243-244.
- (150) Conchillo M, Prieto J, Quiroga J. [Insulin-like growth factor I (IGF-I) and liver cirrhosis]. *Rev Esp Enferm Dig* 2007; 99(3):156-164.
- (151) Conchillo M, de Knecht RJ, Payeras M, Quiroga J, Sangro B, Herrero JI et al. Insulin-like growth factor I (IGF-I) replacement therapy increases albumin concentration in liver cirrhosis: results of a pilot randomized controlled clinical trial. *J Hepatol* 2005; 43(4):630-636.
- (152) Saturio-Ramos V. Reglamento del Comité Ético de Experimentación. 71, 1-3. 5-12-2003. Universidad de Sevilla. B.U.S.
- (153) James LA, Lunn PG, Elia M. Glutamine metabolism in the gastrointestinal tract of the rat assess by the relative activities of glutaminase (EC 3.5.1.2) and glutamine synthetase (EC 6.3.1.2). *Br J Nutr* 1998; 79(4):365-372.
- (154) Jover-Cobos M. Papel de la hiperamonemia sobre la actividad glutaminasa en diferentes tejidos y el estrés oxidativo en ratas sometidas a derivación portocava. TESIS DOCTORAL. 2006.
- (155) Romero-Gomez M, Jover M, Diaz-Gomez D, de Teran LC, Rodrigo R, Camacho I et al. Phosphate-activated glutaminase activity is enhanced in brain, intestine and kidneys of rats following portacaval anastomosis. *World J Gastroenterol* 2006; 12(15):2406-2411.

- (156) van Anken HC, Schiphorst ME. A kinetic determination of ammonia in plasma. *Clin Chim Acta* 1974; 56(2):151-157.
- (157) Kosenko E, Venediktova N, Kaminsky Y, Montoliu C, Felipo V. Preparation and handling of brain mitochondria useful to study uptake and release of calcium. *Brain Res Brain Res Protoc* 2001; 7(3):248-254.
- (158) Miles AM, Wink DA, Cook JC, Grisham MB. Determination of nitric oxide using fluorescence spectroscopy. *Methods Enzymol* 1996; 268:105-120.
- (159) Reverter M, Lundh T, Lindberg JE. Determination of free amino acids in pig plasma by precolumn derivatization with 6-N-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate and high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 1997; 696(1):1-8.
- (160) Burgueño MJ, Garcia-Bastos JL, Gonzalez-Buitrago JM. [ROC curves in the evaluation of diagnostic tests]. *Med Clin (Barc)* 1995; 104(17):661-670.
- (161) Shawcross D, Jalan R. Dispelling myths in the treatment of hepatic encephalopathy. *Lancet* 2005; 365(9457):431-433.
- (162) Sharma P. Improved survival rate after portacaval shunt in the rat using a modified microsurgical technique. *Eur Surg Res* 1995; 27(2):134-136.
- (163) Rigotti P, Jonung T, James JH, Edwards LL, Peters JC, Fischer JE. Infusion of branched-chain amino acids and ammonium salts in rats with portacaval shunts. *Arch Surg* 1985; 120(11):1290-1295.
- (164) Jones DB, Mullen KD, Roessle M, Maynard T, Jones EA. Hepatic encephalopathy. Application of visual evoked responses to test hypotheses of its pathogenesis in rats. *J Hepatol* 1987; 4(1):118-126.
- (165) Bosman DK, van den Buijs CA, de Haan JG, Maas MA, Chamuleau RA. The effects of benzodiazepine-receptor antagonists and partial inverse agonists on acute hepatic encephalopathy in the rat. *Gastroenterology* 1991; 101(3):772-781.
- (166) Bircher J. The rat with portacaval shunt: an animal model with chronic hepatic failure. *Pharmacol Ther [B]* 1979; 5(1-3):219-222.

- (167) Massaglia F, Remonda G, Bronsino E, Aires E. [Experimental porto-systemic diversion in the rat: a comparative analysis of technics and results]. *Ann Osp Maria Vittoria Torino* 1985; 28(1-6):28-55.
- (168) Castaing D, Bismuth H. [Portacaval anastomosis in the rat: 20 years of experimental models]. *Gastroenterol Clin Biol* 1984; 8(5):469-479.
- (169) Jover R, Madaria E, Felipo V, Rodrigo R, Candela A, Compan A. Animal models in the study of episodic hepatic encephalopathy in cirrhosis. *Metab Brain Dis* 2005; 20(4):399-408.
- (170) Gandhi CR, Murase N, Subbotin VM, Uemura T, Nalesnik M, Demetris AJ et al. Portacaval shunt causes apoptosis and liver atrophy in rats despite increases in endogenous levels of major hepatic growth factors. *J Hepatol* 2002; 37(3):340-348.
- (171) Hahn M, Massen O., Nenecki M., Pavlov J. Die Eck'sche fistel zwischen der unteren Hohlvene und der Pfortader und ihre Folgen fur den Organismus. *Arch Exp Pathol Pharm* 1893; 32:161-210.
- (172) Oudea P., Bismuth H. [Experiemental portacaval anastomosis in normal rats. Study of hepatic lessions by means of electron microscope.]. *Pathol Biol (Paris)* 1965; 13:288-296.
- (173) Terlunen E, Altenahr E, Becker K, Ossenberg FW. Liver atrophy following portacaval shunt in normal rats -- a morphometric study --. *Res Exp Med (Berl)* 1977; 170(2):133-142.
- (174) Bioulac P, Dubuisson L, Saric J, Despuyyoos L, Bedin C, Magne F et al. Chronic biliary drainage corrects liver atrophy induced by portacaval shunt in the rat. *Gastroenterology* 1981; 80(5 pt 1):1023-1030.
- (175) Miyagawa S, Makuuchi M, Kawasaki S, Kakazu T. Criteria for safe hepatic resection. *Am J Surg* 1995; 169(6):589-594.
- (176) Castaing D, Beaubernard C, Ariogul O, Gigou M, Franco D, Bismuth H. Liver atrophy and encephalopathy after portacaval shunt in the rat. *Eur Surg Res* 1982; 14(3):192-202.
- (177) Starzl TE, Francavilla A, Halgrimson CG, Francavilla FR, Porter KA, Brown TH et al. The origin, hormonal nature, and action of hepatotrophic substances in portal venous blood. *Surg Gynecol Obstet* 1973; 137(2):179-199.

- (178) Von Hosselin C., Alzheimer A. Ein Beitrag zur klinik und pathologischen anatomie der Westphal- Strumpellschem pseudosklerose. *Z Neurol Psychiat* 1912; 8:183-209.
- (179) Butterworth RF, Giguere JF, Michaud J, Lavoie J, Layrargues GP. Ammonia: key factor in the pathogenesis of hepatic encephalopathy. *Neurochem Pathol* 1987; 6(1-2):1-12.
- (180) Adams R.D., Foley J.M. The neurological disorder associated with liver disease. *Res Publ Assoc Nerv Ment Dis* 1953; 32:198.
- (181) Pilbeam CM, Anderson RM, Bhathal PS. The brain in experimental portal-systemic encephalopathy. I. Morphological changes in three animal models. *J Pathol* 1983; 140(4):331-345.
- (182) Cavanagh JB, Kyu MH. Colchicine-like effect on astrocytes after portacaval shunt in rats. *Lancet* 1969; 2(7621):620-622.
- (183) Cavanagh JB, Kyu MH. On the mechanism of type I Alzheimer abnormality in the nuclei of astrocytes. An essay in quantitative histology. *J Neurol Sci* 1971; 12(3):241-261.
- (184) Cavanagh JB, Lewis PD, Blakemore WF, Kyu MH. Changes in the cerebellar cortex in rats after portocaval anastomosis. *J Neurol Sci* 1972; 15(1):13-26.
- (185) Kyu MH, Cavanagh JB. Some effects of porto-caval anastomosis in the male rat. *Br J Exp Pathol* 1970; 51(2):217-227.
- (186) Lusted LB. Signal detectability and medical decision-making. *Science* 1971; 171(977):1217-1219.
- (187) Robertson EA, Zweig MH. Use of receiver operating characteristic curves to evaluate the clinical performance of analytical systems. *Clin Chem* 1981; 27(9):1569-1574.
- (188) Carson JL, Eisenberg JM, Shaw LM, Kundel HL, Soper KA. Diagnostic accuracy of four assays of prostatic acid phosphatase. Comparison using receiver operating characteristic curve analysis. *JAMA* 1985; 253(5):665-669.
- (189) Butterworth RF, Giguere JF. Cerebral aminoacids in portal-systemic encephalopathy: lack of evidence for altered gamma-aminobutyric acid (GABA) function. *Metab Brain Dis* 1986; 1(3):221-228.
- (190) Hermenegildo C, Monfort P, Felipe V. Activation of N-methyl-D-aspartate receptors in rat brain in vivo following acute ammonia

- intoxication: characterization by in vivo brain microdialysis. *Hepatology* 2000; 31(3):709-715.
- (191) Bernabeu R, Schmitz P, Faillace MP, Izquierdo I, Medina JH. Hippocampal cGMP and cAMP are differentially involved in memory processing of inhibitory avoidance learning. *Neuroreport* 1996; 7(2):585-588.
- (192) Bernabeu R, Schroder N, Quevedo J, Cammarota M, Izquierdo I, Medina JH. Further evidence for the involvement of a hippocampal cGMP/cGMP-dependent protein kinase cascade in memory consolidation. *Neuroreport* 1997; 8(9-10):2221-2224.
- (193) Yamada K, Hiramatsu M, Noda Y, Mamiya T, Murai M, Kameyama T et al. Role of nitric oxide and cyclic GMP in the dizocilpine-induced impairment of spontaneous alternation behavior in mice. *Neuroscience* 1996; 74(2):365-374.
- (194) Nance FC, Kline DG. Eck's fistula encephalopathy in germfree dogs. *Ann Surg* 1971; 174(5):856-862.
- (195) Damink S.W.M.O., Jalan R., Redhead D.R., Hayes P.C., Deutz N.E.P., Soeters P.B. Interorgan ammonia and amino acid metabolism in metabolically stable patients with cirrhosis and a TIPSS. *Hepatology* 2002; 36:1163-1171.
- (196) Romero-Gomez M, Grande L, Camacho I, Benitez S, Irlles JA, Castro M. Altered response to oral glutamine challenge as prognostic factor for overt episodes in patients with minimal hepatic encephalopathy. *J Hepatol* 2002; 37(6):781-787.
- (197) Romero-Gomez M. Role of phosphate-activated glutaminase in the pathogenesis of hepatic encephalopathy. *Metab Brain Dis* 2005; 20(4):319-325.
- (198) Hawkins RA, Jessy J, Mans AM, Chedid A, DeJoseph MR. Neomycin reduces the intestinal production of ammonia from glutamine. *Adv Exp Med Biol* 1994; 368:125-134.
- (199) Romero-Gomez M, Ramos-Guerrero R, Grande L, de Teran LC, Corpas R, Camacho I et al. Intestinal glutaminase activity is increased in liver cirrhosis and correlates with minimal hepatic encephalopathy. *J Hepatol* 2004; 41(1):49-54.
- (200) Sharma P, Weichetek M, Karlik W, Jeppsson B, Garwacki S. In vitro ammonia utilization and urea synthesis by rat liver after portacaval shunt. *Digestion* 1997; 58(6):587-590.

- (201) Campollo O, Sprengers D, McIntyre N. The BCAA/AAA ratio of plasma amino acids in three different groups of cirrhotics. *Rev Invest Clin* 1992; 44(4):513-518.
- (202) Butterworth RF. Pathogenesis and treatment of portal-systemic encephalopathy: an update. *Dig Dis Sci* 1992; 37(3):321-327.
- (203) Bautista JD, Corpas R, Cremades O., Hernández-Pinzón I., Ramos-Guerrero R, Villanueva A. et al. Sunflower protein hydrolysates for dietary treatment of patients with liver failure. *J American Oil Chem Soc* 2000; 77(2):121-126.
- (204) Moal F, Veal N, Vuillemin E, Barriere E, Wang J, Fizanne L et al. Hemodynamic and antifibrotic effects of a selective liver nitric oxide donor V-PYRRO/NO in bile duct ligated rats. *World J Gastroenterol* 2006; 12(41):6639-6645.
- (205) Gonzalez-Abraldes J, Garcia-Pagan JC, Bosch J. Nitric oxide and portal hypertension. *Metab Brain Dis* 2002; 17(4):311-324.
- (206) Laleman W, Landeghem L, Wilmer A, Fevery J, Nevens F. Portal hypertension: from pathophysiology to clinical practice. *Liver Int* 2005; 25(6):1079-1090.
- (207) Petersen KF, Jacob R, West AB, Sherwin RS, Shulman GI. Effects of insulin-like growth factor I on glucose metabolism in rats with liver cirrhosis. *Am J Physiol* 1997; 273(6 Pt 1):E1189-E1193.
- (208) Romero M., Castro M., Castilla L., Grande L., García E., Cuartero E. Encefalopatía hepática subclínica. Actualizaciones temáticas Madaus en Gastroenterología. Laboratorios Madaus, 2001.