

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Medicina



*“Utilidad de la Sobrecarga Oral de Glutamina en la predicción
del riesgo y del tipo de Encefalopatía Hepática”*

TESIS DOCTORAL

M^a del Mar Viloría Peñas

Unidad de Gestión Clínica de Laboratorio.

Hospital de Valme (AGS Sur de Sevilla)

Sevilla 2018



**D. MANUEL ROMERO GÓMEZ, CATEDRÁTICO DE
MEDICINA DEL DEPARTAMENTO DE MEDICINA DE LA
UNIVERSIDAD DE SEVILLA**

CERTIFICA:

Que la Tesis Doctoral que lleva por título: *“Utilidad de la Sobrecarga Oral de Glutamina en la predicción del riesgo y del tipo de Encefalopatía Hepática”*, presentada por Dña. M^a del Mar Viloría Peñas para optar al grado de Doctor, ha sido realizada en el Departamento de Medicina de la Facultad de Medicina de la Universidad de Sevilla.

Revisado el texto, doy mi conformidad para su presentación y defensa para optar al grado de Doctor por la Universidad de Sevilla.

Fdo. Dr. Manuel Romero Gómez

DIRECTOR DE LA TESIS

12 de Septiembre de 2018



**D. JAVIER AMPUERO HERROJO, PROFESOR ASOCIADO DE
MEDICINA DEL DEPARTAMENTO DE MEDICINA DE LA
UNIVERSIDAD DE SEVILLA**

CERTIFICA:

Que la Tesis Doctoral que lleva por título: *“Utilidad de la Sobrecarga Oral de Glutamina en la predicción del riesgo y del tipo de Encefalopatía Hepática”*, presentada por Dña. M^a del Mar Viloría Peñas para optar al grado de Doctor, ha sido realizada en el Departamento de Medicina de la Facultad de Medicina de la Universidad de Sevilla.

Revisado el texto, doy mi conformidad para su presentación y defensa para optar al grado de Doctor por la Universidad de Sevilla.

Fdo. Dr. Javier Ampuero Herrojo

DIRECTOR DE LA TESIS

12 de Septiembre de 2018

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero mostrar mi más sincero agradecimiento a mis directores de tesis, los Dres Javier Ampuero Herrojo y Manuel Romero-Gómez. Gracias Javier, por ser mi guía en esta tesis que nunca habría salido adelante sin tu ayuda, por tu total disponibilidad, por todo el tiempo que me has dedicado, por tu sinceridad, por tu generosidad, por tus consejos y correcciones, por animarme constantemente a seguir...gracias por todo. Gracias Manolo, por confiar en mí desde que empenzé la residencia en el hospital, por tu constante ayuda, por contargiarme de tu entusiasmo en la investigación y por hacerme participe de tus trabajos, por animarme e iniciarme en esta tesis doctoral, por articular todo el engranaje de personas para que esta tesis fuera una realidad, por tu apoyo, por tus sugerencias y ayuda durante todo este proceso.

En segundo lugar quiero darle las gracias al Dr. Antonio Moro Ortiz, “mi jefe”, por haber confiado en mí desde residente y darme la oportunidad de seguir trabajando y aprendiendo en el servicio y en el hospital donde crecí. Por tu ayuda constante, por tu ánimo, por impulsarme a realizar y a terminar esta tesis, por todas las facilidades dadas, por tu disponibilidad total, por tener siempre la puerta de su despacho abierta para hablar, por respetarme, entenderme, aconsejarme, enseñarme, guiarme, apoyarme. Por estar a mi lado en los buenos momentos y también en los más complicados, tanto profesionales como personales. Por ser una bellísima persona... gracias de corazón por todo.

Gracias a la Dra. Ana Fernández Palacín, por ayudarme con el mundo de la estadística, por tus enseñanzas, tus explicaciones y tu paciencia. Por tu amabilidad y disponibilidad. Por todo el tiempo dedicado. Ha sido un placer aprender a tu lado.

Gracias al Dr. Jesús Castillo Gómez, por ser “como un padre” en el laboratorio. Junto a tí, fui creciendo y aprendiendo. Gracias por tus continuos consejos, tantos profesionales como personales, por ser un sólido apoyo en los momentos más difíciles. Por tanto que me insistías en que terminara esta tesis. Muchas gracias.

Gracias a la Dra. Inés M^a Camacho Benitez, por ser mi amiga, mi “madre del laboratorio”, porque esta tesis empezó contigo. Por tu sabiduría. Gracias por tu alegría,

tu ayuda, tu apoyo, tus consejos, siempre disponible para ayudar y escuchar. Gracias por todo.

A todos los compañeros del laboratorio que forman parte de mi vida, con los que he crecido y con los que comparto gran parte de mi vida. Gracias a todos porque de una manera u otra todos habeis contribuido a que esta tesis llegue a su fin. Especial mención a dos personas: a mi amigo el Dr. Ignacio Peral Camacho, mi compañero de alegrías y de preocupaciones, porque vamos de la mano en el día día de nuestra aventura laboral, porque celebramos los buenos momentos y olvidamos los malos, por tus reflexiones, tus consejos y tu apoyo, por estar siempre ahí y saber que puedo contar contigo. Y, en segundo lugar, a mi amiga, la Dra. Esperanza Lepe Balsalobre. Gracias por estar a mi lado, por ayudarme, escucharme, por tu ánimo, tu apoyo, tus consejos, tu tiempo...por “meterme presión” para acabar este trabajo pero siempre con mucho cariño. Gracias, a ambos, por todo. Las siguientes son las vuestras.

A Antonio Gil Gómez, por su ayuda constante en todo lo que he necesitado, por sus consejos. Siempre disponible y con una amabilidad exquisita. Tu colaboración me ha sido también fundamental. Gracias por todo. A Raquel Rollin por haberme acompañado por el circuito de los pacientes y por tus enseñanzas.

A todos mis amigos, que de alguna manera me han acompañado durante todo este proceso.

A mis padres, a los que les debo todo. Todo me lo enseñaron y sí llegue aquí ha sido por ellos. Por su apoyo continuo, por ser mi referentes, mi punto de partida. Por todo lo que me han dado, por tanto cariño. Por todo lo que hemos compartido y espero que nos quede mucho por compartir. A mi hermana Mica, porque siempre estas a mi lado, porque juntas hemos compartido una época maravillosa.

A mi marido, Julio, con quién elegí compartir la vida. Por ese punto de calma que aportas en mi vida. Por tu paciencia, ayuda y comprensión durante todo este periodo. Por todo tu cariño. Gracias por todo.

Y por último, a las dos personas mas importantes de mi vida, a Julio y Pepe, mis hijos. Por todo vuestro amor, vuestro cariño, vuestros juegos, vuestras sonrisas, por vuestro apoyo incondicional para “mami que es la mejor”. Por, a vuestra manera, ser comprensivos por el tiempo que os he quitado. Prometo recompenaros con todo mi tiempo. Gracias, sois mi vida.

INDICE

<u>Abreviaturas</u>	XIV
<u>Tablas</u>	XV
<u>Figuras</u>	XVIII
<u>Resumen</u>	XXI
<u>1.- Introducción</u>	1
1.1.- Cirrosis hepática	1
1.1.1.- Definición.....	1
1.1.2.- Epidemiología.....	2
1.1.3.- Etiología.....	2
1.1.4.- Historia natural.....	3
1.1.5.- Métodos diagnósticos.....	5
1.2.- Encefalopatía Hepática	6
1.2.1.- Definición.....	6
1.2.2.- Epidemiología.....	7
1.2.3.- Patogénesis.....	8
1.2.3.1.- Papel del amonio en la patogénesis de la Encefalopatía Hepática...8	
1.2.3.1.1.- Fisiología del metabolismo del amonio.....	8
1.2.3.1.2.- Papel de la hiperamoniemia en la Encefalopatía Hepática.....	14
1.2.3.2.- Papel de la inflamación en la Encefalopatía Hepática.....	17
1.2.3.3.- Marcadores genéticos en el gen de la glutaminasa.....	20
1.2.4.- Clasificación.....	22
1.2.5.- Clínica.....	27
1.2.6.- Diagnóstico.....	30

1.2.7.- Diagnóstico diferencial.....	31
1.2.8.- Encefalopatía Hepática Mínima.....	31
1.2.8.1.- Prevalencia.....	32
1.2.8.2.- Importancia del diagnóstico de EH.....	33
1.2.8.3.- Diagnóstico.....	35
1.2.9.- Tratamiento Encefalopatía Hepática.....	42
1.2.9.1.- Tratamiento de soporte.....	42
1.2.9.2.- Tratamiento de los factores desencadenantes o etiológicos.....	43
1.3.- Sobrecarga Oral de Glutamina.....	45
<u>2.- Hipótesis.....</u>	48
<u>3.- Objetivos.....</u>	49
3.1.- Objetivo principal.....	49
3.2.- Objetivos secundarios.....	49
<u>4.- Material y Métodos.....</u>	50
4.1.- Selección de Pacientes.....	50
4.1.1.- Tamaño muestral.....	51
4.2.- Diseño de la Base de Datos.....	51
4.3.- Diagnóstico de Encefalopatía Hepática Mínima.....	53
4.3.1.- Test Psicométricos.....	54
4.3.2.- Frecuencia Crítica del Parpadeo.....	62
4.4.- Marcadores Genéticos.....	63
4.4.1.- Extracción de la muestra.....	63
4.4.2.- Extracción de ADN.....	63
4.4.3.- Análisis del Gen de la Glutaminasa.....	63
4.5.- Sobrecarga Oral de Glutamina.....	65

4.5.1.- Determinación de Amonio.....	67
4.6.- Circuito de Estudio de los Pacientes.....	69
4.6.1.- Primera Visita Consulta Médica.....	69
4.6.2.- Primera Visita Consulta Enfermería.....	70
4.6.3.- Seguimiento de los Pacientes.....	70
4.7.- Análisis Estadístico.....	71
<u>5.- Resultados.....</u>	73
5.1.- Características generales de la población en estudio.....	73
5.2.- Análisis del metabolismo del amonio en la población estudiada.....	77
5.3.- Análisis del estudio de marcadores genéticos en la población estudiada.	89
5.3.1.- Análisis del haplotipo TACC del gen de la glutaminasa.....	89
5.3.2.- Análisis de microsatélite.....	93
5.4.- Factores de riesgo para la EH.....	93
5.4.1.- Variables epidemiológicas.....	94
5.4.2.- Variables analíticas.....	98
5.4.3.- Variables asociadas a la respuesta a la SOG.....	99
5.4.3.1.- Impacto de la SOG en la EH.....	101
5.4.3.2.- Propuesta de redefinición de la SOG.....	105
5.4.4.- Prevalencia de EHM.....	107
5.4.5. - Variables genéticas en la predicción de EH.....	108
5.5.- Tipos de EH según el metabolismo del amonio.....	111
<u>6.- Discusión.....</u>	121
<u>7.- Conclusiones.....</u>	127
<u>8.- Bibliografía.....</u>	128

ABREVIATURAS (por orden alfabético)

AASLD: American Association for the Study of Liver Diseases

BHE: Barrera Hematoencefálica

DM: Diabetes Mellitus

EASL: European Association for the Study of the Liver.

EH: Encefalopatía Hepática

EHM: Encefalopatía Hepática Mínima

EHNA: Enfermedad por hígado graso no alcohólico.

FCP: Frecuencia Crítica del Parpadeo

IL-6: Inteleukina-6

PHES: Pruebas Neuropsicométricas

RI: Resistencia a la insulina

SNP: Single Nucleotide Polymorphism

TCN: Test de Conexión numérica

TNF: Factor de Necrosis Tumoral

VHB: Virus de la Hepatitis B

VHC: Virus de la Hepatitis C

VHD: Virus de la Hepatitis D

LISTA DE TABLAS

Tabla 1: Etiología de la Cirrosis Hepática.

Tabla 2: Clasificación de Child-Pugh.

Tabla 3: Puntuación de Child-Pugh.

Tabla 4: Índice MELD.

Tabla 5: Métodos diagnósticos de Cirrosis Hepática.

Tabla 6: Marcadores séricos de fibrosis avanzada.

Tabla 7: Clasificación de la EH según la enfermedad subyacente.

Tabla 8: Clasificación de la EH según las manifestaciones clínicas.

Tabla 9: Factores precipitantes de EH.

Tabla 10: Escala de West Haven para la gradación semicuantitativa de la EH.

Tabla 11: Factores desencadenantes de la EH.

Tabla 12: Variables bioquímicas y hematológicas de la población en estudio.

Tabla 13: Valores de los tests psicométricos y frecuencia crítica del parpadeo en la población en estudio.

Tabla 14: Valores de amonio (basal, a los 60 minutos y Δ amonio) en la población estudiada.

Tabla 15: Número de pacientes según amonio basal.

Tabla 16: Número de pacientes según Δ amonio.

Tabla 17: Clasificación según el metabolismo del amonio.

Tabla 18: Número de pacientes según el metabolismo del amonio.

Tabla 19: Número de pacientes con metabolismo del amonio parcialmente alterado.

Tabla 20: Características de la población según el metabolismo del amonio.

Tabla 21: Valores de PHES y FCP de la población según el metabolismo del amonio.

Tabla 22: Distribución por sexo y grupos de metabolismo.

Tabla 23: Distribución de la etiología de la cirrosis por grupos de metabolismo.

Tabla 24: Casos de muerte según el metabolismo del amonio.

Tabla 25: Causas de fin del estudio por grupo de metabolismo.

Tabla 26: Consumo de alcohol por grupos de metabolismo.

Tabla 27: Estadio de Child-Pugh por grupos de metabolismo.

Tabla28: Índice MELD por grupos de metabolismo.

Tabla 29: Distribución del SNP 1 (rs37771310-intron 6) en la población estudiada.

Tabla 30: Distribución del SNP 2 (rs6743496-intron 7) en la población estudiada.

Tabla 31: Distribución del SNP 3 (rs2883713-9) en la población estudiada.

Tabla 32: Distribución del SNP 4 (rs3088307-3UTR) en la población estudiada.

Tabla 33: Distribución del Haplotipo TACC en la población estudiada.

Tabla 34: Distribución del SNP 1 (rs37771310-intron 6) por grupos de metabolismo.

Tabla 35: Distribución del SNP 2 (rs6743496-intron 7) por grupos de metabolismo.

Tabla 36: Distribución del SNP 3 (rs2883713-9) por grupos de metabolismo.

Tabla 37: Distribución del SNP 4 (rs3088307-3UTR) por grupos de metabolismo.

Tabla 38: Distribución del haplotipo TACC por grupos de metabolismo.

Tabla 39: Distribución de Microsatélites por grupos de metabolismo.

Tabla 40: Distribución por sexo de los episodios de EH.

Tabla 41: Edad media de los pacientes con y sin EH.

Tabla 42: Relación entre el consumo de alcohol y los episodios de EH.

Tabla 43: Valores del score Child-Pugh en los pacientes con y sin EH.

Tabla 44: Índice MELD en los pacientes con y sin EH.

Tabla 45: Casos de EH en pacientes con episodios de EH previos.

Tabla 46: Valores de las variables analíticas, bioquímicas y hematológicas, en pacientes con y sin EH.

Tabla 47: Respuesta a la SOG en pacientes con y sin EH.

Tabla 48: Casos de EH por grupos de metabolismo.

Tabla 49: Resultados de PHES en pacientes con y sin EH.

Tabla 50: Resultados de la FCP en pacientes con y sin EH.

Tabla 51: Distribución del SNP 1 (rs37771310-intron 6) en pacientes con y sin EH.

Tabla 52: Distribución del SNP 2 (rs6743496-intron 7) en pacientes con y sin EH.

Tabla 53: Distribución del SNP 3 (rs2883713-9) en pacientes con y sin EH.

Tabla 54: Distribución del SNP 4 (rs3088307-3UTR) en pacientes con y sin EH.

Tabla 55: Distribución del Haplotipo TACC en pacientes con y sin EH.

Tabla 56: Distribución del microsatélite en pacientes con y sin EH.

Tabla 57: Pacientes con EH: análisis de variables por grupos de metabolismo del amonio.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Histología Hepática: Cirrosis micronodular.

Figura 2: Histología Hepática: tabiques fibrosos con infiltración linfo-histiocitaria, nódulos de hepatocitos de disposición trabecular, desordenada con signos regenerativos.

Figura 3: Ciclo de la urea.

Figura 4: Síntesis de glutamina.

Figura 5: Desaminación de la glutamina.

Figura 6: Fisiopatología del amonio.

Figura 7: Patogénesis de la EH.

Figura 8: Espectros clínicos de la EH.

Figura 9: Tests que componen la Escala Psicométrica de la EH.

Figura 10: Equipo para la realización de la FCP.

Figura 11: Test de símbolos y números.

Figura 12: Test de Conexión Numérica A (Prueba).

Figura 13: Test de Conexión Numérica A.

Figura 14: Test de Conexión Numérica B.

Figura 15: Test de serie de puntos.

Figura 16: Test de la línea quebrada (Prueba y test).

Figura 17: Página de Red Temática de Encefalopatía para cálculo de riesgo.

Figura 18: Imagen de genotipado: gen de la glutaminasa.

Figura 19: Imagen del análisis de microsatélites.

Figura 20: Esquema del circuito de estudio de los pacientes.

Figura 21: Distribución por sexo de la población en estudio.

Figura 22: Causas de cirrosis en la población en estudio.

Figura 23: Índice Child - Pugh de la población en estudio.

Figura 24: Causas de finalización de estudio.

Figura 25: Distribución por sexo según grupos de metabolismo del amonio.

Figura 26: Etiología de la cirrosis según grupos de metabolismo del amonio.

Figura 27: Casos de muerte por grupos de metabolismo del amonio.

Figura 28: Causas de fin de estudio por grupos de metabolismo del amonio.

Figura 29: Consumo de Alcohol por grupos de metabolismo del amonio.

Figura 30: Estadio de Child-Pugh por grupos de metabolismo del amonio.

Figura 31: Distribución por sexo de la EH.

Figura 32: Relación entre la EH y el consumo de alcohol.

Figura 33: Casos de EH con episodios de EH previa.

Figura 34: Respuesta a la SOG en pacientes con y sin EH.

Figura 35: EH por grupos de metabolismo.

Figura 36: Impacto de la SOG en la EH en función de los valores del amonio a los 60 minutos.

Figura 37: Impacto de la SOG en la EH en función de los valores del amonio basal.

Figura 38: Impacto de la SOG en la EH en función de los valores del Δ amonio.

Figura 39: Impacto de la SOG en la EH por grupos de metabolismo.

Figura 40: Edad media por grupos de metabolismo en los pacientes con EH.

Figura 41: Valores de recuento leucocitario por grupos de metabolismo en los pacientes con EH.

Figura 42: Valores de glucosa por grupos de metabolismo en los pacientes con EH.

Figura 43: Índice MELD por grupos de metabolismo en los pacientes con EH.

Figura 44: Valores de recuento leucocitario por grupos de metabolismo en los pacientes con EH.

Figura 45: Valores de INR por grupos de metabolismo en los pacientes con EH.

Figura 46: Valores de AST por grupos de metabolismo en los pacientes con EH.

Figura 47: Valores de ALT por grupos de metabolismo en los pacientes con EH.

Figura 48: Valores de albúmina por grupos de metabolismo en los pacientes con EH.

Figura 49: Valores de bilirrubina total por grupos de metabolismo en los pacientes con EH.

Resumen

La encefalopatía hepática (EH) es un síndrome neuropsiquiátrico complejo potencialmente reversible que se produce en pacientes con disfunción hepática grave o grandes comunicaciones portosistémicas. Basándose en esto, se han descrito dos tipos de la misma, asociada a insuficiencia hepática o a inflamación. Dentro de la EH una de las entidades que más dificultades diagnósticas presenta es la encefalopatía hepática mínima (EHM), que es la primera alteración dentro del espectro de manifestaciones clínicas del síndrome de la EH (el 84% de los pacientes cirróticos que desarrollan EH en el seguimiento presentaban EH en el estudio basal). La prueba de la sobrecarga oral de glutamina (SOG) ha demostrado predecir el desarrollo de EH y la mortalidad en pacientes con EHM.

Objetivos

1º) Reinterpretar la definición actual de la SOG, mejorando el rendimiento de la misma para predecir Encefalopatía Hepática. 2º) Definir el tipo de Encefalopatía Hepática (mecanismos inflamatorios vs. alteración de la función hepática) en función de la respuesta a la Sobrecarga Oral de Glutamina.

Material y métodos

Análisis retrospectivo de 256 pacientes cirróticos a los que se les realizó la SOG (ingesta de 10 g de glutamina). Se midió el amonio basal y a los 60 minutos de la ingesta, obteniéndose ambos valores y la diferencia entre ellos (Δ amonio). Los puntos de corte para el amonio basal (<78 mg/dL) y Δ amonio (<33 mg/dL) fueron determinados mediante análisis ROC, clasificando a los pacientes en metabolismo normal y alterado. Los pacientes fueron censurados a los 6 años de seguimiento o tras EH, trasplante o éxitus.

Resultados

256 pacientes cirróticos, 72.3% hombres con edad media de 57.48 años. El 32.7% (83/256) sufrieron EH, el 8.7% (22/256) recibieron trasplante hepático y el 18.9

% (48/256) fallecieron. El 36.2% (92/256) tuvieron un amonio basal mayor de 78 mg/dL y el 55% (137/256) tuvieron un Δ mayor de 33 mg/dL. Los pacientes con niveles basales de amonio mayor de 78 mg/dL tuvieron mas episodios de EH (48.9% (45/92) vs. 25.3 (41/162)) (log rank 22.901; p<0.0001) así como los pacientes con Δ mayor de 33 mg/dL (47.4 % (65/137) vs.17% (19/112))(log rank 33.154; p< 0.0001). Los pacientes con metabolismo basal y Δ alterados tuvieron mas episodios de EH (56.7% (38/67)) que los que tenían sólo una alteración (34.45 (32/93)) o ninguna (15.9 % (14/88)) (log rank 45.787; p<0.0001). En el análisis multivariante, tomando como referencia los pacientes con metabolismo de amonio normal, los pacientes con metabolismo del amonio parcialmente alterado (HR: 2.62 (95 % IC: 1.40-4.93); p=0.03), los pacientes con metabolismo del amonio totalmente alterado (HR: 6.55 (95 % IC: 3.5-12.18); p=0.0001), la edad (HR: 1.030 (95% IC:1.006-1.054); p=0.014) el Meld inicial (HR: 1.063 (95 % IC: 1.001-1.129); p=0.045) y la albúmina (HR:0.99 (95% IC:0.99-1.00); p=0.001) se asociaron de manera independiente con la EH. En los pacientes con EH se analizaron los valores (media \pm DS) de distintas variables por grupos de metabolismo del amonio, es decir, valorando la respuesta a la SOG: se observó que aquellos pacientes con EH y con una respuesta a la SOG normal, es decir, con un metabolismo del amonio normal, presentan alterados aquellos parámetros analíticos asociados la inflamación: presentan una edad mayor, mayores niveles de glucosa y de insulina y, por tanto, de resistencia a la insulina, y valores superiores de recuento leucocitario. Por otro lado, aquellos pacientes con EH y con una respuesta alterada a la SOG, es decir con un metabolismo del amonio parcialmente alterado o totalmente alterado, presentan alterados aquellos parámetros asociados a disfunción hepática: así presentan valores mayores del índice MELD inicial, valores inferiores de albúmina sérica y de plaquetas y valores superiores de enzimas hepáticas (AST y ALT), de bilirrubina total y de INR.

Conclusiones.

1º) La sobrecarga oral de glutamina permite identificar pacientes en riesgo de encefalopatía hepática. La combinación de los valores de amonio basal ($> 78 \mu\text{g/dL}$) y el incremento tras la sobrecarga ($\text{delta} > 33 \mu\text{g/dL}$) permite establecer distintos grupos de riesgo para el desarrollo de EH. 2º).La Sobrecarga Oral de Glutamina permite

identificar dos tipos de encefalopatía hepática, una asociada con disfunción hepática y por tanto con alteración del metabolismo del amonio y un segundo tipo asociado a inflamación y a resistencia a la insulina. 3º) La Sobrecarga Oral de Glutamina es una prueba segura y bien tolerada por los pacientes.

1.- Introducción

1.1- CIRROSIS HEPÁTICA

1.1.1.- Definición

Se puede definir la cirrosis hepática como un “síndrome anatomoclínico” que corresponde a la fase terminal de la mayoría de las enfermedades hepáticas crónicas progresivas, de cualquier etiología, que tienen una historia natural con frecuencia larga (García Buey y cols., 2012). Desde el punto de vista anatomopatológico, se caracteriza por desestructuración de la arquitectura lobulillar de carácter difuso, formación de septos fibrosos y nódulos de regeneración estructuralmente anormales y con una alteración de la anatomía de la vascularización hepática y de la microcirculación (Figura 1 y 2) (Anthony PP y cols., 1978).

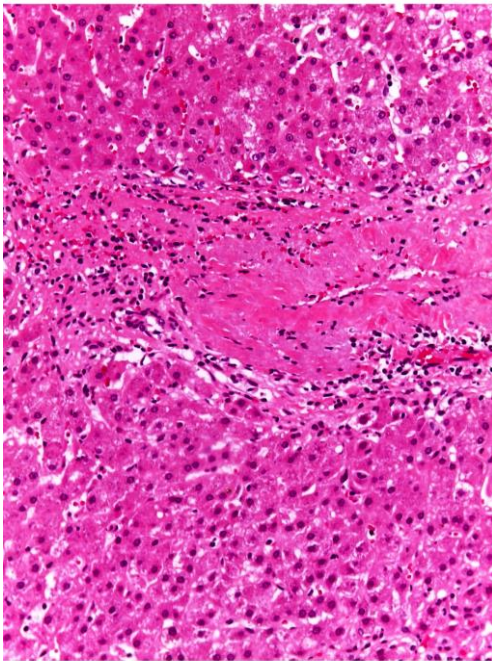


Figura 1

Figura 1: Histología Hepática: Cirrosis micronodular.

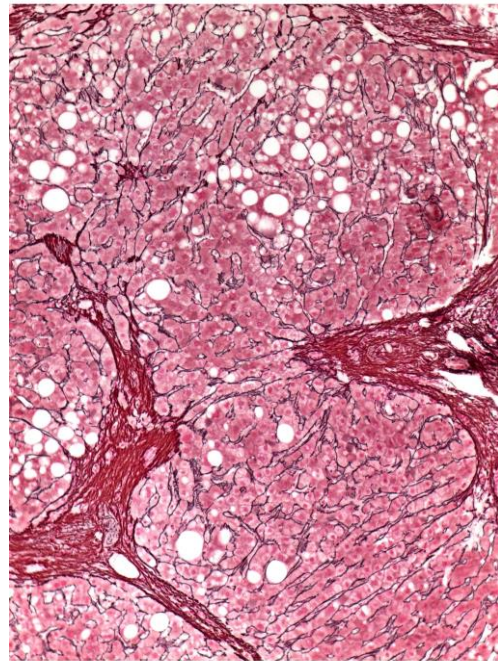


Figura 2

Figura 2: Histología Hepática: Tabiques fibrosos con infiltración linfo-histiocitaria, nódulos de hepatocitos de disposición trabecular, desordenada con signos regenerativos.

1.1.2.- Epidemiología

Se estima que la cirrosis hepática causa aproximadamente un millón de muertes al año en todo el mundo. En Europa y Estados Unidos la prevalencia es de unos 250 casos al año por cada 100.000 habitantes. Dicha prevalencia es dos veces mayor en hombre que en mujeres. En España la prevalencia se calcula entre el 1 y 2% de la población, con una frecuencia mayor en varones a partir de los 50 años. La cirrosis afecta a millones de pacientes en todo el mundo y en su evolución aparecen complicaciones importantes que se asocian a una mortalidad aproximada del 50% a los 5 años.

1.1.3.- Etiología

En los países occidentales aproximadamente el 90% de los casos se deben a tres causas principales: al abuso de alcohol, a la enfermedad por hígado graso no alcohólico (EHNA) y a la hepatitis vírica crónica. A nivel mundial, existen más de 400 millones de enfermos infectados por hepatitis crónica por el virus de la hepatitis B (VHB) y C (VHC) representando la causa más importante de cirrosis hepática (**Hatzakis y cols., 2011**). Existe un 10% de cirrosis de causa desconocida (cirrosis criptogénica), de las cuales aproximadamente el 70% se desarrollan en el contexto de resistencia a la insulina y síndrome metabólico, mientras que el 30% restante parece estar relacionada con mecanismos autoinmunes.

Metabólico-tóxica	Alcohol, EHNA, Inducida por fármacos (arsénico, metotrexato, isoniazida, amiodarona, alfa-metildopa).
Infeciosa	VHB, VHC, VHD, Eschistosomiasis.
Autoinmune	Hepatitis autoinmune, Colangitis Biliar primaria, Colangitis autoinmune, Colangitis Esclerodérmica, Colangitis asociada a IgG4.
Genético-Hereditaria	Hemocromatosis hereditaria, Enfermedad de Wilson, Déficit de Alfa-1 antitripsina, Porfiria cutánea tarda, Enf. por depósito de glucógeno, Galactosemia, Tirosinemia, Abetalipoproteinemia, Fibrosis quística.
Vascular	Insuficiencia cardíaca crónica derecha, Pericarditis constrictiva crónica, Sd. de Budd-Chiari, Sd. de obstrucción sinusoidal, Enf. de Rendu-Osler-Weber, Colangiopatía isquémica.
Criptogenética	

Tabla 1.- Etiología de la cirrosis hepática

1.1.4.- Historia Natural

La historia natural de la cirrosis hepática comienza con una primera fase asintomática, denominada *cirrosis compensada*, de duración variable y en la que la función hepática se mantiene conservada. En esta fase los pacientes pueden desarrollar hipertensión portal y varices esofágicas (**Benvegnù L y cols., 2004; D'Amico G y cols., 2006**). A medida que la enfermedad progresa y se desarrolla mayor grado tanto de hipertensión portal como de deterioro de la función hepática aparecen las complicaciones de la *cirrosis descompensada*: ascitis, hemorragia por varices, encefalopatía hepática y/o ictericia (**D'Amico G y cols., 2006**). En esta última fase, la gravedad viene definida por la presencia de hemorragia por varices recurrente, ascitis refractaria, peritonitis bacteriana espontánea y/o síndrome hepatorenal. La tasa de transición del estado compensado a descompensado es del 5-7% por año y una vez que

aparecen las complicaciones menos del 20% de los pacientes presentan una supervivencia de 5 años (D'Amico G y cols., 2006; Garcia-Tsao y cols., 2009; Schuppan y cols., 2013; Liou y cols., 2014).

El pronóstico de la enfermedad se establece en base a dos escalas de función hepática:

1º) Child-Pugh: Es la más utilizada y permite establecer un pronóstico de la gravedad del proceso y adoptar las medidas terapéuticas más adecuadas. Se puntúa con un número y una letra dependiendo de la gravedad (Child and Turcotte, 1964).

Clasificación de Child-Pugh			
Parámetros/Puntos	1 punto	2 puntos	3 puntos
Bilirrubina	< 2 mg/dL	2-3 mg/dL	> 3 mg/dL
Albúmina	> 3.5 mg/dL	2.8-3.5 mg/dL	< 2.8 mg/dL
Tiempo de Protrombina	> 50% INR < 1.7	30 – 50 % INR 1.7-2.3	< 30% INR > 2.3
Ascitis	No	Leve	Moderada-grave o con diureticos
Encefalopatía hepática	No	Grado I-II	Grado III-IV

Tabla 2.- Clasificación de Child-Pugh

CHILD A	≤ 6 PUNTOS
CHILD B	7-9 PUNTOS
CHILD C	≥ 10 PUNTOS

Tabla 3.- Puntuación de Child-Pugh.

2º) MELD (*Model for End-stage Liver Disease*): es un índice pronóstico aplicable en la fase avanzada de la cirrosis y se aplica principalmente en la priorización de pacientes para trasplante hepático (**Kamath y cols., 2001**).

Índice MELD
MELD= 9,6 x [Ln creatinina (mg/dl)] + 3,8 [Ln bilirrubina (mg/dl)] + 11,2 [Ln INR] + 6.4

Tabla 4.- Índice MELD

1.1.5.- Métodos diagnósticos

El diagnóstico de cirrosis se basa en la combinación de la clínica, técnicas de imagen, marcadores bioquímicos y hallazgos histológicos. La biopsia hepática ha sido tradicionalmente el “*Gold Standard*” para el diagnóstico de esta entidad. Se trata de un método invasivo, no exento de complicaciones y con ciertas dificultades técnicas. Por esta razón, en los últimos años hemos asistido a la proliferación de métodos no invasivos, tanto por imagen como séricos.

Biopsia hepática	Nódulos con disposición trabecular, desordenados con signos de regeneración. Septos fibrosos con infiltración linfo-histocitaria. Proliferación de conductillos biliares.
Técnicas de imagen	Ultrasonografía. Elastografía de transición. Análisis óptico de imágenes por Tomografía Computerizada. Resonancia Magnética Espectroscópica. Resonancia Magnética Elastográfica.

Tabla 5.- Métodos diagnósticos cirrosis hepática

Existen también una serie de índices séricos que son marcadores de fibrosis avanzada (estadios F3-F4) que, aunque no son específicos de cirrosis, incluyen a la misma como fase final del proceso de fibrosis.

Marcadores séricos de fibrosis avanzada	<p>Indirectos Relación AST/ALT Índice Forns Índice APRI FIB-4 Fibrotest HGM1 y HGM2 Índice de Sydney</p> <p>Directos Acido hialurónico Péptido N amino terminal del procolágeno Inhibidores tisulares de las metaloproteinasas tipo I ELF* Hepascore</p>
--	--

*Algoritmo matemático, propuesto por el Grupo Europeo de Fibrosis Hepática, que combina entre sí varios marcadores directos: Acido hialurónico, péptido amino Terminal del procolágeno e inhibidores titulares de las metaloproteinasas tipo I.

Tabla 6.- Marcadores séricos de fibrosis avanzada.

1.2- ENCEFALOPATÍA HEPÁTICA

1.2.1.- Definición

La encefalopatía hepática (EH) es un síndrome neuropsiquiátrico complejo, potencialmente reversible (**Cortés L y cols., 2012**), que se produce en pacientes con hepatopatía crónica avanzada y/o en pacientes con grandes shunts o colaterales portosistémicas, y fallo hepático fulminante. Se caracteriza por manifestaciones en las áreas cognitiva, emocional, de la personalidad, de la actividad motora, de la memoria y de la conciencia (**Aguilar J., 2012**). Además se acompaña de curso clínico fluctuante

con manifestaciones derivadas del edema cerebral y del estrés oxidativo, alteraciones en el electroencefalograma, imágenes de acumulación de manganeso en cerebro (**Krieger D y cols., 1995; Saito H y cols., 1995**) y aparición de cambios morfológicos en los astrocitos (astrocitos tipo II de Alzheimer) (**Finlayson MH y cols., 1981; Norenberg MD., 1987**).

1.2.2.- Epidemiología

La EH es una de las complicaciones mayores de la cirrosis hepática, afectando aproximadamente a un tercio de los pacientes cirróticos (**Romero-Gómez M y cols., 2014**). Su incidencia y prevalencia, por tanto, está altamente relacionada con la gravedad de la enfermedad hepática subyacente (**Rikkers L y cols., 1978; Riggio O y cols., 2011**).

La exactitud de los datos en cuanto a incidencia y prevalencia se refiere están influenciados también por dos factores a tener en cuenta. Por un lado, con frecuencia las manifestaciones clínicas no son muy evidentes, lo que dificulta el diagnóstico de la enfermedad y, por otro lado, existen múltiples herramientas para la detección de la EH. Estos hechos hacen que, con frecuencia, no haya homogeneidad en los datos, pudiendo, pues, influir en la tasa de registro de los mismos. (**Vilstrup H y cols., 2014**).

La prevalencia de EH en el momento de diagnóstico de cirrosis oscila entre 10% – 14% (**Saunders JB y cols., 1981; Jepsen P y cols., 2010**) alcanzando el 16% – 21% en aquellos pacientes con cirrosis descompensada (**D'Amico G y cols., 1986; Coltorti M y cols., 1991; Nolte W y cols., 1998; Papatheodoridis GV y cols., 1999**).

El riesgo de presentar un primer episodio de EH dentro de los 5 primeros años tras el diagnóstico de cirrosis es del 5% a 25% y depende de la presencia de factores

precipitantes, como otras complicaciones de la cirrosis y probablemente diabetes y hepatitis C (**Bustamante J y cols., 1999; Watson H y cols., 2013**).

1.2.3.- Patogénesis

Se han descrito múltiples etiologías y mecanismos fisiopatológicos involucrados en el desarrollo de EH y, aunque todavía se desconocen muchos aspectos, todos los autores coinciden que estamos ante una entidad compleja de origen metabólico.

El mecanismo fundamental es la llegada al cerebro de sustancias nitrogenadas procedentes mayoritariamente de la digestión intestinal, sin la depuración que se produce a su paso por el hígado dando lugar a los signos y síntomas característicos de la EH.

El origen de los factores que producen afectación cerebral y conducen a la EH ha sido, y sigue siendo, muy discutida. Aunque la hiperamonemia ha sido considerada como la piedra angular en el desarrollo de la EH, en los últimos años han aparecido otras teorías que implican factores como la respuesta inflamatoria sistémica o factores genéticos que interaccionarían con el amonio en la patogénesis de la EH.

1.2.3.1- Papel del amonio en la patogénesis de la Encefalopatía Hepática

1.2.3.1.1.- Fisiología del metabolismo del amonio

El amonio es un producto tóxico del metabolismo nitrogenado sintetizado a partir de la degradación de aminoácidos y de otros compuestos que contienen nitrógeno.

La palabra amoniaco deriva del latín “*ammoniacus*” y esta del griego “*αμμωνιακον*” que significaba “del oasis de Ammón” (divinidad egipcia). Los sacerdotes en el templo de Siwa, dedicado al Dios Ammón, preparaban un compuesto,

cloruro amónico, a partir del estiércol de camello, que usaban como combustible. Con el tiempo, en las paredes y techos del templo se formaban unas sales que recibieron el nombre de “sal ammoniaca” en referencia al dios egipcio.

La molécula del amoniaco está constituida por un átomo de nitrógeno y tres átomos de hidrógeno (NH_3). Su catión asociado es el amonio (NH_4^+). En los líquidos biológicos el ión amonio es, en situaciones basales (pH fisiológico de 7.4), la forma más abundante (98%) mientras que el amoniaco supone sólo un 2%. En el líquido intracelular, donde el pH es de aproximadamente 7 podemos encontrar incluso fracciones más pequeñas de amoniaco. A medida que se produce un aumento de pH aumenta también la fracción de amoniaco. Portanto, como las membranas biológicas son mucho más permeables a las moléculas no ionizadas (más liposolubles) que a las ionizadas, tan sólo el amoniaco libre difundirá a través de ellas. Este hecho va a tener una especial importancia en el caso de la barrera hematoencefálica ya que el amonio libre es un importante agente neurotóxico y su acumulación se asocia a disfunción y daño cerebral.

Los valores de referencia en sangre venosa en sujetos sanos son $<94 \mu\text{g/dL}$ en varones y $< 82 \mu\text{g/dL}$ en mujeres.

El metabolismo del amonio depende principalmente de tres reacciones metabólicas:

A) Ciclo de la Urea: Mediante la síntesis de urea se produce eliminación de amonio (**Figura 3**).

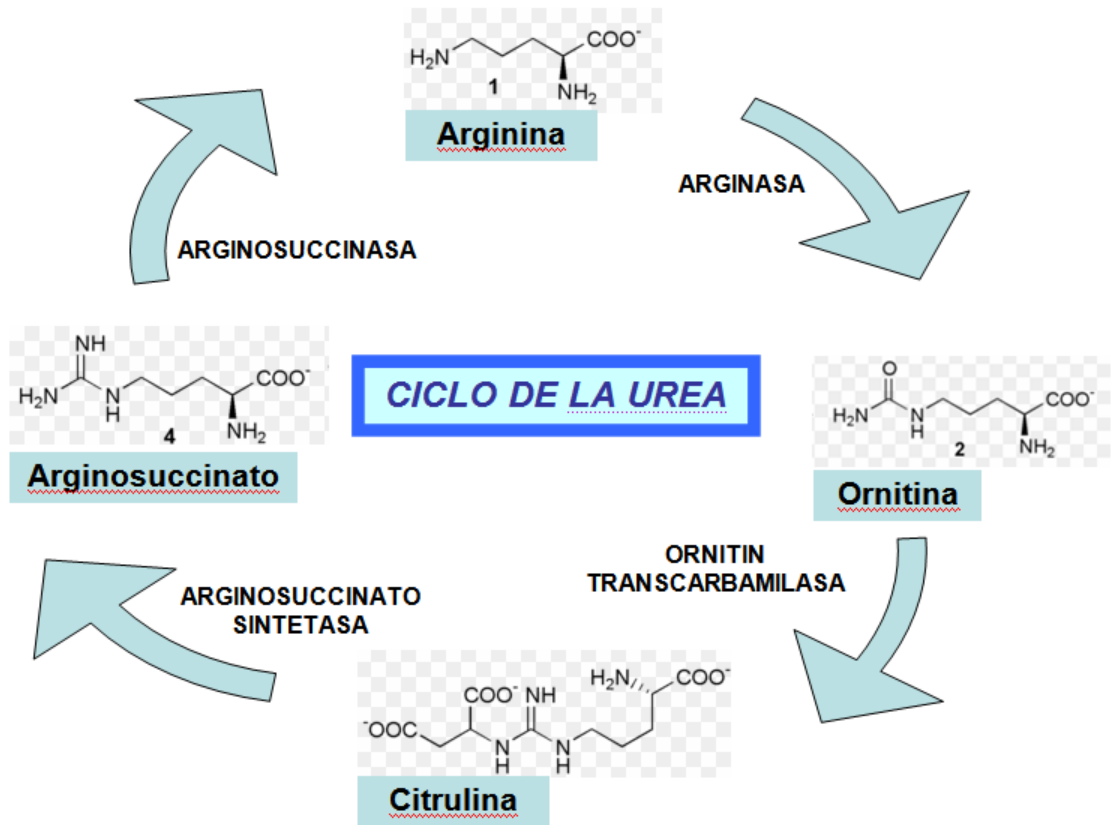


Figura 3: Ciclo de la urea.

B) Síntesis de glutamina mediante la acción de la glutamina sintetasa (Figura

4).

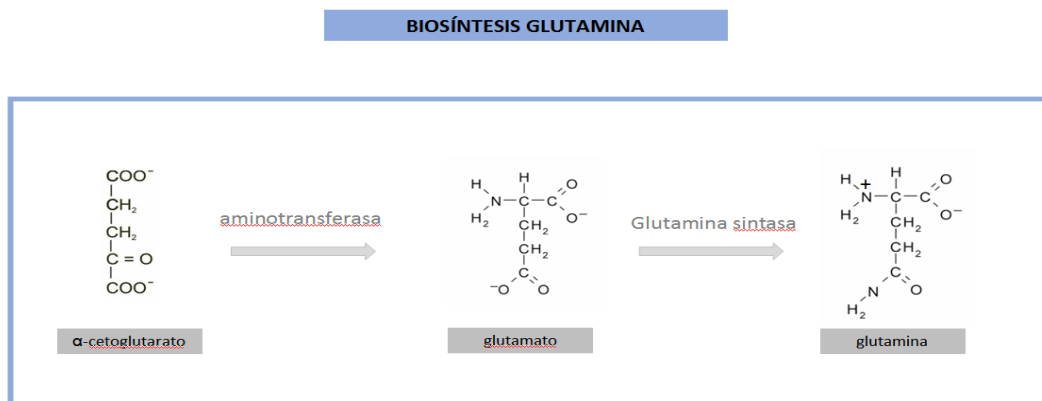


Figura 4: Síntesis de glutamina.

C) Desaminación de glutamina mediante la acción de la enzima glutaminasa

(Figura 5).

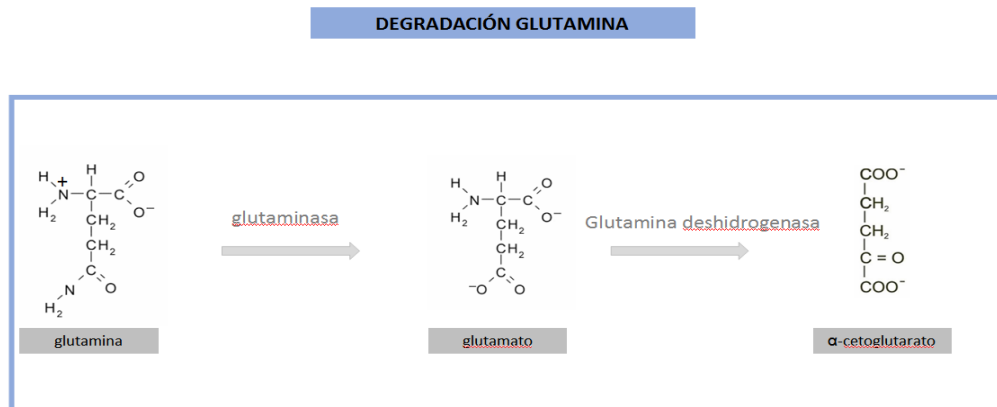


Figura 5: Desaminación de glutamina

Las fuentes principales de amonio en sangre son tres: la absorción intestinal, la síntesis hepática y otras rutas metabólicas, siendo la principal la absorción intestinal.

Aunque durante la segunda mitad del siglo XX se publicó que la mayor parte del amonio provenía de la degradación proteica y de la urea procedente de la dieta y que era llevado a cabo por las bacterias intestinales del colon (**Wolpert y cols., 1970**), en la actualidad se sabe que en el colon sólo hay un 15% de la actividad total de la glutaminasa, encontrándose aproximadamente un 84% de la actividad en el intestino delgado, fundamentalmente en el duodeno (**Olde DaminK y cols., 2002**). En esófago y estómago se detecta una actividad residual o nula. (**James y cols., 1998**).

La enzima glutaminasa cataliza la hidrólisis de la glutamina para dar glutamato, energía, sintetizar nucleótidos y amonio. Existen dos tipos: Glutaminasa fosfato dependiente (GAP) y Glutaminasa independiente de fosfato.

Dentro de las GAP, aunque se han descrito varias, hay tres isoformas principales: K, L y C. La isoforma K (Kydney) se encuentra en el riñón, el cerebro y las vellosidades intestinales. La isoforma L (Liver) únicamente se halla en el hígado. La

isoforma C (cell) esta presente en las células mononucleares de sangre periférica **(Cichoż-Lach H y cols., 2013; Rose CF., 2012)**.

La desaminación de la glutamina en el intestino se produce principalmente por la glutaminasa mitocondrial fosfato dependiente tipo renal. La actividad de esta enzima se encuentra casi cuatro veces mas elevada en pacientes con cirrosis hepática en comparación con controles sanos **(Romero-Gómez y cols., 2004)**. Esta actividad de la glutaminasa correlaciona con la Encefalopatía Hepática Mínima (EHM) (la actividad de la glutaminasa está mas elevada en los pacientes con EHM y con una prueba de Sobrecarga Oral de Glutamina (SOG) alterada que son pacientes de alto riesgo para desarrollar EH y por tanto menor supervivencia) **(Romero-Gómez y cols., 2004)**.

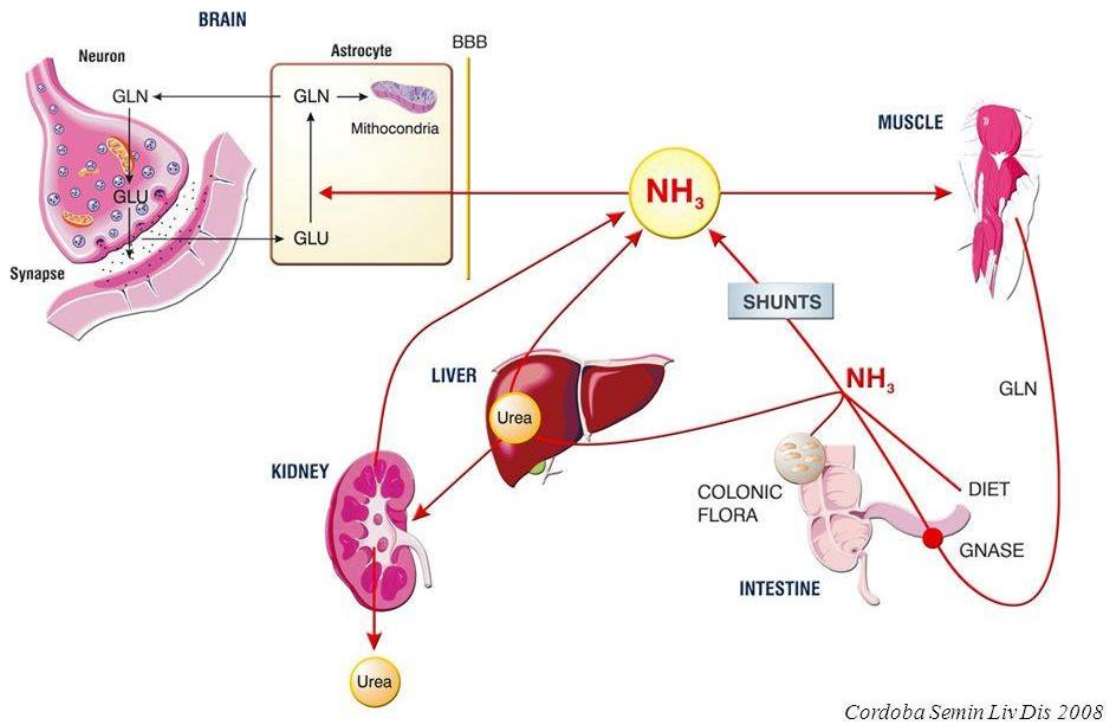
Por tanto, la producción intestinal de amonio, que a su vez depende de la acción de la glutaminasa, va a ser la responsable fundamental de los niveles en sangre de amonio (una pequeña proporción de los mismos se debe a la aportación renal que también posee actividad glutaminasa). Así, el amonio producido en el intestino alcanza el hígado vía portal. En los hepatocitos portales el 80% del amonio es detoxificado mediante el ciclo de la urea. En algunos casos el amonio también puede ser metabolizado por la glutamina sintetasa localizada en los hepatocitos pericentrales produciéndose glutamina **(Cieko-Michalska I y cols., 2012)**. En la cirrosis hepática, la detoxificación del amonio tiene lugar en el músculo mediante la síntesis de glutamina por la glutamina-sintetasa.

En condiciones normales, el amonio se elimina a través de la orina (un tercio) o pasando a la circulación sistémica (dos tercios restantes).

A nivel de la barrera hematoencefálica, en presencia de un pH alcalino, el amoniaco en exceso la atraviesa provocando el conjunto de alteraciones estructurales y funcionales que explican la mayoría de las manifestaciones clínicas de la EH. El

mecanismo fundamental de dichas alteraciones es debido al metabolismo cerebral del amonio. Este metabolismo cerebral depende sobre todo de la enzima glutamina sintetasa, que se encuentra en los astrocitos y se encarga de sintetizar glutamina a partir de glutamato y amonio. En condiciones normales, la glutamina tiene una concentración aproximada de 0.5 mmol/L en el intersticio cerebral (**O'Kane RL y cols., 2003**), que puede llegar hasta los 9 mmol/L (**Bjerring y cols., 2008**) con la llegada continua de amoniaco. Se produce, entonces, una saturación del transportador endotelial de N-aminoácido encargado de sacar la glutamina y provocando una acumulación de ésta en el citoplasma y las mitocondrias donde tras ser hidrolizada volverá a provocar altos niveles de amonio (**Ott y cols., 2014**). En esta situación de hiperamoniemia se produce también un aumento en la estimulación de los receptores NMDA de glutamato que provoca la entrada de calcio en la célula y la activación de la calmodulina que a su vez estimulará la actividad óxido nítrico sintetasa. Este óxido nítrico difunde hasta el astrocito donde bloqueará la actividad de la glutamina sintetasa inhibiendo la vía de detoxificación del amonio. Todo esto va a provocar estrés oxidativo y nitrosativo, aumentando la producción de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (Hipótesis denominada como Caballo de Troya la EH) (**Rama Rao y cols., 2014**).

El acúmulo de glutamina lleva a un desequilibrio osmótico que genera edema de los astrocitos (**Haussinger D y cols., 2000; PraKash R y cols., 2010**). Tras una larga exposición al amoniaco, los astrocitos cambian su morfología en los astrocitos de Alzheimer tipo II (el número de ellos guarda correlación con el grado de la EH). Por otro lado, la hiperamoniemia también produce especies reactivas del oxígeno que favorece el edema de los astrocitos. Debido a este edema, se producen cambios en la neurotransmisión excitatoria e inhibitoria de los neurotransmisores GABA, glutamato y glicina lo que podría explicar algunos síntomas de la EH.



Cordoba Semin Liv Dis 2008

Figura 6.- Fisiopatología del amonio

1.2.3.1.2.- Papel de la hiperamoniemia en la Encefalopatía Hepática

A finales del siglo XIX (1893) Hahn y cols describen cuadros de estupor, desorientación y coma en perros sometidos a derivación porto-cava a los que se les administraba una dieta rica en proteínas. Esta relación entre niveles elevados de amonio y presencia de alteraciones en la conducta de pacientes cirróticos se describe por primera vez en 1952 (**Philips y cols., 1952; McDemrmott y cols., 1954**).

El papel de la hiperamoniemia en la EH se puede demostrar por:

- 1) La concentración de amonio en sangre es mayor en los pacientes con EH que en los controles sanos, existiendo una relación directamente proporcional entre los valores de amonio y el grado de gravedad de la EH (**Ong y cols., 2003**). Factores como la respuesta inflamatoria sistémica y el adecuado funcionamiento de la barrera hematoencefálica podrían modular el daño cerebral que provoca la hiperamoniemia.
- 2) Una toxicidad crónica por amonio a nivel neuronal o de los astrocitos se ha relacionado con alteración de la neurotransmisión glutamatérgica (**Butterworth RF., 1996**).
- 3) Los niveles de glutamina en líquido cefalorraquídeo se correlacionan con el grado de encefalopatía, ya que el acúmulo de glutamina produce edematización de los astrocitos provocados por el desequilibrio osmótico que se produce y que da lugar a gran cantidad de mecanismos implicados en la EH. (**Häussinger D y cols., 2000**).
- 4) A nivel cerebral el amonio es principalmente metabolizado en los astrocitos. En el examen microscópico de pacientes cirróticos se observa una hiperplasia de los astrocitos de la corteza cerebral. Estos astrocitos se denominan astrocitos tipo II de Alzheimer y se caracterizan por dilatación protoplasmática, núcleo bilobulado con contornos irregulares y aspecto “aguado”, marginación de la cromatina y un nucleolo prominente (**Finlayson MH y cols., 1981; Norenberg., 1987; Gregorios y cols., 1985**).
- 5) La espectroscopía por resonancia magnética (RME) de pacientes cirróticos muestra un patrón característico con disminución de las concentraciones de mioinositol y colina y una elevación de la intensidad correspondiente a

glutamato y glutamina (**Haussinger D y cols., 1994; Geissler A y cols., 1997; Taylor- Robinson y cols., 1996**).

- 6) La neurotoxicidad del amonio es potenciada por distintos factores de la respuesta inflamatoria sistémica (factor de necrosis tumoral (TNF) y citoquinas como IL-6 e IL 1 α (**Haussinger y cols., 2002; Jalan y Kapoor., 2003**). Se ha observado que los niveles de TNF α están más elevados en pacientes con cirrosis que en sujetos sanos, encontrándose además una correlación positiva entre sus niveles y la severidad de la EH (**Odeh y cols., 2004**). El TNF α influye además en la permeabilidad de la barrera hematoencefálica, lo que favorece la difusión de amonio (**Krabbe y cols., 2005**). De forma similar, los niveles de IL-6 se van a correlacionar con la presencia de EHM y su grado de severidad (**Montoliu y cols., 2009**), así como con la modulación de la función cognitiva (**Weaver y cols., 2002**). Este aumento de amonio induce también en las neuronas la síntesis de óxido nítrico que puede inactivar la detoxificación del amonio, aumentando su toxicidad.
- 7) La diabetes mellitus (DM) y la Resistencia a la Insulina (RI) también pueden tener una especial relevancia en la patogenia de la EH. Por un lado, la DM parece que es capaz de modular la glutaminasa. Watford y cols., 1984 observaron que la actividad de la glutaminasa estaba aumentada en el riñón, en el hígado y en el intestino delgado de ratas con diabetes. Estas ratas presentaban un aumento del tamaño del intestino delgado, típico de la diabetes, que les permitía aumentar en 10 veces la capacidad de catabolizar la glutamina (Watford y col., 1984). Por otro lado, en el páncreas endocrino están presentes la glutaminasa tipo renal (en las células α) y la glutaminasa de tipo hepático (en las células β) por lo que el sistema glutamatérgico podría alterar la

secreción de insulina y glucagón. Además, la DM y la RI se caracterizan por la liberación de citoquinas proinflamatorias, sobre todo TNF α e IL-6, lo que da lugar a un aumento de la respuesta inflamatoria sistémica (**Basu y cols., 2011**). También la resistencia a la acción de la insulina podría fomentar e incrementar el catabolismo proteico y, por tanto, la producción de amonio debido a que la insulina es capaz de estimular la síntesis e inhibir la degradación proteica en los tejidos periféricos. Finalmente, la DM se acompaña con frecuencia de neuropatía del sistema nervioso autónomo, lo que supone un enlentecimiento del tránsito intestinal, que provoca estreñimiento y aumento de la traslocación bacteriana (**Sigal y cols., 2006**), hechos bien conocidos como precipitantes de EH.

Por tanto, es evidente que ante una alteración importante de la función hepática la eliminación del amonio se compromete seriamente. El exceso que llegue al torrente circulatorio pasa al cerebro a través de la barrera hematoencefálica, dando lugar a diversos cambios que afectan a múltiples sistemas de transmisión nerviosa. Esto se acentúa si se acompaña de un aumento de pH, ya que en estas condiciones se produce un incremento de la forma no ionizada, que es mucho más permeable a la membrana celular.

1.2.3.2.- Papel de la inflamación en la encefalopatía hepática.

Además del amonio, existen también claras evidencias del papel de la respuesta inflamatoria sistémica en el desarrollo de la EH. Como ya se ha comentado anteriormente, la permeabilidad de la BHE, constituida fundamentalmente por células endoteliales y astrocitos, juega un papel clave en dicho proceso. Ante cualquier proceso

inflamatorio, las células de la microglia se activan y los astrocitos liberan citoquinas inflamatorias como la IL-6 y TNF α . En el año 2004 Odeh y cols. publicaron que los niveles de TNF α eran superiores en pacientes con EH frente a controles sanos, existiendo una correlación directamente proporcional entre sus niveles y la severidad de la EH, de tal forma que a mayor nivel de TNF existe EH de mayor grado. A su vez, el TNF también aumenta la permeabilidad de la BHE contribuyendo así a aumentar el paso del amonio al cerebro. Cinco años más tarde, en el año 2009, Montoliú y cols publicaron como también los niveles de IL-6 se relacionaban con el desarrollo de EHM.

La DM y la RI también favorecerían la liberación de citoquinas, como el TNF α y la IL-6, lo que provocaría un aumento de la respuesta inflamatoria sistémica. Al mismo tiempo, esta respuesta a la insulina, aumentaría el catabolismo proteico lo que en último lugar llevaría a un aumento de la producción de amonio.

Los procesos inflamatorios también están producidos por infecciones bacterianas que son relativamente frecuentes en los pacientes cirróticos debido a la disfunción inmunológica propia de estos pacientes. En este contexto, hablamos de translocación bacteriana, definida como el paso de bacterias desde la luz intestinal, sin rotura de la integridad de la mucosa intestinal, a sitios extraintestinales, como ganglios linfáticos mesentéricos, sangre, líquido ascítico o páncreas (**Meyer S y cols., 1994; Deitch EA y cols., 1994; Llovet Jm y cols., 1994; Runyon y cols., 1994; Garcia-Tsao y cols., 2001**). Se han implicado tres mecanismos favorecedores de la translocación bacteriana:

1º) Alteración en el normal equilibrio bacteriano de la flora intestinal, sobre todo el sobrecrecimiento bacteriano por bacilos aerobios gramnegativos.

2º) Disfunción de los mecanismos de defensa inmunológica del huésped.

3º) Alteración de la barrera intestinal con un aumento asociado de la permeabilidad intestinal a las bacterias.

La principal consecuencia de esta translocación bacteriana es la predisposición al desarrollo de infecciones (**Albillos y cols 2001**). En 1998, O'Boyle y cols publicaron un estudio en el que incluyeron 448 pacientes intervenidos mediante laparotomía y analizaron la incidencia de traslocación bacteriana y su relación con el desarrollo a posteriori de infecciones bacterianas. La incidencia de traslocación bacteriana fue del 15,4 % y encontraron como factores predisponentes de la misma la edad superior a 70 años, el carácter urgente de la cirugía y la presencia de obstrucción intestinal distal. El 41% de los pacientes con translocación bacteriana presentaron infección bacteriana en el postoperación frente al 19% sin translocación, lo que apoya el papel de la misma en el desarrollo de infecciones.

En el año 2001, Ciera y cols demostraron que la cirrosis favorecía la aparición de traslocación bacteriana y que, además, es más frecuente en aquellos pacientes con un mayor deterioro de la función hepática, siendo dicha translocación fundamental para explicar la patogenia de las infecciones bacterianas en la cirrosis, especialmente la peritonitis bacteriana espontánea.

Los mecanismos por los cuales la translocación bacteriana contribuiría al deterioro hepático e inmunológico de la cirrosis está asociado a la liberación de citocinas con la consiguiente respuesta inflamatoria como consecuencia del paso de bacterias o sus endotoxinas a la circulación sistémica.

La DM también puede contribuir a este proceso, ya que suele ir acompañada de neuropatía autonómica que provoca un enlentecimiento del tránsito intestinal, estreñimiento y, por tanto, un aumento de la translocación bacteriana.

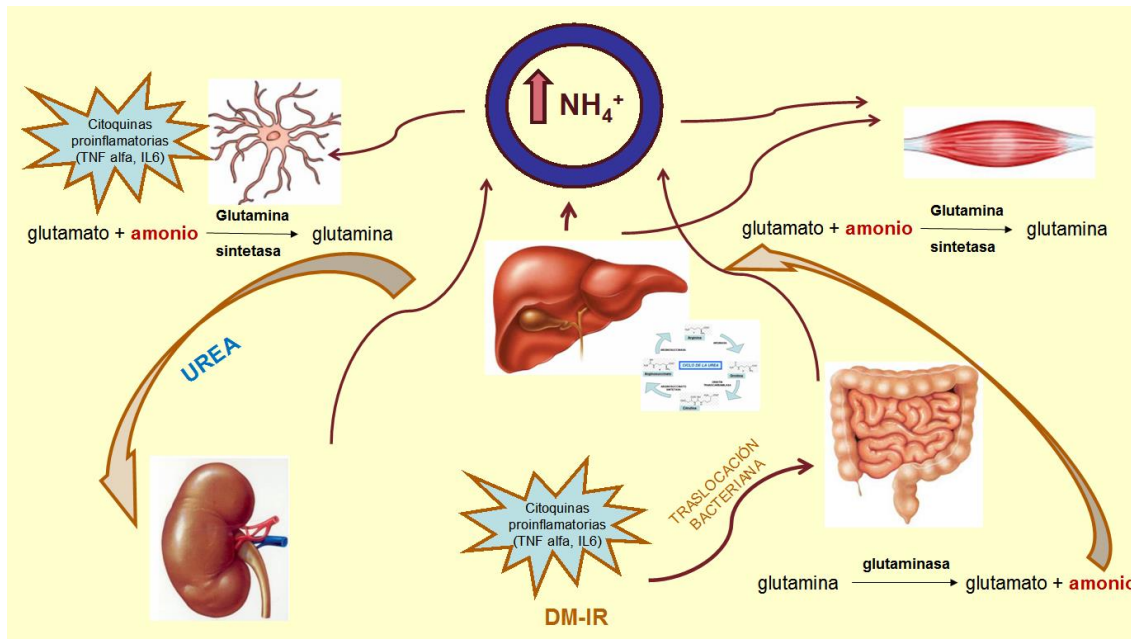


Figura 7: Patogénesis de la EH

1.2.3.3.- Marcadores genéticos en el gen de la glutaminasa.

Si bien la EHM condiciona un riesgo mayor de encefalopatía hepática clínica, no todos los pacientes la desarrollan. El 40% de los cirróticos que tienen EHM no desarrollan EH clínica después de un periodo largo de seguimiento (**Romero-Gómez y cols., 2001**). En pacientes cirróticos que presentan función hepática similar y con complicaciones asociadas con el desarrollo de encefalopatía hepática, la aparición de esta complicación podría depender de la existencia de factores genéticos que regularan en parte dicho riesgo (**Jover y cols., 2009**).

De hecho, se han identificado varios polimorfismos en el promotor del gen de la glutaminasa tipo renal en ratas que inducen una funcionalidad enzimática de hasta 10 veces más que los esperados con promotores normales (sin presentar estos polimorfismos) (**Taylor y cols., 2001**).

El gen de la glutaminasa humana tiene asignado el número 138280 en la “Online Mendelian Inheritance in Man database of human genes and genetic disorders” de la Universidad Johns Hopkins University y el número 014905 en el “Gen-Bank database

of nucleotide sequences” del Centro Nacional de Información Biológica de U.S. Se encuentra localizado en el brazo largo del cromosoma 2 (2q32-q34) y consta de 84675 pares de bases con 18 exones. Se han descrito tres isoformas que se originan en un mismo locus y que representan tres transcritos que se producen por maduración alternativa tejido-específica a partir de un único ácido ribonucleico mensajero (ARNm) original (**Modi y cols., 1991**).

En la población española se ha descrito la existencia de un bloque de ligamiento genético que cubre toda la secuencia genómica del gen de la glutaminasa. Al estudiar cuatro polimorfismos distribuidos a lo largo de todo el gen de la glutaminasa se ha demostrado la relación entre las alteraciones genéticas y el riesgo de EH. Cuando se combinan estos cuatro polimorfismos se generan dieciséis posibles haplotipos, de los cuales tan sólo cinco de ellos superan el 1% de frecuencia en la población caucásica.

En el año 2010, Romero-Gómez y cols. publicaron un trabajo, que incluyó a 286 pacientes cirróticos (109 en la cohorte de estimación y 177 en la cohorte de validación) y 107 sujetos controles sanos, en el que identificaron distintas mutaciones en la región promotora del gen de la glutaminasa relacionadas con el desarrollo de EH en pacientes cirróticos. Por un lado, la presencia de TACC (rs37771310-intron 6, rs6743496-intron 7, rs2883713-9 y rs3088307-3UTR) se postuló como un factor protector frente al desarrollo de EH (OR: 0.34; IC 95% 0.13-0.90; p=0.03) asociado a una mejor conservación de la función hepática (valorada por la escala MELD). En segundo lugar, se detectó un microsatélite (repetición de pares de bases) localizado en la región del promotor (5'UTR) que se definió como 16xGCA. En función del número de repeticiones, los alelos se agruparon en microsatélites cortos (n<14) y microsatélite largo (n>14). Los pacientes que presentaban 2 alelos largos del microsatélite en la cohorte de estimación (R: 3.12 (IC del 95%: 1.39-7.02) y en la cohorte de validación

(R: 2.1 (IC del 95% 1.17 a 3.79) mostraron un mayor riesgo de EH. Estos datos fueron apoyados por estudios funcionales, ya que se observó una mayor actividad de la luciferasa en células transformadas con la forma larga de los microsatélites, lo que sugirió que el largo de los microsatélites aumenta la actividad transcripcional de la glutaminasa (**Romero-Gómez y col., 2010**).

El haplotipo TACC se asocia con una mejor función del hígado, con una menor producción de amonio a nivel intestinal y con un menor riesgo de encefalopatía hepática. En pacientes con encefalopatía hepática aguda el haplotipo protector (TACC) aparece sólo en un 2,6% de los pacientes mientras que en pacientes cirróticos sin riesgo de encefalopatía (esto es, con sobrecarga oral de glutamina y pruebas psicométricas normales) se detectó en un 26% y en aquellos pacientes cirróticos con riesgo de encefalopatía en un 9,3% (**Jover y cols., 2009**).

1.2.4.- Clasificación

En el año 2014, la AASLD (American Association for the Study of Liver Diseases) y la EASL (European Association for the Study of the Liver) publicaron una guía conjunta de práctica clínica para el manejo de la EH en la que se propone una clasificación de la misma basada en cuatro ejes o criterios:

- 1) Según la enfermedad subyacente.
- 2) Según la severidad de las manifestaciones.
- 3) Según su evolución en el tiempo.
- 4) Según la existencia o no de un factor precipitante.

1.- Según la enfermedad subyacente (Tabla 7):

- A) Encefalopatía tipo A: Se presenta en individuos con enfermedad aguda del hígado que progresa a fallo hepático fulminante.

- B) Encefalopatía tipo B: Se presenta en pacientes con comunicaciones porto-sistémicas sin disfunción hepática.
- C) Encefalopatía tipo C: Se presenta en pacientes que tienen enfermedad crónica avanzada, cirrosis, con hipertensión portal y comunicaciones porto-sistémicas.

	Descripción
A	Encefalopatía asociada a fallo hepático agudo
B	Encefalopatía asociada a derivación portosistémica sin enfermedad hepatocelular intrínseca
C	Encefalopatía asociada a cirrosis y a hipertensión/derivación portosistémica

Tabla 7.- Clasificación de la EH según la enfermedad subyacente.

2.- Según la severidad de las manifestaciones (Tabla 8):

CLASIFICACIÓN	CLÍNICA	DESCRIPCIÓN	CRITERIOS DIAGNÓSTICOS
Mínima	Silente	No hay evidencia clínica de la enfermedad, pero sí alteración de las pruebas neurofisiológicas y test psicométricos	Alteración de las pruebas sin clínica. No hay criterios universales de diagnóstico.
Grado I	Síntomas Evidentes	<ul style="list-style-type: none"> - Pequeña disminución de conciencia. - Euforia o ansiedad. -Disminución de la capacidad de concentración. - Dificultad en las sumas y restas - Alteración del ritmo del sueño. 	El paciente parece tener algún deterioro cognitivo / conductual (según criterio de los clínicos o de sus familiares) aunque está orientado en el espacio y el tiempo. Los hallazgos clínicos pueden no ser reproducibles.
Grado II		<ul style="list-style-type: none"> - Letargo o apatía. - Desorientación en el tiempo - Cambios de personalidad evidente. -Comportamiento inadecuado - Dispraxia - Asterixis 	Desorientado en el tiempo (error en al menos tres: día semana, día mes, mes, temporada o año) mas algunos de los otros síntomas (los hallazgos clínicos pueden en parte ser reproducidos)
Grado III		<ul style="list-style-type: none"> - Somnolencia/Estupor - Respuesta a estímulos - Confuso/desorientado - Comportamiento extraño 	Desorientado en el tiempo (error en al menos tres: país, estado, región, lugar) más alguno de los otros síntomas que en parte pueden ser reproducidos.
Grado IV		Coma	No responde ni a estímulos dolorosos

Tabla 8.- Clasificación de la EH según manifestaciones clínicas.

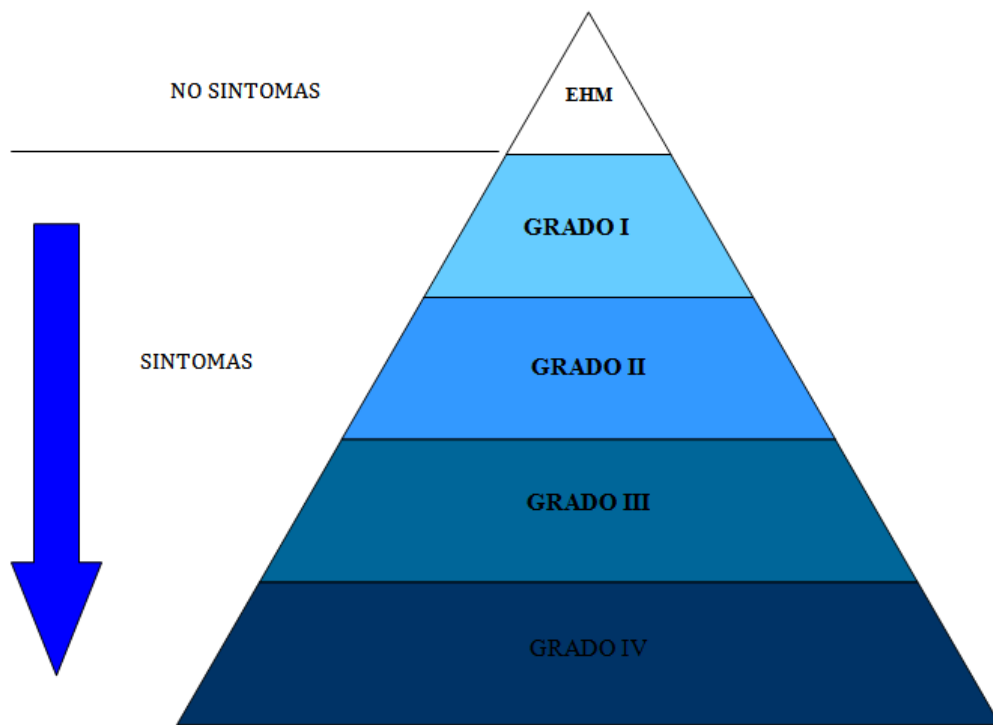


Figura 8: Espectros clínicos de la EH.

3.- Según su evolución en el tiempo

- A) Episódica: Las alteraciones clínicas y cognitivas no se mantienen a lo largo del tiempo, de tal forma que el estado mental basal se recupera una vez resuelto el episodio de EH.
- B) Recurrente: Episodios que se producen con un intervalo de tiempo de seis meses o menos.
- C) Persistente: El patrón de alteraciones de comportamiento se mantiene siempre presentes y está entremezclado con recaídas donde se hace más evidente la clínica de EH.

4.- Según la existencia o no de un factor precipitante

- A) Sin factor precipitante
- B) Con factor precipitante: estos factores precipitantes deben ser especificados e identificados (sobre todo en la EH episódica tipo C). Así mismo, tras su identificación, estos factores precipitantes deben ser tratados.

Los factores precipitantes, en orden descendiente de frecuencia, serían:

EPISÓDICA	RECURRENTE
Infecciones	Trastorno Electrolítico
Sangrado Gastrointestinal	Infecciones
Sobredosis Diuréticos	No identificados
Trastorno Electrolítico	Estreñimiento
Estreñimiento	Sobredosis de diuréticos
No identificados	Sangrado Gastrointestinal

Tabla 9.- Factores precipitantes de EH.

Cada paciente en estudio debe ser clasificado en base a estos cuatro criterios y debe ser reevaluado periódicamente en función de la situación clínica que presente.

TIPO	GRADO	CURSO CLINICO	SIN/CON FACTOR PRECIPITANTE
A	MHE 1	Asintomática	Episódica
B	2 3	Presencia de síntomas	Recurrente
C	4		Persistente
			Esponánea
			Precipitada (Especificar)

En el año 2014, Córdoba y cols propusieron una quinta clasificación que tiene en cuenta si realmente el paciente tiene un fracaso agudo sobre una patología crónica previamente existente (fallo hepático agudo sobre crónica). Aunque existen diferencias en cuanto a pronóstico esta clasificación no se encuentra implantada todavía.

1.2.5.- Clínica

Los síntomas, si bien conforman un cuadro característico pero no patognomónico, son muy variables. Prácticamente puede aparecer cualquier signo de los que provocan las enfermedades neurológicas o psiquiátricas. La presencia de cualquier alteración relacionada con el comportamiento, la actividad motora o la consciencia debe hacer sospechar el comienzo de EH en pacientes previamente diagnosticados de cirrosis hepática. La tabla 10 muestra la Escala de West Haven que permite una clasificación de útil manejo en la práctica clínica ya que tan sólo requiere de la observación por parte del médico y de un mínimo interrogatorio al paciente **(Ferenci P y cols., 2002)**.

Grado 0	Normal
Grado 1	Trastorno leve de la consciencia Euforia o ansiedad: cambios de humor, irritabilidad Disminución de la atención Dificultad para realizar sumas simples Dificultad para elaborar ideas Alteraciones del ciclo sueño/vigilia
Grado 2	Letargia o apatía Mínima desorientación temporal y/o espacial Discretos cambios en la personalidad Comportamiento inapropiado Dificultad para realizar restas simples Gran dificultad para practicar tareas mentales Asterixis manifiesta Dificultad para hablar
Grado 3	Somnolencia/semistupor con respuesta a estímulos verbales Intensa desorientación Imposibilidad de realizar tareas mentales Amnesia Habla ininteligible Confusión Agitación psicomotriz Rigidez muscular y clonus Hiperreflexia
Grado 4	Coma Postura de descerebración

Tabla 10: Escala de West Haven para la gradación semicuantitativa de la EH.

El inicio suele ser agudo (horas, pocos días) y desencadenado por distintos procesos (Tabla 11). Generalmente se resuelve en horas o días con tratamiento y, sobre todo, con la supresión del factor desencadenante (**Córdoba y cols., 2008; Poordad., 2007**).

Hemorragia gastrointestinal
Infecciones
Uremia
Hipopotasemia
Hiponatremia
Deshidratación
Tratamiento farmacológico: diuréticos, psicofármacos, antihistaminicos, Beta-bloqueantes, metionina oral.
Estreñimiento
Exceso de ingesta de proteínas en la dieta
Insuficiencia hepática aguda (alcohólica, tóxica, viral)
Derivación portosistémica
Déficit de zinc
Hipernatremia
Anemia

Tabla 11: Factores desencadenantes de EH.

Hasta hace unos años se consideraba que tras un episodio de encefalopatía los pacientes se recuperaban sin secuelas, sin embargo, actualmente esta afirmación está discutida porque hay evidencias de que los episodios de encefalopatía hepática dejan secuelas a nivel cerebral y favorecen el deterioro cognitivo precoz. **(Bajaj y cols., 2010; Riggio y cols., 2011)**. En el momento en que aparece por primera vez condiciona un mal pronóstico de la enfermedad **(Bustamante y cols., 1999)**, siendo el riesgo de recurrencia de otro episodio en un año en torno al 40% **(Romero-Gómez M y cols., 2001)** y la supervivencia al año de haber presentado el primer episodio de encefalopatía de alrededor del 50% **(Bustamante y cols., 1999; Planas y cols., 2004)**. De hecho, es la

descompensación de la cirrosis lo que determina un peor pronóstico a corto plazo (Planas y cols., 2004). Se acepta que la aparición por primera vez de signos de encefalopatía es suficiente para indicar trasplante hepático (Murray y cols., 2005; Stewart y cols., 2007).

1.2.6.- Diagnóstico

El diagnóstico de la EH es fundamentalmente clínico, siendo los síntomas muy variables y prácticamente puede aparecer cualquier signo propio de las enfermedades neurológicas o psiquiátricas. En el paciente cirrótico, la aparición de sintomatología neurológica debe hacer sospechar la presencia de EH. Una vez descartadas otras causas (diagnóstico diferencial) es preciso establecer el grado (escala de West Haven) y seguir su evolución.

El uso de técnicas de imagen puede ser útil para descartar lesiones cerebrales sólo cuando existe duda sobre la naturaleza de la alteración neurológica, y, en este caso, tiene utilidad el hallazgo en la resonancia magnética (RM) de un aumento de la señal a nivel de los núcleos de la base, especialmente en *globus palidus*, lo que indicaría EH (Córdoba y cols., 2011). Este aumento de la señal en *globus palidus* probablemente refleje un depósito de manganeso (Córdoba y cols., 2011) que se asocia con signos parkinsonianos, lo que podría sugerir el efecto patogénico de la lesión a nivel de los ganglios basales y explicaría una parte del espectro de signos y síntomas de la EH. Sin embargo, la intensidad de la señal en la RM no guarda guarda relación con el grado de EH.

La resonancia magnética espectroscópica (RMe) permite detectar la concentración cerebral de metabolitos implicados en la alteración de la neurotransmisión. En la EH las alteraciones más frecuentes detectadas son niveles

elevados de glutamina (o del cociente glutamina/glutamato) y niveles descendidos de mioinositol y colina.

1.2.7.- Diagnóstico diferencial de la EH.

El diagnóstico diferencial debe incluir aquellas patologías que alteran el nivel de conciencia:

- Encefalopatía diabética: hipoglucemia, cetoacidosis, acidosis láctica...
- Encefalopatía alcohólica: intoxicación, abstinencia, Wernicke.
- Encefalopatía por drogas: Benzodiazepinas, neurolépticos, opioides.
- Neuroinfecciones.
- Desórdenes electrolíticos (hiponatremia e hipercalcemia).
- Epilepsia no convulsiva.
- Patología psiquiátrica.
- Traumatismo y sangrado intracraneal.
- Stress severo. Fallo orgánico e inflamación.
- Demencia: primaria y secundaria.
- Lesiones cerebrales: traumatismo, neoplasias, hidrocefalia.
- Apnea obstructiva del sueño.

1.2.8.- Encefalopatía hepática mínima

Dentro de la EH una de las entidades que más dificultades diagnósticas presenta es la EHM, que es la primera alteración dentro del espectro de manifestaciones clínicas

del síndrome de la EH (el 84% de los pacientes cirróticos que desarrollan EH en el seguimiento presentaban EHM en el estudio basal **(Ferenci y cols., 2002)**).

Aunque actualmente EHM es el término más aceptado también ha sido llamada encefalopatía hepática latente o subclínica, **(Bajaj y cols., 2009; Córdoba., 2011; Ortiz y cols., 2005)** y en ella se presentan una serie de alteraciones neuropsicológicas que afectan a la calidad de vida de los pacientes. La escala del perfil de impacto de la enfermedad (SIP) **(Groeneweg y cols., 1998)** demuestra que las áreas más comúnmente alteradas en los cirróticos con EHM son el tiempo libre, alerta, sueño y descanso, interacción social, gestión del hogar, comportamiento emocional y trabajo **(Groeneweg y cols., 2000)** y su capacidad para desarrollar tareas peligrosas, pero que pueden pasar desapercibidas en la práctica clínica habitual ya que la exploración neurológica es normal necesitándose tests psicométricos o estudios neurofisiológicos para un correcto diagnóstico **(Ortiz y cols., 2005)**. Las principales funciones cerebrales alteradas en pacientes con EHM son la atención y la habilidad motora fina **(Weissenborn y cols. 2001)**. El deterioro en la aptitud laboral es el que genera mayor impacto en la calidad de vida, siendo especialmente importante en los profesionales que requieren destreza manual.

1.2.8.1- Prevalencia.

La prevalencia de EHM en pacientes con cirrosis hepática va a depender de la selección de pruebas psicométricas empleadas para su diagnóstico, de que existan tablas de normalidad que permitan clasificar correctamente a los pacientes y de la función hepática que presenten los pacientes incluidos.

Cuando se utilizan pruebas psicométricas validadas, corregidas por los datos obtenidos en la población sana controlada por edad y nivel de formación, la prevalencia de EHM oscila entre el 25 y 33% de los pacientes cirróticos compensados.

1.2.8.2- Importancia del Diagnóstico de EHM.

Como ya se ha referido anteriormente, el desarrollo de encefalopatía hepática condiciona un mal pronóstico de la enfermedad: se estima que la supervivencia se sitúa en torno al 50% al año y del 15-23% a los tres años de sufrir un episodio de encefalopatía hepática clínica (**Bustamante y cols., 1999**). Además, el 84% de los pacientes que desarrollaron EH previamente ya tenían EHM (**Romero-Gómez y cols., 2001**). Por tanto, el reconocimiento precoz de alteraciones neuropsicológicas que puedan predecir el desarrollo de esta complicación es crítico en el manejo del paciente cirrótico. Entre las consecuencias derivadas de la EHM cabe destacar los trastornos de la atención, la habilidad manual y la memoria que pueden dificultar las actividades necesarias en la vida diaria de relación o laboral, así como aumentar el riesgo de accidentes, incluidos los derivados del manejo de máquinas (**Ortiz y cols., 2005**). Todos estos factores pueden condicionar de forma importante la calidad de vida de los pacientes (**Groeneweg y cols., 1998; Córdoba y cols., 2003**), alterando el comportamiento, las medidas de higiene personal, la alimentación y el riesgo, entre otros, de padecer accidentes laborales, domésticos y de circulación (**Bajaj y cols., 2009**). Aunque existe unanimidad a nivel general sobre el efecto directo de la EH sobre la calidad de vida, en muchas ocasiones la alteración neuropsicológica impide que estos pacientes puedan completar cuestionarios rutinarios sobre calidad de vida. Entre las alteraciones sobre la calidad de vida más estudiadas cabe destacar la presencia de caídas y de accidentes de tráfico. Las caídas son de especial relevancia en los pacientes

cirróticos ya que el riesgo de fracturas es superior a la población general por la mayor prevalencia que presentan de osteoporosis (malnutrición, hipogonadismo, insuficiencia hepática) suponiendo un aumento de la morbimortalidad **(Diamond y cols., 1990)**. Román y col., realizaron un estudio retrospectivo en el que comparaban el porcentaje de caídas entre cirróticos con EHM (40%), cirróticos sin EHM (12,9%) y controles (11,6%), observándose diferencias significativas **(Román y cols., 2011)**. La relación entre EHM y los accidentes de tráfico se sustenta a los déficits de atención, visuales y motores asociados a estos pacientes **(Bajaj y cols., 2007)**. En el año 2009 Bajaj y cols., publicaron un estudio en el que los pacientes con EHM presentaban un 16% de accidentes de tráfico frente al 4% de los que no la tenían **(Bajaj y cols., 2009)**. Este mismo grupo, en el año 2012, publicó un estudio dónde se comparan los costes estimados de los accidentes de tráfico en pacientes con EHM y los costes derivados de su diagnóstico precoz y su manejo, sugiriendo que el cribaje de EHM mediante un test computerizado (Inhibitory Control Test) y el tratamiento con lactulosa de los pacientes diagnosticados puede ser una estrategia válida y coste-efectiva **(Bajaj y cols., 2012)**.

En el año 2015, Ampuero y cols publicaron un estudio prospectivo en el que incluyeron 2 cohortes independientes, una cohorte de estimación con 117 pacientes cirróticos y una cohorte de validación de 114 pacientes también cirróticos con un periodo de seguimiento de 5 ± 2.8 años y 4.4 ± 3.9 años respectivamente. En la cohorte de estimación encontraron que una FCP (usada para detectar EHM) inferior a 39 Hz se relacionaba con una tasa de supervivencia inferior a la de los pacientes con $FCP \geq 39$ Hz (68,6% vs. 82%: log-rank, 5.073; $p=0.024$), ocurriendo lo mismo en la cohorte de validación (57,4% vs.70%: log-rank, 4.752; $p=0.029$). Concluyendo, por tanto, que la EHM se asociaba a una disminución en la tasa de supervivencia de los pacientes cirróticos, pudiendo ayudar el resultado de la prueba de la FCP a determinar el

pronóstico de los pacientes cirróticos (**Ampuero J y cols., 2015**). Tres años más tarde, en el 2018, estos mismos autores publicaron un estudio multicéntrico, prospectivo, en el que incluyeron 320 pacientes cirróticos seguidos durante un periodo de 5 años. En dicho estudio, los pacientes que desarrollaron EHM tuvieron una progresión mayor de la cirrosis (64,9% vs. 31,9%: log-rank 29.952; p= 0.0001) (**Ampuero J y cols., 2018**).

1.2.8.2- Diagnóstico.

Como cualquier diagnóstico clínico debe comenzar con una historia clínica minuciosa y detallada en el que se debe hacer énfasis en el examen y búsqueda de cambios sutiles en la vida diaria, como una disminución del nivel de energía, alteraciones en el ciclo vigilia-sueño, deterioro cognitivo, estado de conciencia o de la función motora. El examen neurológico generalmente es normal, los nervios craneales son normales, aunque la disartria e hipomimia pueden estar presentes. Suele ser necesario el examen minucioso para observar movimientos anormales como tremor o asterixis. Algunas alteraciones sutiles se pueden observar en el examen motor: incremento del tono muscular, reducción de la velocidad de respuesta, movimientos alternantes torpes, ataxia, incremento de los reflejos tendinosos profundos y disminución de los reflejos posturales. Para llegar al diagnóstico de EH es necesario un examen neurológico exhaustivo que valore la conciencia, la orientación, función cognitiva, así como la función motora y sensitiva de forma conjunta con el conocimiento de los antecedentes del paciente. Es importante, también, de forma previa, descartar la presencia de enfermedades neurológicas asociadas. En cuanto a los síntomas extrapiramidales, los pacientes con cirrosis desarrollan alteraciones de los movimientos disdiadococinéticos, los cuales incrementan su severidad conforme aumenta el grado de encefalopatía (**Jover R y cols., 2003**). Dicha anomalía

comprende una reducción en la frecuencia máxima disdiadococinética, la cual no es debida a una reducción en la velocidad de los movimientos, sino a un retraso en la dirección de cambio de los movimientos (**Joebges y cols., 2003**).

Son varios los métodos utilizados para diagnosticar la EHM. En principio, cualquier técnica que demuestre alteración del sistema nervioso central que pueda ser atribuida al fallo hepático se puede considerar útil y válida (**Ortiz M y cols., 2005**). En la actualidad, el diagnóstico de EHM se basa en la presencia de deterioro neurológico demostrado tanto por pruebas neuropsicológicas como por neurofisiológicas (**Ortiz M y cols., 2005**).

La evaluación neuropsicológica consiste en la aplicación de varios tests que permiten cuantificar la función cerebral observando el comportamiento (**Lezak MD, 1994**). Entre ellas cabe destacar las pruebas neuropsicométricas (PHES) y la frecuencia crítica del parpadeo (FCP) (**Ortiz M y cols., 2005; Weissenborn K., 2001**), (**Romero-Gómez M y cols., 2006**), (**Kircheis G, y cols., 2002**). Actualmente se acepta que la realización de estos tests representa la mejor opción porque exploran gran parte del espectro de las alteraciones, son fáciles de realizar, no precisan personal especializado, se ven poco influidos por la repetición y tienen bajo coste. En Europa se recomienda el uso del PHES, al cual se le concede un alto grado de evidencia (A) para el diagnóstico de encefalopatía hepática mínima (**Radolph CH y cols., 2009**).

No obstante, estas pruebas psicométricas tienen un fuerte componente subjetivo y están poco estandarizadas: sólo algunos estudios emplean un grupo control que este bien caracterizado en base a la edad, sexo, educación, nivel de estudios (**Weissenborn y cols., 1998**), y consumo de alcohol. Además, aunque el porcentaje es muy bajo, algunos pacientes sufren del efecto aprendizaje por repetición de las mismas. Este hecho ha

provocado que se hayan diseñado tablas de normalidad para las diferentes poblaciones y que los tests se corrijan por edad y nivel de estudios (**Romero-Gómez M, y col., 2006**).

Entre las pruebas neurofisiológicas cabe destacar el electroencefalograma y los potenciales evocados (**Loguercio C y cols., 1984; Weissenborn K y cols., 1990; Quero JC y cols., 1996**). Su uso aporta una cierta objetividad, aunque presentan problemas metodológicos, son poco accesibles, requieren aparataje sofisticado y un análisis posterior complejo y presentan una menor sensibilidad diagnóstica que los tests psicométricos.

A) Pruebas Neuropsicométricas (PHES)

Consiste en una batería de test psicométricos diseñada específicamente para el diagnóstico de la EHM y que ha resultado ser de una alta utilidad (**Ortiz M, y cols., 2005; Weissenborn K., 2001; Romero-Gómez M y cols., 2006**). Se puede realizar en poco tiempo, unos 15-20 minutos aproximadamente, y la interpretación permite distinguir con facilidad entre pacientes con y sin EHM (punto de corte de - 4) (**Córdoba J., 2011; Romero-Gómez M y cols., 2007**).

Los tests psicométricos que componen el PHES son (**Figura 9**):

- Test de Conexión Numérica (TCN) A y B.
- Test de Símbolos y Números.
- Test de Serie de Puntos.
- Test de Trazado de Líneas.

El Test de Conexión Numérica evalúa las habilidades cognitivas motrices, el Test de Símbolos y Números mide la rapidez y precisión motriz, el Test de Serie de Puntos y el Test de Trazado de Líneas analizan la capacidad visual, espacial y la función motora. Por tanto, el PHES puede ser utilizado para detectar la mayoría de las alteraciones neuropsicológicas que se relacionan con la EHM ya que evalúa la

velocidad y precisión del movimiento, la percepción visual, la orientación espacial, la concentración, la atención y la memoria (Seo y cols., 2012).

En principio con las técnicas psicométricas que exploran la atención y la habilidad motora fina sería suficiente para el cribado de EHM.

Estas pruebas psicométricas han sido validadas en controles sanos y cirróticos con y sin encefalopatía hepática. Tras realizar las pruebas se calcula la desviación de cada resultado de forma que por cada desviación estándar se le aplica un punto, que puede ser negativo o positivo según la desviación sea hacia una más correcta o incorrecta realización. Cada paciente puede obtener una calificación entre -15 y +3.

Los pacientes con EH presentan una puntuación igual o inferior a -5 puntos mientras que los pacientes sin EHM presentan más de -3 puntos. Así, el límite para definir EH incipiente estaría en -4 puntos (Weissenborn K, y cols, 2001).

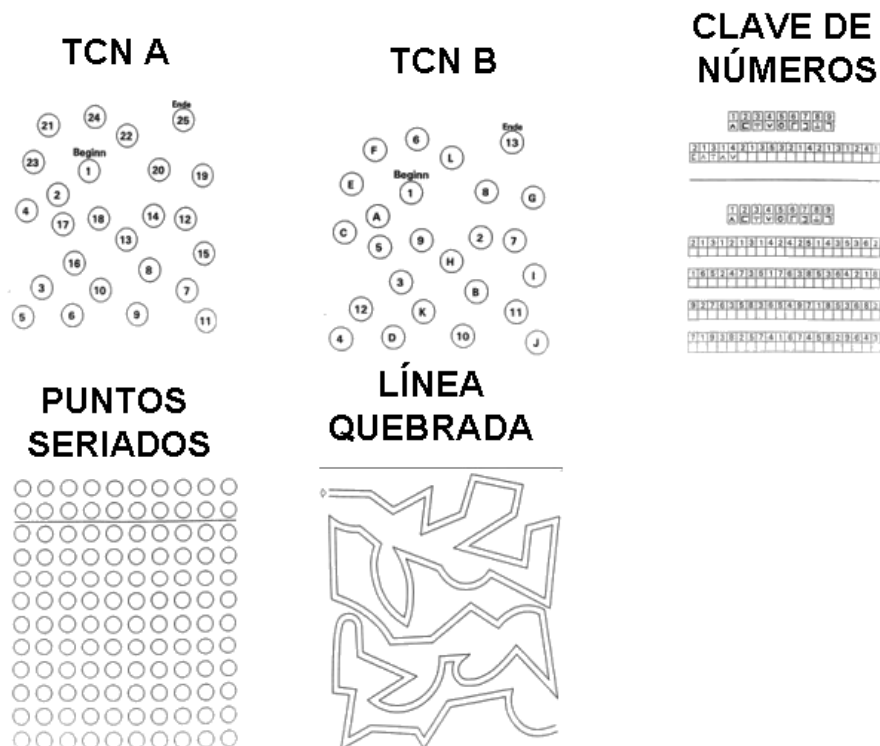


Figura 9.- Tests que componen la Escala Psicométrica de la EH.

B) Pruebas Neurofisiológicas.

La Frecuencia Crítica del Parpadeo (FCP) (Critical Flicker Frequency, Hepatonorm™ Analyzer: R&R Medi-Business Freiburg GmbH, Freiburg, Germany) consiste en colocar un aparato en el campo visual (unas gafas cerradas) del paciente que observa una luz parpadeante a una frecuencia muy alta (60 Hz) y que es percibida como fija, sin que el paciente sea capaz de distinguir el parpadeo (**Figura 10**). De forma progresiva disminuye la frecuencia de parpadeo con lo que llega un momento en que esta luz pasa a percibirse de manera intermitente. En ese momento el paciente debe presionar el interruptor y el dispositivo registra la frecuencia a la que se percibe que la luz empieza a parpadear. Una frecuencia inferior a 39 Hz es indicativa de EHM, lo que indicaría que estos pacientes por su déficit de atención y capacidad de reacción, perciben y registran la intermitencia de la luz a frecuencias más bajas que los pacientes sin enfermedad (**Ortiz M, y cols., 2005; Romero-Gómez y cols, 2007; Kircheis G, y cols., 2002**). Además, la FCP desciende conforme se agrava la encefalopatía hepática.

El fundamento de esta técnica es que las células de la retina muestran una alteración similar (edema) a los astrocitos cerebrales.



Figura 10: Equipo para la realización de la FCP.

Las ventajas del uso de esta herramienta radican en que es un método simple, que en la práctica clínica no requiere más de 5-10 minutos, es exacto y seguro para el diagnóstico de la EHM, no está influenciado por la educación, no presenta fenómeno de aprendizaje y puede predecir el desarrollo de episodios de EH (**Romero-Gomez y cols., 2007**).

La concordancia entre la FCP y los PHES no es absoluta y la tercera parte de los pacientes presentan alteradas solamente una de las pruebas. La FCP alterada predice de forma independiente el riesgo de encefalopatía hepática clínica y junto con la prueba de sobrecarga oral de glutamina pueden definir el pronóstico y supervivencia de los cirróticos (**Romero-Gomez y cols., 2007**).

Los Potenciales Evocados (PE) son señales eléctricas registradas por electrodos extracelulares generadas tras la estimulación adecuada de tejidos excitables. Existen tres modos de estimulación exógena, potenciales evocados visuales, potenciales evocados auditivos de tronco y potenciales evocados somatosensitivos, y un modo de estimulación endógena que detecta potenciales retardados (onda P300) auditivos y visuales.

El Electroencefalograma (EEG) se ha utilizado para valorar el grado de EH. En el análisis del registro se valora cual es el porcentaje de actividad theta dominante. Presenta una escasa sensibilidad. En un grupo de pacientes cirróticos sometidos a derivación portosistémica se detectaron alteraciones en el EEG en el 30% de los pacientes mientras que en el 60% de los pacientes se detecto alguna PP alterada (**Quero y cols., 1996**). Está sujeta a subjetividad por parte del profesional que lo analice. El análisis espectral del EEG mediante técnicas computarizadas (**Amodio y cols., 1998**) incluye la cuantificación de la frecuencia media dominante y la potencia de un

determinado ritmo, reduce la subjetividad en la interpretación del EEG con una disminución en la variabilidad interobservador.

De manera general se acepta que los potenciales evocados somatosensoriales y los potenciales endógenos son las pruebas neuropsicológicas más objetivas para el diagnóstico de EHM (**Kullmann y cols., 1995**). En 1990 Yen y col., realizaron un estudio prospectivo donde se incluyeron 44 pacientes con cirrosis descompensada. El 93% de los pacientes que presentaron potenciales evocados somatosensoriales alterados desarrollaron con posterioridad EH frente al 70% de los pacientes con NCT alterado, lo que sugiere que los potenciales evocados son más específicos, con un valor predictivo positivo superior, pero menos sensible. De este modo, los pacientes con alteración de alguna PP deben ser diagnosticados de EHM, y en los pacientes que presenten resultados normales es necesario continuar el estudio mediante otras pruebas de potenciales evocados somatosensoriales, auditivos o endógenos (P300).

C) Otros biomarcadores periféricos.

Recientemente ha sido descubierto un biomarcador periférico que es un buen indicador de presencia de EHM: la 3-nitrotirosina. En un estudio realizado en el año 2011 por Montoliú y col., este biomarcador mostró una sensibilidad del 89%, una especificidad del 93% y un valor predictivo positivo y negativo del 91%, observándose un importante aumento en sus valores en individuos con EHM (**Montoliu y cols., 2011**).

1.2.9.- Tratamiento de la EH.

Debido a la falta de homogeneidad en la presentación del cuadro de EH en los distintos pacientes y de los numerosos factores que pueden desencadenarla, no existen evidencias definitivas sobre la efectividad de la mayoría de las medidas terapéuticas que se proponen. No obstante, se acepta que hay tres medidas esenciales:

- a) Identificar y eliminar, si es posible, el factor o factores desencadenantes.
- b) Reducir la tasa de amonio en sangre.
- c) Mantener y/o mejorar el estado nutricional y la volemia del paciente.

1.2.9.1.- Tratamiento de soporte

El pronóstico del paciente con cirrosis se relaciona con el estado nutricional y es frecuente el deterioro de dicho estado en las fases avanzadas de la enfermedad. Además, durante el episodio de EH la misma clínica implica dificultades para la alimentación adecuada e incrementa el déficit. Aunque, tradicionalmente, se indicaba la disminución e incluso eliminación de las proteínas de la dieta, los últimos estudios han demostrado que la dieta hipoproteica no mejora la evolución de la EH. La reducción o eliminación sólo sería aceptable en aquellos casos con buen estado nutricional, sintomatología leve motivada por el aumento de la ingestión de proteínas o de hemorragia digestiva inactiva que sólo precise limpieza intestinal para su resolución, y no debe durar más de un día. Se recomienda que los pacientes reciban un aporte calórico adecuado con 1-1.5 g/kg/día de proteínas, sobre todo proteínas de origen lácteas o vegetal. Preferiblemente se debe utilizar la vía oral. La aportación de proteínas se realiza mediante mezclas de aminoácidos con alta proporción de ramificados. Los suplementos con zinc pueden coadyuvar a la mejoría del estado de nutrición.

Además de la nutrición, se deben establecer una serie de medidas generales en las que se incluyan control y vigilancia de la hidratación, aspiración de secreciones,

protección de la vía aérea y tratamiento de infecciones concomitantes (**Maharshi S y cols., 2016**).

1.2.9.2.- Tratamiento de los factores desencadenantes o etiológicos.

Identificar los factores desencadenantes es importante por dos motivos. Por un lado, los síntomas de la EH no van a mejorar hasta resolver la causa que la ha provocado. Por otro lado, ante la presencia del cuadro de EH se debe sospechar una complicación grave subyacente que permanece enmascarada por el propio cuadro de la encefalopatía (deterioro de conciencia...).

El mecanismo por el que estos factores provocan la EH puede ser debido a un aumento de la respuesta inflamatoria sistémica, un aumento de la producción de amonio o una disminución del umbral del estado mental, aunque en la mayoría de las ocasiones pueden coexistir distintos mecanismos.

Son muchos los factores desencadenantes descritos, aunque el 90% de los casos de EH se asocian con la hemorragia gastrointestinal, la presencia de infecciones y el uso de diuréticos.

Los fármacos mas utilizados actualmente en la EH son los siguientes:

A) Disacáridos no absorbibles.

Los disacáridos no absorbibles (lactulosa y lactitol) producen una aceleración del tránsito, modificación de la flora y descenso del pH local, lo que inhibe la síntesis y la difusión del amonio.

Actualmente se considera la piedra angular en el tratamiento de la EH.

B) Antibióticos.

La rifaximina presenta un gran espectro de cobertura antimicrobiana (gérmenes gram positivos y negativos y aerobios y anaerobios). Es un antibiótico seguro, que tiene un bajo riesgo de desarrollar resistencias y una absorción intestinal mínima. Su uso es

efectivo tanto en los episodios agudos como en sus recurrencias. Su uso ha demostrado disminuir significativamente el número de episodios de EH, el número de ingresos hospitalarios y/o su duración (**Lawrence y col., 2008 y Bass y col., 2010**).

C) L-Ornitina L-Aspartato (LOLA).

Actúa activando la degradación de amonio produciendo urea y glutamina. La L-ornitina activa la enzima carbamoil-fosfato sintetasa necesaria para la síntesis de urea. Su administración aumenta la detoxificación de amonio en el cerebro y los músculos debido a que incrementa la producción de glutamina. Se ha comprobado que mejora en los estadios 1-2 pero no en la EHM. Amodio y Ampuero han publicado en el 2018 un artículo en el que basándose en un artículo del mismo año de Sidhu y cols concluyen que su uso no estaría indicado en aquellos casos en los que el mecanismo principal de patogenesis de EH fuera la inflamación y que en aquellos casos con hiperamoniemia puede ser usado (en dosis y duración adecuados: 30g-4 días) en monoterapia o asociada a otros tratamientos (como lactulosa).

D) L- Ornitina fenilacetato.

Fármaco con un doble mecanismo de acción. La L-ornitina estimula la síntesis de glutamina en el músculo a expensas de amoniaco. El fenilacetato excreta la glutamina por la orina.

1.3.- SOBRECARGA ORAL DE GLUTAMINA

La Sobrecarga Oral de Glutamina (SOG) es una prueba pronóstica de EH y de mortalidad en pacientes con EHM que consiste en la administración de glutamina (por lo general 10 gramos de L-glutamina) tras la cual se produce un ascenso del nivel de amonio a nivel sistémico alcanzando su máximo entre los 30-60 minutos después de la sobrecarga, declinando con posterioridad. Este periodo de tiempo sugiere que el aumento de amoniaco en sangre es debido al metabolismo de la glutamina en el intestino delgado. La situación que se simula es similar a la que se produce después de una ingesta de proteína. La prueba se realiza por la mañana, tras el ayuno de toda la noche anterior.

En 1997 Oppong y cols publicaron un trabajo en el que estudiaron 17 pacientes cirróticos con mala función hepática, antes y después del trasplante hepático, y 4 controles sanos. Previo al trasplante encontraron una intensa hiperamoniemia tras la sobrecarga oral de glutamina (no encontrándose diferencias entre la administración entre 10 gramos de glutamina vs. 20 gramos de la misma), con un incremento significativo en los valores (58 $\mu\text{mol/L}$ vs 120 $\mu\text{mol/L}$; $p < 0.01$). Tras el trasplante hepático, y consiguiente normalización de la función hepática, no se encontró variación en la sobrecarga que se realizó (32 $\mu\text{mol/L}$ vs. 39 $\mu\text{mol/L}$). En los controles sanos tampoco se encontró cambio (23 $\mu\text{mol/L}$ vs. 30 $\mu\text{mol/L}$).

En el año 2002, Romero-Gómez y cols utilizaron la respuesta a la SOG y la EHM (diagnosticada por pruebas neuropsicológicas) para predecir el desarrollo de EH. Para ello, utilizaron 70 pacientes cirróticos con una media de edad de 54 ± 8 años y 10 sujetos sanos. La SOG se consideró patológica cuando el valor de amonio fue igual o superior a 128 mg/dL a los 60 minutos después de la sobrecarga (ROC: Sensibilidad

89%; Especificidad 61%). Los pacientes con EHM y SOG alterada presentaron un riesgo significativamente mayor de presentar EH en el seguimiento (60%), frente a aquellos pacientes sin EHM y SOG normal (2,8%) (Log rank test=21.60; $p < 0.0001$). Con estos resultados concluyeron que una SOG patológica en pacientes con EHM podría ser utilizada como factor pronóstico para el desarrollo de EH, mientras que una respuesta normal a la SOG en pacientes sin EHM podría excluir el desarrollo de EH. Sin embargo, en 20 de los 56 pacientes sin EHM sí tuvieron una SOG alterada, lo que mostraba que esta prueba no parecería ser útil para el diagnóstico de EHM. Dos años más tarde (2004), este mismo grupo de investigadores publicaron un trabajo prospectivo en el que incluyeron un total de 85 individuos (49 pacientes cirróticos y 36 controles sanos) en el que evaluaron la actividad de la glutaminasa intestinal. Ésta tuvo valores cuatro veces más altos en pacientes cirróticos que en sujetos sanos, estando así mismo aumentada en los pacientes con EHM. La actividad glutaminasa en pacientes con SOG alterada y EHM también era mayor en comparación con aquellos sin EHM o con SOG normal. En los pacientes cirróticos la actividad de la glutaminasa también estaba incrementada correlacionando con el grado de EHM. Concluyeron, pues, que la actividad de la glutaminasa se relacionaba fuertemente con la EHM así como con los resultados de los tests psicométricos

Romero-Gómez y cols en el año 2004 estudiaron la supervivencia (tiempo medio de seguimiento 25.2 meses) de los pacientes con cirrosis que tenían una SOG alterada y EHM. La supervivencia de los pacientes que desarrollaron EH clínica fue del 59% en el primer año y del 38% a los 3 años. En los pacientes sin EH la supervivencia fue del 96% el primer año y del 86% a los tres años. La presencia de EHM no se relacionó con la supervivencia. Una respuesta a la SOG alterada en pacientes con EHM se asoció con un descenso de la tasa de supervivencia del 80% en el primer año al 39%

a los tres años. Los pacientes con EHM y SOG alterada tenían un riesgo de mortalidad elevado (R:5.5; IC del 95% 1.81-16.6). Con estos resultados, concluyeron que una respuesta alterada a la SOG en pacientes con EHM parecía estar asociada a una menor tasa de supervivencia y podría ser útil para seleccionar a pacientes candidatos a trasplante hepático. **(Romero Gómez y cols., 2004).**

2.- HIPÓTESIS.

La respuesta a la Sobrecarga Oral de Glutamina se ha postulado como un factor pronóstico en el desarrollo de Encefalopatía Hepática en los pacientes cirróticos. La interpretación actual de la prueba de la SOG tan sólo tiene en cuenta el valor a los 60 minutos tras la ingesta de glutamina. Sin embargo, existen diferencias entre los distintos pacientes no sólo en estos valores sino también en los valores basales de amonio. Por tanto, la interpretación de la SOG se puede mejorar teniendo en cuenta una definición más amplia de la misma, que incluya tanto el valor a los 60 minutos como el valor basal así como la diferencia entre ambos. Además, la respuesta a la SOG puede determinar la existencia de diferentes tipos de EH.

Por otro lado, la respuesta a la Sobrecarga Oral de Glutamina puede estar influenciada por distintos factores cuya identificación permitiría optimizar el manejo clínico de estos pacientes.

3.- OBJETIVOS.

3.1.- Objetivo Principal.

Reinterpretar la definición actual de la SOG, mejorando el rendimiento de la misma para predecir Encefalopatía Hepática.

3.2.- Objetivos Secundarios.

1º) Definir el tipo de Encefalopatía Hepática (mecanismos inflamatorios vs. alteración de la función hepática) en función de la respuesta a la Sobrecarga Oral de Glutamina.

2º) Identificar los factores que pueden influir en la respuesta del paciente a la Sobrecarga Oral de Glutamina.

4.- MATERIAL Y MÉTODOS

4.1.- Selección de Pacientes.

Se consideraron pacientes susceptibles de entrar en el estudio a todos aquellos diagnosticados de Cirrosis Hepática y seguidos en las Consultas Externas de Digestivo del Hospital de Valme. Tras informar a los pacientes, se obtuvo el consentimiento informado, por escrito, de todos ellos antes de entrar en el estudio. El proyecto fue aprobado por el Comité Ético del Hospital.

Se reclutaron un total de 256 pacientes entre Septiembre de 1999 y Octubre del 2016 a los que se le realizó seguimiento en la Consulta Externa de Digestivo cada seis meses, durante un periodo de 17 años. El tiempo de seguimiento máximo de los pacientes fue de 6 años.

Los **Criterios de inclusión** en el estudio fueron los siguientes:

- a) Pacientes mayores de edad (mayor de 18 años).
- b) Diagnóstico de Cirrosis Hepática: el diagnóstico de cirrosis hepática se estableció por los datos aportados por la biopsia hepática, los estudios ecográficos y endoscópicos y por los parámetros bioquímicos. La función hepática se evaluó siguiendo las escalas de MELD y Child-Pugh.
- c) Aceptación y firma del consentimiento informado.

Los **Criterios de exclusión** fueron los siguientes:

- a) Edad menor o igual a 18 años.
- b) Diagnóstico de Carcinoma Hepatocelular previo.
- c) Pacientes en tratamiento activo con antiretrovirales.
- d) Trasplante Hepático previo.
- e) TIPS previo.
- f) Historia reciente de abuso de alcohol (< 3 meses).
- g) Infección activa en el momento del reclutamiento.
- h) Toma de antibióticos recientes (< 6 semanas).
- i) Hemorragia digestiva reciente (< 6 semanas).
- j) Toma de benzodiacepinas, antiepilépticos o psicotrópicos reciente (< 6 semanas).

4.1.1.- Tamaño muestral

Para calcular el tamaño muestral nos basamos en los datos publicados en el año 2002 por Romero-Gómez y cols. en el que de los pacientes con SOG normal el 2,7% desarrollaron EH durante el seguimiento frente al los que tenían la SOG alterada que fue del 25%. El tiempo medio de seguimiento en ambos casos fue de un año. Con estos datos el tamaño muestral mínimo para encontrar diferencias significativas fue de 43 pacientes en cada grupo, con un nivel de confianza del 95%, una potencia del 80% y una pérdida de seguimiento del 15%. El tamaño muestral se obtuvo con el programa nQuery Advisor.

4.2.- Diseño de la Base de Datos.

En primer lugar, se diseñó una base de datos con todos los ítems que nos permitiera disponer de una información completa de los pacientes. A continuación, se revisó minuciosamente la historia clínica de todos los pacientes, registrándose las siguientes variables:

- Identificación del paciente: NUHSA (Número Único de Historia de Salud de Andalucía), Número de historia clínica.
- Datos demográficos: Fecha de nacimiento, Edad, Género (Masculino/Femenino).
- Fecha de inicio del estudio y Fecha de finalización del mismo.
- Motivo de finalización: Exitus, Trasplante hepático, Pérdida de seguimiento, Encefalopatía Hepática.
- Identificación de las muestras: Número de petición 1 y Fecha de petición 1/ Número de petición 2 y Fecha 2/...
- Éxitus: Si/No. Fecha de Éxitus.
- Cálculo de los índices de función hepática: Child-Pugh y MELD.
- Etiología de la cirrosis (Alcohol, VHB, VHC, Hepatitis Autoinmune, Otros)
- Presencia de otras patologías:
 - Diabetes: Si/No
 - Insuficiencia Renal: Si/No.
 - Hipertensión Arterial: Si/No.

- Episodios de descompensación de la cirrosis:
 - Encefalopatía Hepática previa al estudio: Si/No
 - Encefalopatía Hepática post estudio: Si/No
 - Fecha de la Encefalopatía Hepática post estudio.

- Causa probable de la Encefalopatía: Diuréticos, Infección, Insuficiencia Renal, Hemorragia Digestiva Alta
 - Varices esofágicas: Si/No
 - Hemorragia por varices esofágicas previa al estudio: Si/No
 - Hemorragia por varices esofágicas post estudio Si/No
 - Fecha Hemorragia por varices esofágicas post estudio.
 - Ascitis previa al estudio: Si/No
 - Ascitis post estudio: Si/No
 - Fecha Ascitis post estudio.
 - Peritonitis Bacteriana Espontánea previa al estudio: Si/No
 - Peritonitis Bacteriana Espontánea post estudio: Si/No
 - Fecha Peritonitis Bacteriana Espontánea post estudio.
 - Síndrome Hepatorenal previo al estudio: Si/No
 - Síndrome Hepatorenal post estudio: Si/No.
 - Fecha Síndrome Hepatorenal post estudio.
 - TIPS: Si/No.
 - Fecha TIPS
 - Gastropatía de la Hipertensión Portal: Si/No
 - Fecha Gastropatía de la Hipertensión Portal.

- Hepatocarcinoma post estudio: Si/No
- Fecha del diagnóstico del Hepatocarcinoma.
- Trasplante hepático post estudio: Si/No. Fecha de realización del Trasplante.
 - Valor de los tests Psicométricos (PHES).
 - Valor Frecuencia crítica de parpadeo.
 - Sobrecarga oral de glutamina:
 - Amonio Basal ($\mu\text{g/dL}$)
 - Amonio a los 60 minutos ($\mu\text{g/dL}$)
 - Delta de amonio: Amonio a los 60 minutos – Amonio basal ($\mu\text{g/dL}$)

- Parámetros Bioquímicos de Laboratorio:
 - Glucosa (mg/dL)
 - Insulina (μ U/mL)
 - HOMA (Calculo de Resistencia a la Insulina):(Glucosa * Insulina)/405.
 - AST: Aspartato Amino Transferasa (U/L)
 - ALT: Alanino Amino Transferasa (U/L)
 - ALP: Fosfatasa Alcalina (U/L)
 - GGT: Gamma Glutamil Transpeptidasa (U/L)
 - Colinesterasa (U/L)
 - Bilirrubina Total (mg/dL)
 - Urea (mg/dL)
 - Creatinina (mg/dL)
 - Ácido úrico (mg/dL)
 - Na⁺: Sodio (mEq/L)
 - K⁺: Potasio (mEq/L)
 - Colesterol total (mg/dL)
 - HDL- Colesterol (mg/dL)
 - LDL- Colesterol calculado (mg/dL)
 - Triglicéridos (mg/dL)
 - PCR: Proteina C reactiva (mg/L)
 - Albúmina (g/dL)
 - Ferritina (μ g/L)
 - AFP: Alfa feto proteina (ng/mL)
- Parámetros Hematológicos del Laboratorio
 - Recuento de Leucocitos ($\times 10^9/L$)
 - Hemoglobina (g/dL)
 - Recuento de Plaquetas ($\times 10^9/L$)
 - Estudio de coagulación:
 - Tiempo de protrombina normalizado (INR)

4.3.- Diagnóstico de Encefalopatía Hepática Mínima.

El estudio de EHM se realizó mediante la evaluación de los Tests Psicométricos (PHES) y la Frecuencia Crítica del Parpadeo (FCP).

4.3.1 Tests Psicométricos (PHES)

Antes de comenzar los distintos tests, el personal de enfermería responsable de dicha consulta (examinador) les informa a los pacientes de que estas pruebas son necesarias, que se tratan de pruebas cortas, simples y que requieren un mínimo esfuerzo por parte del paciente. Así mismo, verifica que todo el material necesario para dichas pruebas esté correcto. De forma sistemática se realizan las siguientes comprobaciones:

a) El paciente debe estar cómodamente sentado en una mesa con la iluminación adecuada y con la temperatura de la habitación regulada para que esté lo más confortable posible. Cuando van a comenzar a realizarse las pruebas se cierra con pestillo para evitar interrupciones.

b) En aquellos pacientes que necesiten gafas para leer se aseguran que las lleven puestas y así deben permanecer durante todo el tiempo que estén realizando el test.

c) La hoja que se entregue para realizar el test tiene que ser siempre original y comprobar que esté orientada de forma correcta. Además, se aseguran que la hoja del test esté correctamente iluminada.

d) Utilizar un rotulador Eding 1200. Antes de comenzar, se comprueba que el rotulador escriba y siempre se tiene un rotulador de repuesto a mano.

e) El tiempo se mide utilizando un cronómetro: no se utiliza el reloj de pulsera, ni aunque tenga segundero, para evitar errores de lectura en las medidas del tiempo.

f) Las instrucciones son siempre las mismas. Están escritas y se leen cada vez que se realiza el test (incluso cuando el mismo paciente repita el test). Se leen, palabra por palabra, las instrucciones a los pacientes y se les pregunta si las han comprendido. En caso de no ser así, se repite el proceso volviendo a leer las instrucciones de principio a fin.

g) Una vez comprendidas las instrucciones, se le deja al paciente realizar la columna de entrenamiento. Si se observan errores se informa al paciente inmediatamente hasta

que el personal de enfermería de la consulta está seguro de que pueden realizar el test según las instrucciones precisas. La columna de entrenamiento se realiza incluso cuando el mismo paciente repita el test.

h) Antes de comenzar cada test se rellenan los datos de filiación (Nombre, Edad, Profesión, Nivel de Estudios (este último cuantificado como número de años totales de estudio del paciente)).

Cada paciente realiza los siguientes tests:

- 1.- Test de Símbolos y Números
- 2.- Test de Conexión Numérica A (TCN A)
- 3.- Test de Conexión Numérica B (TCN B)
- 4.- Test de Serie de Puntos (SD)
- 5.- Test de Trazado de líneas (LT)

Test de símbolos y números (Figura 11)

El test consiste en convertir símbolos con forma de figuras geométricas en números a partir de una clave establecida.

TEST DE SÍMBOLOS Y NÚMEROS

NOMBRE: _____ EDAD: _____ PROFESIÓN: _____
 NIVEL DE ESTUDIOS: _____ CONSUMO DE ALCOHOL (gr/d): _____
 HORA: _____ FECHA: _____
 PUNTUACIÓN: _____

Datos demográficos

1	2	3	4	5	6	7	8	9
△	□	◻	▽	○	◻	◻	◻	◻

Instrucciones/Clave: Para rellenar el test

→

2	1	3	1	4	2	1	3	5	3	2	1	4	2	1	3	1	2	4	1
□	△	◻	△	△	▽														

Fila entrenamiento: Sin cronometrar tiempo. Resolviendo dudas y corrigiendo fallos.

1	2	3	4	5	6	7	8	9
△	□	◻	▽	○	◻	◻	◻	◻

2	1	3	1	2	1	3	1	4	2	4	2	5	1	4	3	5	3	6	2

1	6	5	2	4	7	3	5	1	7	6	3	8	5	3	6	4	2	1	8

Test: Debe rellenarse de forma consecutiva, lo más rápido posible.

9	2	7	6	3	5	8	3	6	5	4	9	7	1	8	5	8	6	8	2

7	1	9	3	8	2	5	7	4	1	6	7	4	5	8	2	9	6	4	3

Figura 11: Test de símbolos y números

Test de Conexión Numérica A (TCN A) (Figuras 12-13).

En esta prueba los pacientes deben conectar, lo más rápidamente posible, los números impresos en el papel sucesivamente del 1 al 25.

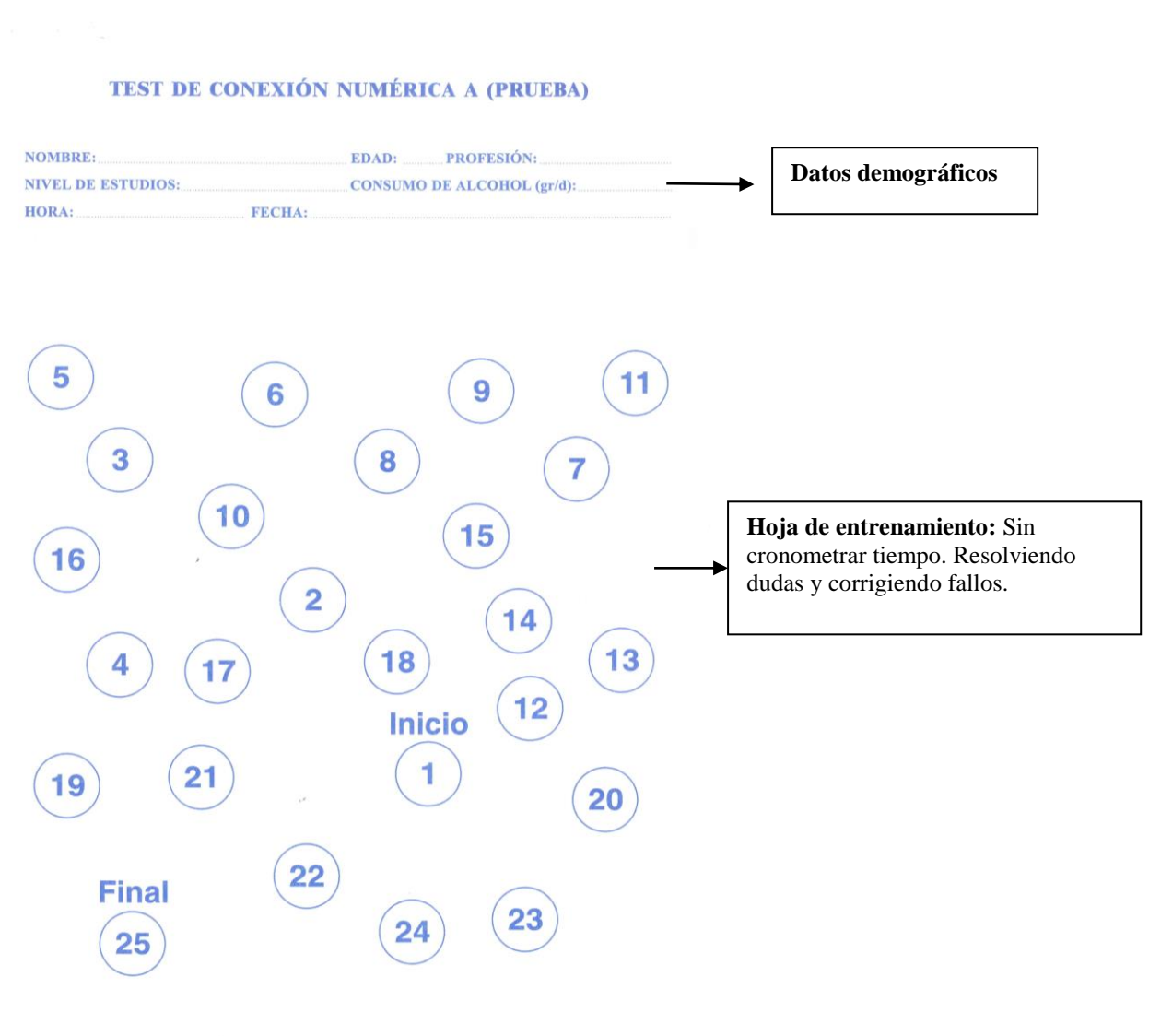


Figura 12: Test de conexión numérica A (Prueba).

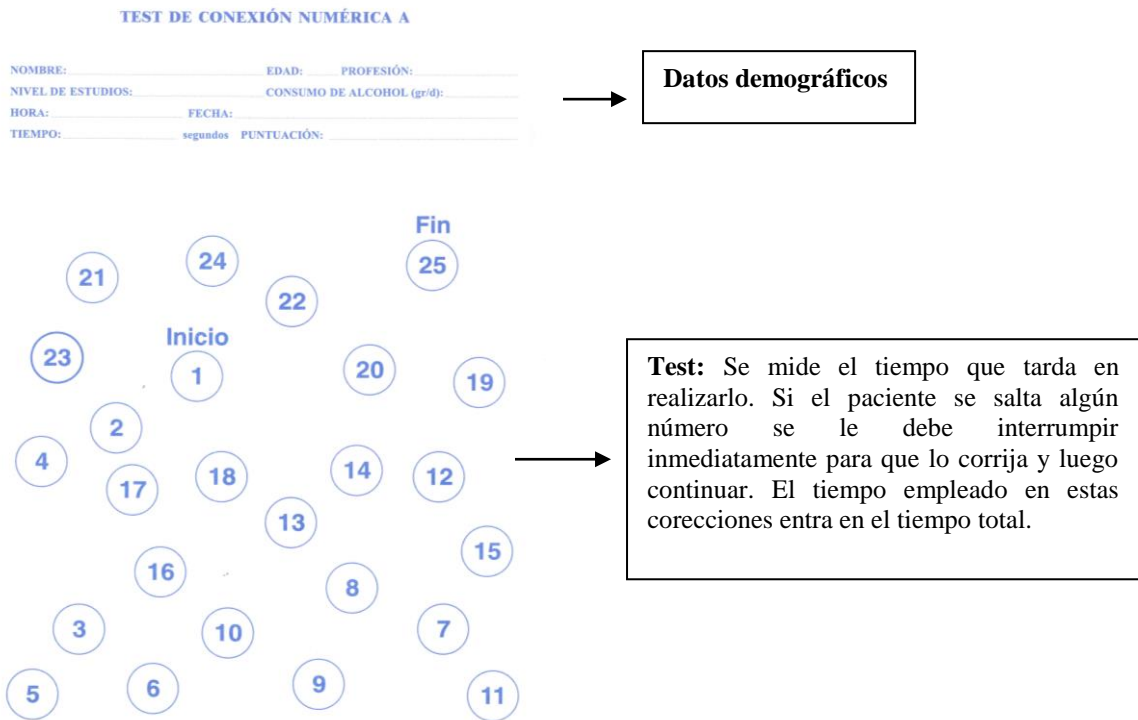


Figura 13: Test de conexión numérica A.

Test de Conexión Numérica B (TCN B) (Figura 14).

En esta prueba el paciente deberá conectar números y letras alternándolos (verá los números del 1 al 13, y las letras de la A a la L. Tendrá que conectar números y letras alternándolos: esto es, del 1 a la A, del 2 a la B y así hasta el final (del 13 a la L)).

Este test deberá ser realizado inmediatamente después del TCN A. No requiere demostración previa (pre-test).

TEST DE CONEXIÓN NUMÉRICA B

NOMBRE: _____ EDAD: _____ PROFESIÓN: _____
 NIVEL DE ESTUDIOS: _____ CONSUMO DE ALCOHOL (gr/d): _____
 HORA: _____ FECHA: _____
 TIEMPO: _____ segundos PUNTUACIÓN: _____

Datos demográficos

Test: Los números en distinto orden con respecto a la prueba. Se mide el tiempo que tarda en realizarlo. Si el paciente se salta algún número se le debe interrumpir inmediatamente para que lo corrija y luego continuar. El tiempo empleado en estas correcciones entra en el tiempo total.

Figura 14: Test de conexión numérica B.

Test de Serie de Puntos/ Puntos Seriados (SD) (Figura 15).

En una hoja con 10 filas de círculos, el paciente ha de puntear en el centro de cada círculo y completar la hoja en el menor tiempo posible.

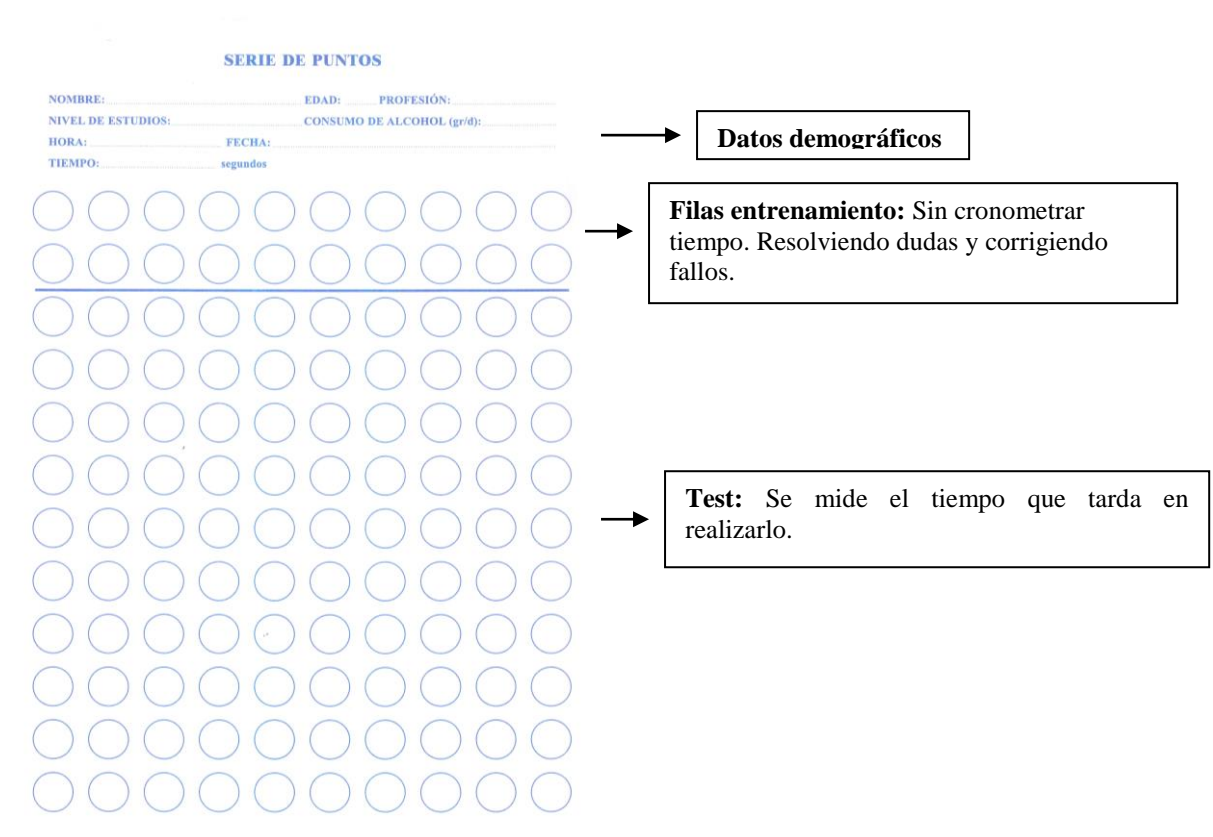


Figura 15: Test de serie de puntos.

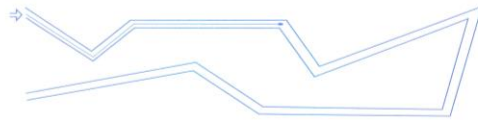
Test de Trazado de Líneas/ Línea Quebrada (LT) (Figura 16).

En esta prueba el paciente ha de dibujar una línea continua entre las dos líneas dadas sin tocar ni cruzar las líneas pintadas (penalización).

TEST DE LA LÍNEA QUEBRADA (PRUEBA)

NOMBRE: _____ EDAD: _____ PROFESIÓN: _____
 NIVEL DE ESTUDIOS: _____ CONSUMO DE ALCOHOL (gr/d): _____
 HORA: _____ FECHA: _____

Datos demográficos

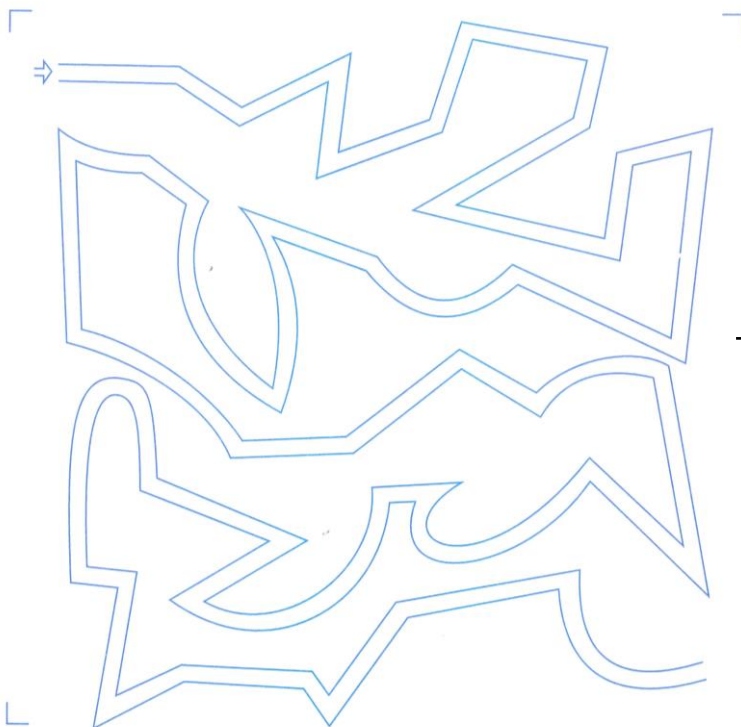


Hoja de entrenamiento: Sin cronometrar tiempo. Resolviendo dudas y corrigiendo fallos.

TEST DE LA LÍNEA QUEBRADA

NOMBRE: _____ EDAD: _____ PROFESIÓN: _____
 NIVEL DE ESTUDIOS: _____ CONSUMO DE ALCOHOL (gr/d): _____
 HORA: _____ FECHA: _____
 TIEMPO: _____ segundos PUNTUACIÓN: _____

Datos demográficos



Test: Se mide el tiempo que tarda en realizarlo. Es importante cometer pocos errores y permanecer entre las líneas dibujadas.

Figura 16: Test de la línea quebrada (Prueba) en la parte superior y Test de la línea quebrada en la parte inferior

Evaluación de los Tests Psicométricos

La Red Temática de Encefalopatía realizó una validación de estos tests en la población española, publicando tablas de normalidad que están disponibles de forma gratuita en <http://www.redeh.org> (Figura 17). Un resultado inferior a -4 es diagnóstico de Encefalopatía Hepática Mínima (Weissenborn K, y cols, 2001).

RedEH

DIAGNÓSTICO DE ENCEFALOPATÍA HEPÁTICA MÍNIMA MEDIANTE TEST PSICOMÉTRICOS (PHES)

Español

English

TCN A TCN B CLAVE DE NÚMEROS

PUNTOS SERIADOS LÍNEA QUEBRADA

PSYCHOMETRIC HEPATIC ENCEPHALOPATHY SCORE

Datos de Paciente Resultados de los Test

Edad Test de la clave de números (2)

Estudios (1) Test de conexión numérica-A (3)

Test de conexión numérica-B (3)

Test de puntos seriados (3)

Test de la línea quebrada (4)

calcular

Instrucciones para cumplimentar los tests

(1) -> Se introducirán los años de escolarización del paciente
(2) -> Se introducirá el número de aciertos
(3) -> Se introducirá el número de segundos empleados en el test
(4) -> Se introducirá el número de errores mas los segundos empleados

Figura 17.- Página de Red Temática de Encefalopatía para calculo de riesgo

Test de Símbolos y Números: Se cuenta el número de símbolos correctos. Los símbolos muy deformados, así como rotados o símbolos en espejo no se cuentan, ya que son símbolos que no corresponden a los números. El número total de símbolos correctos se transfieren a la hoja de evaluación y se transforma en un valor usando la tabla de valores normales disponible en la plataforma

Test de Conexión Numérica A (TCN A): El tiempo total medido redondeado en segundos se transfiere a la hoja de evaluación y se transforma en un valor correspondiente a la tabla de valores normales al introducir los valores en la plataforma ya mencionada.

Test de Conexión Numérica B (TCN B): El tiempo total medido redondeado en segundos se transfiere a la hoja de evaluación y se transforma en un valor correspondiente a la tabla de valores normales.

Test de Serie de Puntos: El tiempo medido en segundos se transfiere a la hoja de evaluación y se transforma en un valor de acuerdo con la tabla de valores normales.

Test de Trazado Lineal: Se tiene en cuenta por un lado el tiempo medio (redondeado en segundos) y por otro lado el número de errores. Para contar y medir los errores, la hoja de corrección se coloca sobre la hoja de test, de tal modo que ambas concuerden exactamente. Cada contacto y/o cruce con la línea limitante cuenta como error. Los errores se miden de forma separada para cada sección de la plantilla. La evaluación sería del siguiente modo:

Sin error: La línea dibujada por el paciente queda entre las líneas limitantes y no toca ninguna de éstas.

Error (1 punto): La línea es tocada, pero no cruzada.

Error (2 puntos): La línea es cruzada, pero no se cruza la línea externa de la plantilla.

Error (3 puntos): Se cruza la línea externa de la plantilla.

4.3.2.-Frecuencia Crítica de Parpadeo.

Al igual que la batería de test psicométricos esta prueba es realizada en la Consulta de Enfermería con las mismas condiciones de confortabilidad ya descritas y por personal titulado y ampliamente experimentado.

La prueba se realiza con unas gafas cerradas que emiten una luz que parpadea a una frecuencia elevada, de tal manera que el paciente percibe un foco de luz constante. De forma progresiva, la frecuencia de parpadeo disminuye, con lo que la luz pasa a percibirse como una luz intermitente. El paciente tiene que avisar en el momento que la luz pasa de ser continua a intermitente.

Antes de empezar la prueba, el paciente realiza 5 mediciones de prueba y a partir de ese momento se realizan diez mediciones. El resultado final es la media de estas diez mediciones.

Si el resultado es inferior a 39 Hz, se considera que el paciente puede presentar síntomas de Encefalopatía Hepática Míxima (**Kircheis G, y cols, 2002**).

4.4.- Marcadores genéticos.

4.4.1.-Extracción de la muestra.

Se obtuvo muestra de sangre venosa periférica en tubos estériles con EDTA como anticoagulante para el estudio genético, previa firma del consentimiento informado por parte del paciente para realizar dicho estudio. Las muestras se conservaron a -20°C hasta el momento de la extracción de ADN.

4.4.2.-Extracción de ADN.

La extracción de ADN se realizó de forma automatizada en el MagNA Pure Compact (Roche Diagnostics) utilizando Kit comerciales de extracción (Roche Diagnostics) siguiendo las indicaciones del fabricante.

La calidad del ADN se cuantificó en el espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific).

Las muestras se conservaron a -20°C hasta su utilización.

4.4.3.- Análisis del Gen de la Glutaminasa.

El gen de la glutaminasa (OMIM: 138280) está localizado en el brazo largo del cromosoma 2 en la región 2q32-q34 y está constituido por 18 exones y 17 intrones.

Hay 162 SNPs incluidos en la base de datos de GenBank, de los cuales 9 se encuentran en regiones codificantes del gen y tan sólo 2 provocan cambios de aminoácidos.

Basándonos en los datos previos publicados realizamos el genotipado de los SNPs por PCR a tiempo real utilizando ensayos Taqman en el equipo LightCycler 480 (Roche Diagnostics). Cada uno de los cuatro ensayos para el haplotipo TACC se realizó con una pareja de cebadores y una sonda marcada con VIC en el extremo 5' y con FAM en el extremo 3'. Los resultados se obtuvieron tras el análisis de las curvas de fluorescencia proporcionadas por el propio software del LyghtCycler 480 (Roche Diagnostics). **(Figura 18)**

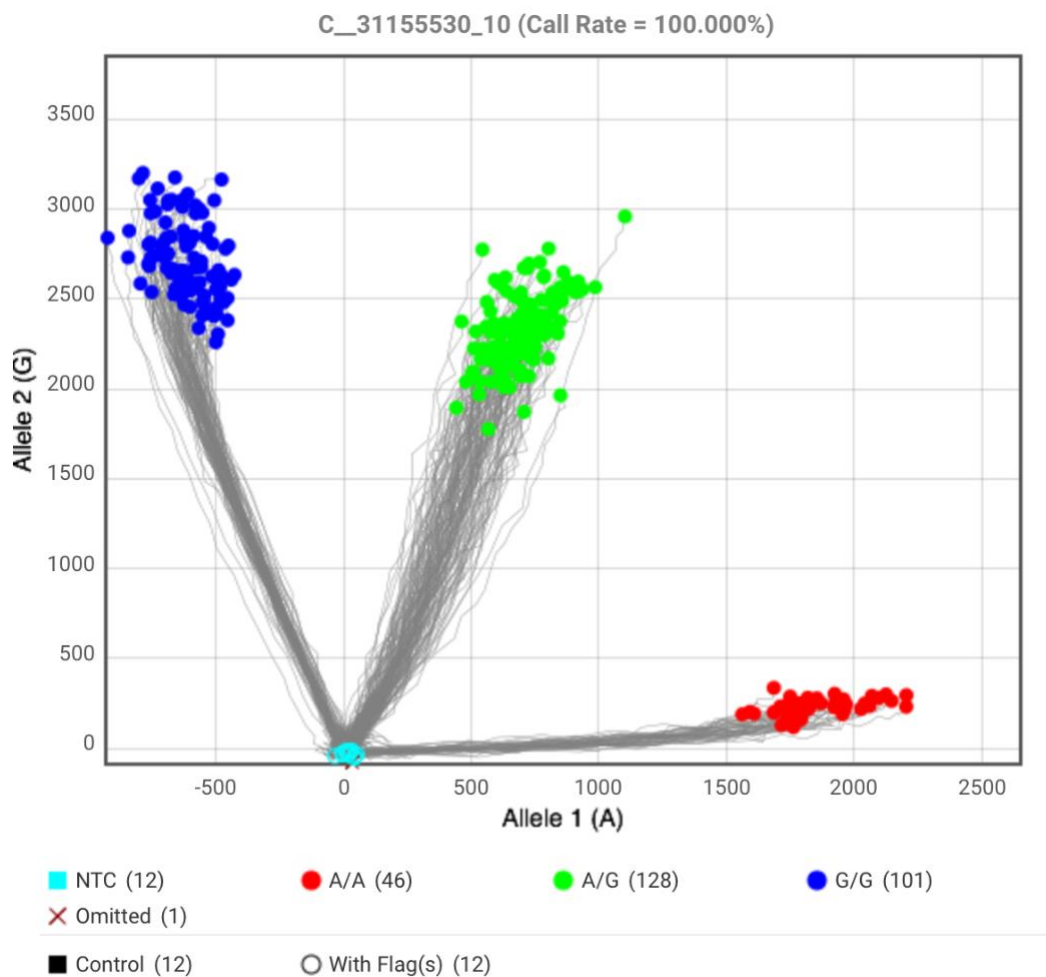


Figura 18: Imagen de genotipado: Gen glutaminasa.

El análisis de los microsatélites se realizó por electroforesis capilar en el equipo CEQ 8000 Genetic System (Beckman Coulter) utilizando 0.3 µL del marcador de peso

molecular GenomeLab DNA Size Standard-600 (Beckman Coulter). El tamaño de los fragmentos se determinó siguiendo las indicaciones del fabricante mediante el software CEQTM 8000 Genetic System, versión 5.0 (Beckman Coulter). Este programa interpola los datos de cada muestra asignando el tamaño de los fragmentos en función del marcador de peso molecular. Se consideró largo largo cuando el número de repeticiones de ambos alelos fue superior a 14 (**Figura 19**).

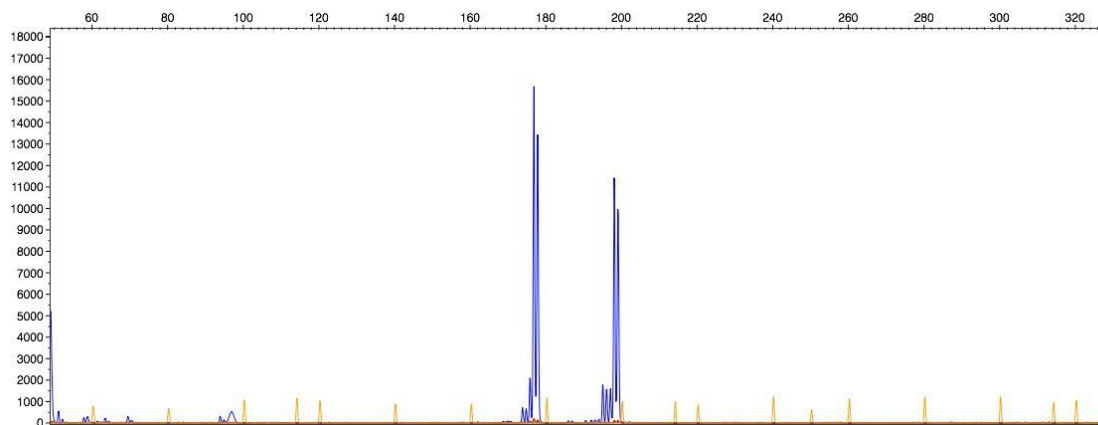


Figura 19: Imagen del análisis de Microsatélites

4.5.- Sobrecarga Oral de Glutamina

Previo a la realización de la curva de Sobrecarga Oral de Glutamina al paciente se le informó sobre en que consistía la técnica y el procedimiento de la misma. Así mismo, y aunque el paciente ya firmó un consentimiento informado para entrar en el estudio, se le entrega un consentimiento informado por escrito específico para esta prueba.

El procedimiento para la realización de dicho test es el siguiente:

- 1º) Se realiza una extracción basal, en ayunas, de sangre venosa.
- 2º) Se administra 10 gr de glutamina (L-Glutamine, SHS SA., España) diluida en 100 mL de agua.
- 3º) Se realiza una segunda, y última extracción, a los 60 minutos de la sobrecarga.

Los valores de amonio basal se consideraron patológicos cuando fueron superiores a 78 mcgr/dL. Este punto se corte se obtuvo mediante curvas ROC (logRank 22.100; $p < 0.0001$).

Según los datos publicados en la literatura, el test de SOG se considera patológico cuando existe un incremento de los niveles de amonio superior a 128 mcgr/dL a los 60 minutos tras la ingestión de glutamina. Este punto de corte de 128 se obtuvo en un estudio previo con un grupo de 47 pacientes con una media de edad de 56 ± 8.53 años con cirrosis hepática, de los cuales 12 (25.5 %) presentaban EHM, 6 (12.8 %) EH en seguimiento y 4 (8.5%) fallecieron. El punto de corte seleccionado fue aquel que tenía una mejor especificidad (66.3%) y sensibilidad (90.9%) para predecir Encefalopatía Hepática utilizando una curva ROC (AUROC 0.77; $p < 0.0005$) (**Grande L., 2005**).

Así mismo se cuantificó la diferencia entre ambos valores: Incremento de amonio (Δ amonio: Amonio 60 minutos – Amonio basal),

Con estos datos, clasificamos a los pacientes en tres grupos según el metabolismo del amonio tras la Sobrecarga Oral de Glutamina (SOG):

- Pacientes con metabolismo normal: Valores normales tanto de amonio basal como del Δ amonio.
- Pacientes con metabolismo parcialmente alterado: Con dos posibilidades
 - a) Amonio basal: Normal y Δ amonio: Alterado.
 - b) Amonio basal: Alterado y Δ amonio: Normal.
- Pacientes con metabolismo alterado: Amonio basal y Δ amonio Alterados

	Amonio Basal	Δ amonio
Metabolismo normal		
Metabolismo Parcialmente Alterado		
Metabolismo Alterado		

 Normal
 Patológico

4.5.1 .- Determinación de Amonio.

Obtención y preparación de las muestras.

Las muestras se extrajeron por venopunción, en ayunas, obteniéndose muestras de plasma en tubos de EDTA dipotásico, sin hemólisis, que se conservaron en hielo, centrifugándose y realizando la determinación dentro de los 20 minutos tras la extracción venosa.

Métodos de medida.

Debido a la vasta extensión de tiempo en la que se ha realizado el estudio, la determinación de amonio se ha visto sometido a cambios en la tecnología por la resolución de diferentes expedientes de compras a los que se ha visto sometido el laboratorio donde se han realizado las determinaciones. Los dos métodos de medida utilizados han sido:

A) Método de química seca:

El método utilizado es una técnica colorimétrica a punto final que, utilizando tampones de pH alcalinos, convierte el ión amonio (NH_4^+) en amoniaco gas (NH_3) que

reacciona con el indicador azul de bromofenol. Se obtiene un compuesto coloreado que se mide por reflectometría a 600 nm.

Equipo: Fusion 5.1.- Ortho Clinical Diagnostics.

B) Método enzimático:

Se basa en la determinación de amonio plasmático utilizando la enzima glutamato deshidrogenasa (GLDH) que cataliza la aminación reductora del 2-oxoglutarato con NH_4^+ y NADPH para formar glutamato y NADP^+ . La concentración de NADP^+ formado es directamente proporcional a la concentración de amoníaco, midiéndose, por tanto, la disminución de la absorbancia por espectrofotometría a 340 nm.



NADP: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADP^+ forma oxidada; NADPH^+ forma reducida).

Equipo: Sistemas Roche/Hitachi cobas c (Roche Diagnostics)

Estudio de concordancia entre los dos métodos.

El estudio de concordancia entre los dos métodos anteriores se realizó con los resultados de 73 muestras, medidas en ambos equipos simultáneamente, con el programa estadístico SPSS (19.0; SPSS, Inc, Chicago, IL). El resultado mostró Coeficiente de Correlación intraclase de 0,983 con un intervalo de confianza (0,961-0,991).

4.6.- Circuito de estudio de los pacientes

4.6.1.-Primera Visita Consulta Médica.

El circuito de visita de los pacientes se diseñó para que en la misma mañana fueran vistos en primer lugar en la Consulta de Digestivo y en segundo lugar pasaran a la consulta de Enfermería para la realización de las pruebas funcionales. Para ello, los pacientes son citados indicándoles que deben venir en ayunas y citando en las primeras horas de la mañana a los pacientes diabéticos.

En la Consulta de Digestivo el médico realiza:

- Anamnesis Completa: Antecedentes Familiares, Antecedentes Personales, incluyendo el tratamiento farmacológico actual, y Enfermedad Actual.
- Exploración Física Completa.
- Ecografía Hepática
- Solicita Analítica:

Perfil General: Glucosa, Urea, Creatinina, Na⁺, K⁺, Calcio, Fosfato, Proteínas Totales y LDH.

Perfil Hepatobiliar: Bilirrubina total, AST, ALT, GGT, Fosfatasa Alcalina y Colinesterasa.

Perfil Dislipemia: Colesterol, Triglicéridos, HDL-Colesterol, LDL-Colesterol y Ácido úrico.

Otras determinaciones Bioquímicas: PCR, Albumina, AFP, TSH, Hemoglobina Glicosilada (si procede).

Hemograma

Estudio de Coagulación.

- Revisa/Reajusta el tratamiento
- Entrega y firma de Consentimiento firmado
- Informa al paciente de su situación actual, de la estrategia a seguir durante la evolución de enfermedad y resuelve todas las dudas que presente el paciente.

4.6.2. Primera Visita Consulta Enfermería.

Una vez finalizada la consulta médica, los pacientes fueron dirigidos a la consulta de Enfermería Digestiva dónde se realizaron el resto de las pruebas. Estas pruebas se realizaron por personal experto en las mismas, con amplia experiencia y con la titulación requerida para la realización de las mismas.

Las pruebas se realizaron en el siguiente orden:

1º) Estudio de Encefalopatía Hepática Mínima:

- Tests Psicométricos
- Frecuencia Crítica del Parpadeo

2º) Extracción basal de sangre y Sobrecarga Oral de Glutamina.

El estudio de Encefalopatía Hepática Mínima se realizó en la propia consulta siguiendo la metodología explicada en el apartado 3.3. Una vez que el paciente hubo terminado la prueba de la Frecuencia Crítica del Parpadeo, fue acompañado por el personal de enfermería a una sala de cuidados intermedios dónde se realizó la extracción de sangre de la analítica basal solicitada por el médico y la SOG. El hecho de que esta prueba se realizara en un área de cuidados intermedios fue por seguridad para el paciente por si apareciera algún evento adverso durante el proceso.

4.6.3. Seguimiento de los pacientes.

El seguimiento de los pacientes se realizó semestralmente, tanto en la Consulta Médica como de Enfermería. En la Consulta Médica, se le preguntó al paciente por cualquier evento ocurrido desde la última visita, se revisó la analítica solicitada en la consulta anterior, se realizó exploración física y ecografía hepática de control y finalmente revisión y reajuste del tratamiento. Asimismo se solicitó analítica de control para la próxima visita. En esta analítica se incluyó hemograma, estudio de coagulación, perfiles de bioquímica (general, hepatobiliar y dislipemia), albúmina y alfa feto proteína. A continuación, ese mismo día, los pacientes acudieron a la consulta de enfermería, dónde, según los criterios médicos, volvieron a repetirse las pruebas funcionales siguiendo exactamente el mismo protocolo ya descrito en la primera visita.

Los episodios agudos, de descompensación de la enfermedad se registraron por los ingresos en urgencias y/o planta de los pacientes.

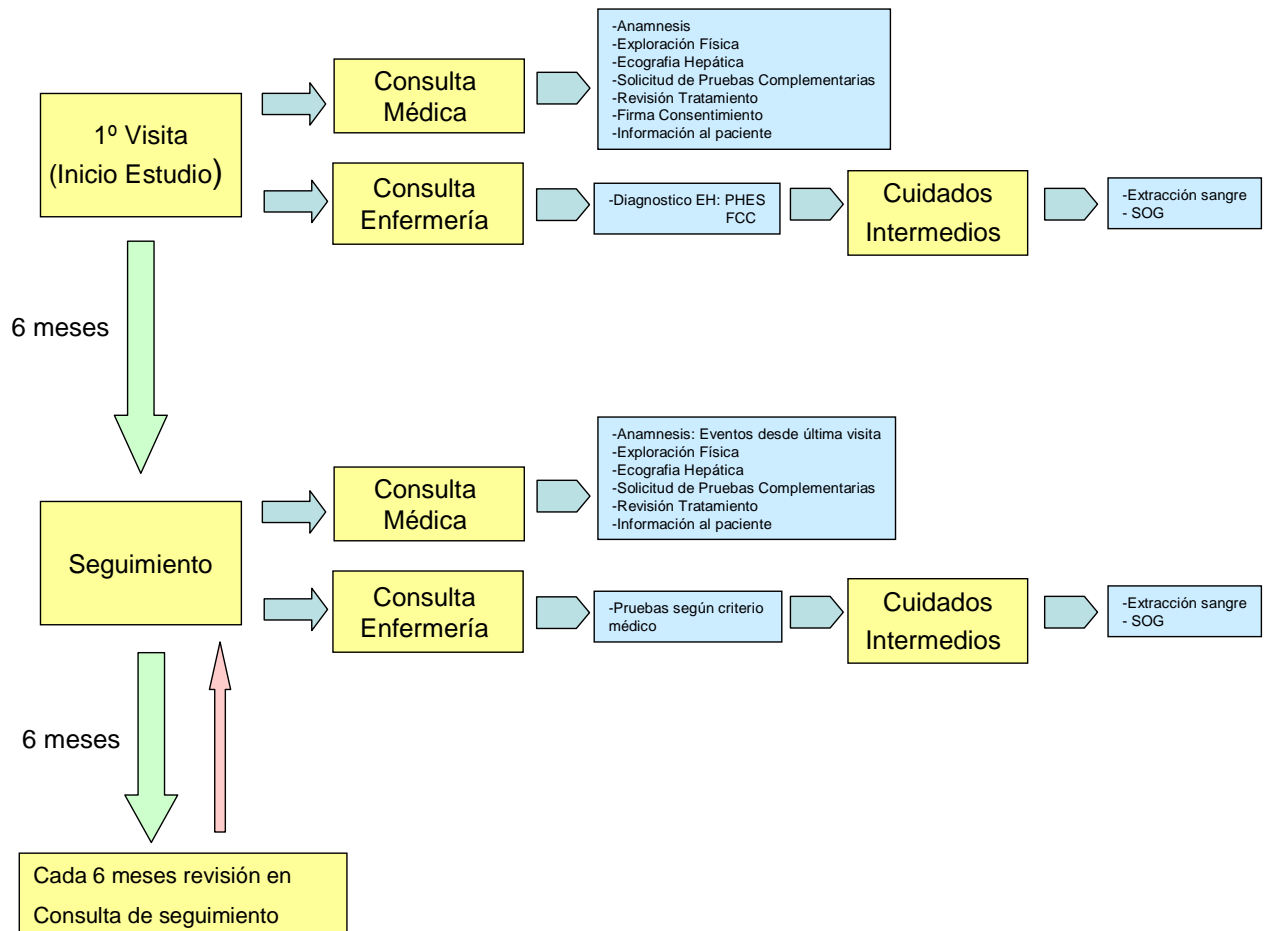


Figura 20: Esquema del circuito de estudio de los pacientes

4.7.- Análisis Estadístico.

En primer lugar, aplicamos técnicas de análisis estadístico exploratorio; tras las cuales realizamos el análisis descriptivo de los datos. Las variables cuantitativas se resumieron como media y desviaciones típicas, o en su defecto con mediana y percentiles 25 y 75 para datos con una marcada asimetría, y las variables cualitativas

con porcentajes. Esta descripción fue realizada globalmente y por grupos de respuesta a la SOG (normal/ parcialmente alterado/ alterado).

Para la comparación entre grupos se utilizó para las variables cualitativas el test de Chi-cuadrado o Prueba exacta de Fischer y para las variables cuantitativas la T-student o la prueba de U de Mann-Whitney en caso de distribuciones no normales (test de Shapiro Wilk).

Para el cálculo de los cut-offs óptimos para el amonio basal y tras la sobrecarga oral de glutamina se utilizaron curvas ROC y el índice de Youden.

El método de Kaplan-Meier se utilizó para obtener las probabilidades, medianas y cuartiles de los tiempos hasta la presentación de EH. Se generaron estos estadísticos globales y separados por grupos de SOG y se representaron las funciones de supervivencia. El test Log-Rank se utilizó para comparar la igualdad de las distribuciones del tiempo hasta EH entre grupos.

Realizamos modelos de Cox univariantes para identificar las variables que se incorporarían a un modelo de Cox multivariantes de riesgos proporcionales, seleccionando aquellas con $p \leq 0,25$. La regresión de Cox (riesgo proporcional) se utilizó para crear modelos de tiempos de libres de EH incluyendo variables predictoras (covariables) tanto categóricas como continuas. Para las variables introducidas en el modelo se calcularon hazards ratio e intervalos de confianza al 95%, una vez validado el supuesto de riesgos proporcionales.

El análisis estadístico se realizó con el paquete estadístico IBM Corp. Released 2016. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 24. Armonk, NY:IBM Corp.

5.- RESULTADOS

5.1.- Características generales de la población en estudio.

En el estudio se incluyeron un total de 256 pacientes cirróticos, 185 (72,3%) hombres y 71 (27,7%) mujeres (**Figura 21**). La media de edad fue de 57.5 (\pm 9.9) años (Min:32; Máx: 84).

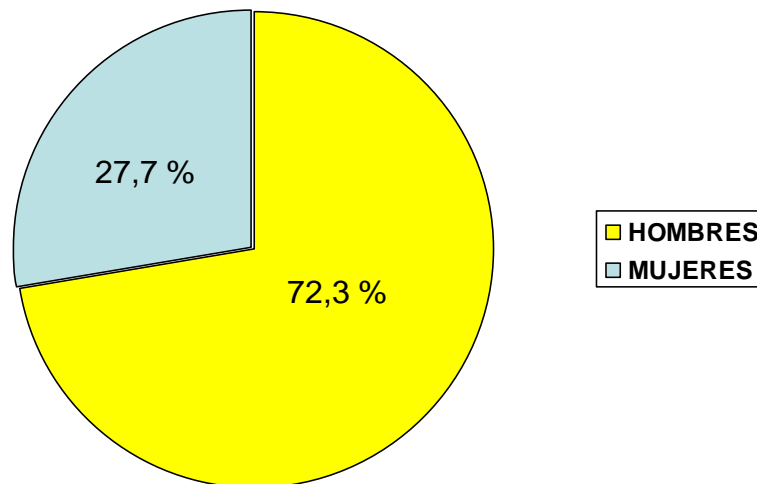


Figura 21: Distribución por sexo de la población en estudio.

Las causas de la cirrosis en la población en estudio fue: 53,1 % (135/254) Alcohol, 30,7 % (78/254) VHC, 5,5 % (14/254) VHB; 2 % (5/254) HAI, 4,3% (11/254) CBP, 3,5 % (9/254) EHNA y 0,8 (2/254) % otras causas (**Figura 22**).

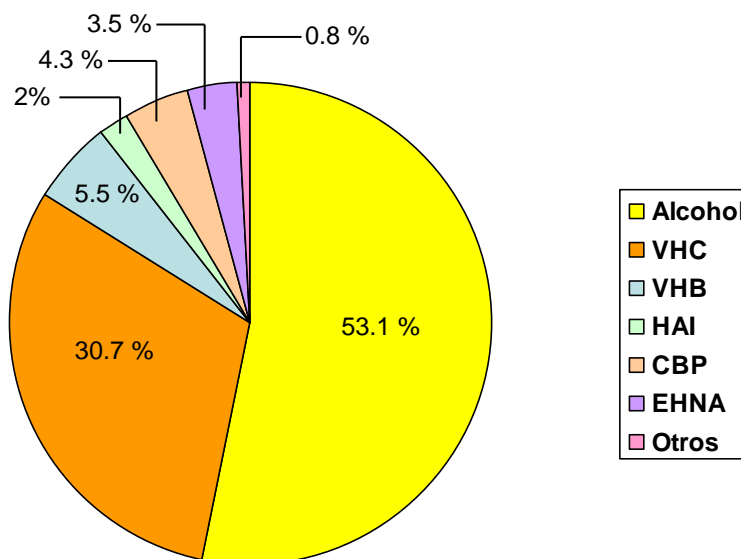


Figura 22: Causas de cirrosis en la población en estudio.

En el momento que se incluyeron en el estudio, el índice pronóstico Child-Pugh de los pacientes fue: 64,5% (140/217) A, 32,3% (70/217) B, 3,2% (7/217) C (**Figura 23**). Estos porcentajes se calcularon sobre un total de 217 pacientes, ya que no se dispuso de estos datos en 39 pacientes (15,2%).

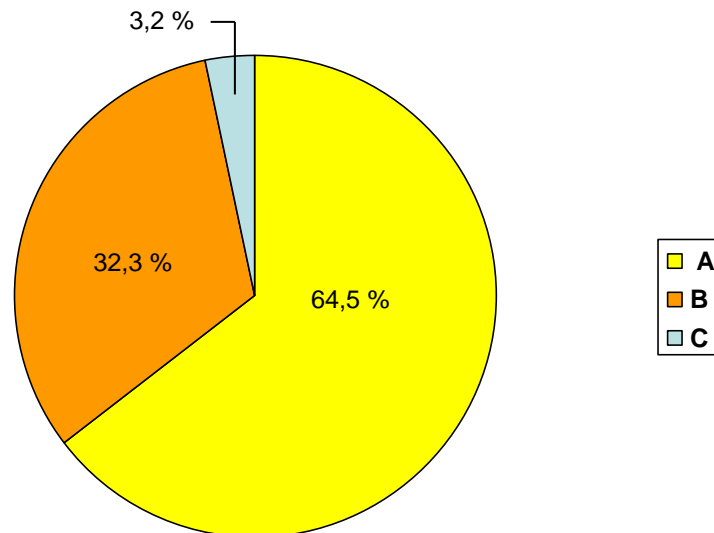


Figura 23: Índice Child-Pugh de la población en estudio.

Los pacientes fueron censurados a los seis años de seguimiento (101/256: 39,8 %) o por algunos de estos tres motivos: presentar un episodio de EH (83/256: 32,7%), someterse a un trasplante hepático (22/256: 8,7%) o éxitus (48/256: 18,9%). De los casos de éxitus, el 76,2% fue debido a patología hepática y el 23,8% a causa extrahepática (**Figura 24**).

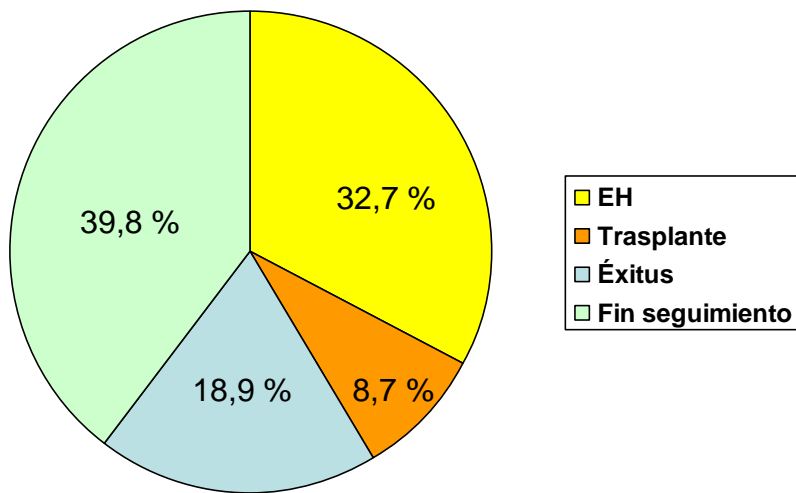


Figura 24: Causas de finalización de estudio.

El resto de características generales en las variables bioquímicas-hematológicas de la población en estudio se resume en la siguiente tabla (**Tabla 12**), en la que se muestran los valores medios de las determinaciones, desviación estándar y los valores máximos y mínimos:

Variable	Media	Desviación estándar	Mínimo	Máximo
Urea (mg/dL)	35	14	11	87
Sodio (mEq/L)	139	3	129	147
Creatinina (mg/dL)	0.9	0.3	0.4	2.6
Bilirrubina total (mg/dL)	1.8	1.5	0.2	11.2
AST (U/L)	60	44	8	257
ALT (U/L)	50	43	8	246
Colinesterasa (U/L)	5282	2459	1241	12622
Fosfatasa Alcalina (U/L)	161	111	34	648
Glucosa (mg/dL)	124	59	64	444
Insulina (μ U/mL)	19.4	11.3	2.6	60.6
HOMA	5.7	4.1	0.8	21.8
Albúmina (g/dL)	3804	724	1800	6400
Alfa-Fetoproteína (ng/mL)	11	23	0.82	149
PCR (mg/L)	5.3	2.2	3.2	7.5
Hemoglobina (g/dL)	13.2	2.2	7.6	21.1
Hematocrito (l/l)	38.9	5.9	25.1	50.8
Leucocitos ($\times 10^9/L$)	5666	2318	1600	14100
Plaquetas ($\times 10^9/L$)	114	63	34	681
INR	1.3	0.3	0.8	3.6
Actividad protrombina (%)	72.7	17.8	13	113

Tabla 12.- Variables bioquímicas hematológicas de la población en estudio

Respecto a los tests psicométricos y a la frecuencia crítica del parpadeo los valores medios, desviación estándar y mínimo y máximo fueron (**Tabla 13**):

Prueba	Media	Desviación estándar	Mínimo	Máximo
PHES	-2.9	3.0	-11	2
FCP	40.5	3.8	32.2	48.3

Tabla 13.- Valores de los test psicométricos y frecuencia crítica del parpadeo en la población en estudio.

5.2.- Análisis del metabolismo del amonio en la población estudiada.

Los valores de amonio basal, amonio a los 60 minutos y de delta de amonio (media, desviación estándar, mínimo y máximo) en la población estudiada se resumen en la siguiente tabla (**Tabla 14**):

Variable	Media	Desviación estándar	Mínimo	Máximo
Amonio basal	74.5	43.2	9	259
Amonio a los 60 min (tras SOG)	122.2	73.5	13	410
Delta Amonio	48.3	47.9	- 54	224

Tabla 14.- Valores de amonio (basal, a los 60 minutos y Δ amonio) en la población en estudio.

Como ya se comentó en el material y método, los valores de amonio basal se consideraron patológicos cuando fueron superiores a 78 μ gr/dL. Este punto se corte se obtuvo mediante curvas ROC (Sensibilidad: 67,4% (IC 95%: 51,5%-80,9%); Especificidad: 69,7% (IC 95%: 63,5 %-76,2%)). El número de pacientes incluidos en cada grupo se muestran en la **tabla 15**.

Amonio Basal	n	%
Normal (<78 mcgr/dL)	162	63,8 %
Alterado (>78 mcgr/dL)	92	36,2 %

Tabla 15.- Número de pacientes según amonio basal.

La diferencia entre ambos valores: incremento de amonio tras la sobrecarga oral de glutamina (Δ amonio (Delta de Amonio): Amonio 60 minutos – Amonio basal) se consideró patológica cuando fue superior a 33 μ gr/dL. Punto de corte obtenido mediante curvas ROC (Sensibilidad: 90% (IC 95%: 76,3% - 97,2%); Especificidad: 53,6% (IC 95% 76,3% 97,2 %)). El número de pacientes con Δ amonio normal o alterado se muestra en la **Tabla 16**.

Δ amonio	n	%
Normal (<33 mcgr/dL)	112	45 %
Alterado (>33 mcgr/dL)	137	55 %

Tabla 16.- Número de pacientes según Δ amonio.

Con estos datos, clasificamos a los pacientes en tres grupos según el metabolismo del amonio tras la SOG (**Tabla 17**):

1) Pacientes con metabolismo normal: Valores normales tanto de amonio basal como del Δ amonio (Amonio basal < 78 mcgr/dL e Δ amonio < 33 mcgr/dL).

2) Pacientes con metabolismo parcialmente alterado: Con dos posibilidades

a) Amonio basal: Normal y Δ amonio: Alterado (Amonio basal < 78 mcgr/dL e Δ amonio > 33 mcgr/dL).

b) Amonio basal: Alterado y Δ amonio Normal (Amonio basal > 78 mcgr/dL e Δ amonio < 33 mcgr/dL).

3) Pacientes con metabolismo alterado: Amonio basal y Δ amonio Alterados (Amonio basal > 78 mcgr/dL e Δ amonio > 33 mcgr/dL).

	Amonio Basal ($\mu\text{gr/dL}$)	Δ amonio ($\mu\text{gr/dL}$)
Metabolismo normal	< 78	<33
Metabolismo Parcialmente Alterado	< 78	>33
	> 78	<33
Metabolismo Alterado	> 78	>33

Tabla 17.- Clasificación según el metabolismo del amonio.

En la **tabla 18** se muestra el número de pacientes que presentaron criterios de cada grupo.

Metabolismo	n	%
Normal	89	35,7
Parcialmente Alterado	93	37,3
Alterado	67	26,9

Tabla 18.- Número de pacientes según el metabolismo del amonio.

Dentro del grupo con metabolismo parcialmente alterados, existen dos posibilidades: pacientes con metabolismo basal alterado o pacientes con Δ alterado. El número de pacientes que componen cada grupo se muestran en la **tabla 19**.

Metabolismo Parcialmente Alterado	n	%	% Total
Basal alterado	23	9,2	24,7
Δ alterado	70	28,1	75,3
	93	37,3	100

Tabla 19.- Número de pacientes con metabolismo parcialmente alterado

Las características de la población por grupos se resumen en la **tabla 20**. En ella se muestran los valores de cada variable en cada uno de los tres grupos en los que hemos dividido a los pacientes según el metabolismo del amonio. De cada variable, en cada uno de los grupos, se muestra la media, desviación estándar, valores mínimos y máximos y el valor de p para el estudio de la comparación entre los grupos.

Al analizar los datos, no se observaron diferencias significativas entre los grupos para las siguientes variables: edad, urea, sodio, creatinina, ALT, Fosfatasa Alcalina, Glucosa, HOMA, alfa-fetoproteína ni en el recuento leucocitario.

Se encontraron diferencias significativas entre los grupos para las siguientes variables: Bilirrubina Total ($p < 0.001$), AST ($p = 0.049$), Colinesterasa ($p < 0.001$), Insulina ($p = 0.024$), Albúmina ($p < 0.001$), Hemoglobina ($p = 0.033$), Hematocrito ($p = 0.031$), Recuento de Plaquetas ($p < 0.001$), INR ($p < 0.001$) y Actividad de Protrombina ($p < 0.001$). Las diferencias encontradas por grupos de amonio se definen en la **tabla 20** del siguiente modo:

- * Diferencia entre los grupos normal y parcialmente alterado
- / Diferencia entre los grupos normal y alterado
- + Diferencia entre los grupos parcialmente alterado y alterado.

Variable	Grupos Metabolismo	Media	Desviación estándar	Mínimo	Máximo	p
Edad	Normal	57.4	9.4	32	75	0.509
	Parcialmente alterado	58.4	10.2	37	84	
	Alterado	56.6	10	37	77	
Urea	Normal	37	17	12	87	0.976
	Parcialmente alterado	35	12	17	80	
	Alterado	35	13	11	66	
Sodio	Normal	139	3	131	144	0.397
	Parcialmente alterado	139	4	129	145	
	Alterado	139	4	129	147	

Variable	Grupos Metabolismo	Media	Desviación estándar	Mínimo	Máximo	p
Creatinina	Normal	0.9	0.2	0.4	1.9	0.456
	Parcialmente alterado	0.9	0.3	0.5	2.3	
	Alterado	1	0.3	0.5	2.6	
Bilirrubina Total ^{*/+ /}	Normal	1.2	0.8	0.2	5.2	0.001
	Parcialmente alterado	1.9	1.6	0.3	11.2	
	Alterado	2.6	1.6	0.5	8.8	
AST [/]	Normal	55	43	12	247	0.049
	Parcialmente alterado	63	44	8	257	
	Alterado	65	47	18	224	
ALT	Normal	54	49	8	246	0.911
	Parcialmente alterado	49	44	12	226	
	Alterado	45	34	12	193	
Colinesterasa ^{*/}	Normal	6526	2474	1447	12622	0.001
	Parcialmente alterado	4969	2280	1241	11547	
	Alterado	4140	1942	1251	9424	
Fosfatasa Alcalina	Normal	136	73	53	344	0.107
	Parcialmente alterado	176	132	34	611	
	Alterado	180	126	59	648	
Glucosa	Normal	137	79	71	445	0.518
	Parcialmente alterado	116	37	64	259	
	Alterado	115	44	75	306	
Insulina [/]	Normal	17.3	11.4	3	60.6	0.024
	Parcialmente alterado	19.1	9.6	2.6	50.5	
	Alterado	23.6	12.8	3.9	57.9	
HOMA	Normal	5.6	4.6	0.77	21	0.234
	Parcialmente alterado	5.4	3.1	1.1	14.3	
	Alterado	6.3	4.2	1.4	21.8	

Variable	Grupos Metabolismo	Media	Desviación estándar	Mínimo	Máximo	p
Albumina ^{*/+}	Normal	4171	734	2240	6400	0.001
	Parcialmente alterado	3758	658	1800	5370	
	Alterado	3438	581	1910	4620	
Alfa-Fetoproteína	Normal	11.9	25.7	0.9	140.1	0.914
	Parcialmente alterado	11.9	24.2	0.8	149.8	
	Alterado	8.9	17.3	1.2	96	
Hemoglobina ^{*/}	Normal	13.6	2.6	7.6	21.1	0.033
	Parcialmente alterado	13.5	1.5	10.1	17	
	Alterado	12.4	2.3	8.4	16.6	
Hematocrito ^{*/}	Normal	39.8	6.1	25.4	50.8	0.031
	Parcialmente alterado	39.9	4.4	30.3	50.3	
	Alterado	6.7	25.1	49.4	31.6	
Leucocitos	Normal	5865	2197	1600	11800	0.313
	Parcialmente alterado	5704	2364	1900	12600	
	Alterado	5308	2548	2300	14100	
Plaquetas ^{/+}	Normal	125	50	46	287	0.001
	Parcialmente alterado	120	82	54	681	
	Alterado	91	40	34	262	
INR ^{*/}	Normal	1.2	0.1	0.8	1.76	0.001
	Parcialmente alterado	1.3	0.2	1	2.21	
	Alterado	1.5	0.4	1	3.62	
Actividad ^{*/} Protrombina	Normal	83.5	16.2	45	113	0.001
	Parcialmente alterado	69.1	16	13	100	
	Alterado	64.1	15.9	28	99	

Tabla 20.- Características de la población según el metabolismo del amonio.

Respecto a los tests psicométricos y a la frecuencia crítica del parpadeo los resultados se muestran en la **tabla 21**. Ambas pruebas mostraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de metabolismo del amonio. Las diferencias encontradas por grupos de amonio están definidas del siguiente modo:

- * Diferencia entre los grupos normal y parcialmente alterado.
- / Diferencia entre los grupos normal y alterado.
- + Diferencia entre los grupos parcialmente alterado y alterado.

Variable	Grupos Metabolismo	Media	Desviación estándar	Mínimo	Máximo	p
PHES ^{*/+}	Normal	-2.4	2.6	-11	2	0.018
	Parcialmente alterado	-2.6	3.3	-11	2	
	Alterado	-4.3	2.9	-10	0	
FCP [/]	Normal	41.3	3.8	33.6	47.8	0.042
	Parcialmente alterado	40.7	3.5	32.9	47.6	
	Alterado	38.7	3.9	32.2	48.3	

Tabla 21.- Valores de PHES y FCP de la población según el metabolismo del amonio.

El análisis de frecuencias de las variables cualitativas con respecto al metabolismo se muestra en tablas independientes a continuación:

En la **tabla 22** se muestran el total de casos y el porcentaje por sexo para cada uno de los grupos del metabolismo, habiéndose encontrado diferencias significativas entre hombres y mujeres (**Figura 25**).

		Metabolismo			Total	p
		Normal	Parcialmente Alterado	Alterado		
Mujer	Recuento	33	24	13	70	0.043
	Porcentaje	47,1 %	34,3 %	18,6 %	100 %	
Hombre	Recuento	56	69	54	179	
	Porcentaje	31,3 %	38,5 %	30,2 %	100	

Tabla 22: Distribución por sexo y grupos de metabolismo.

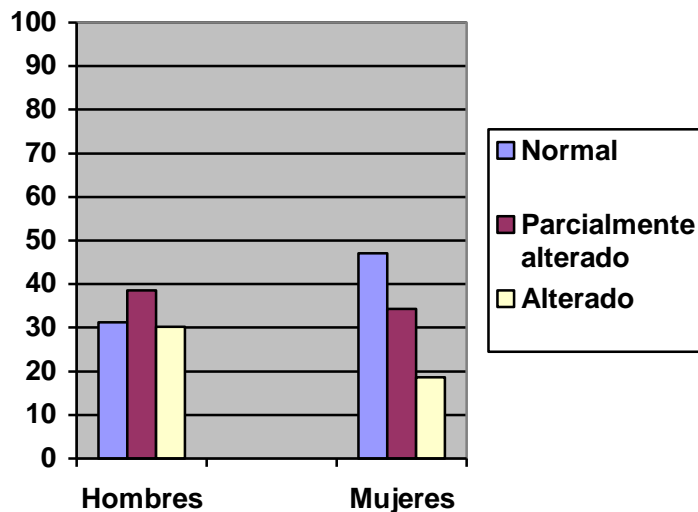


Figura 25: Distribución por sexo según grupos de metabolismo

La **tabla 23** muestra el número y porcentajes de las distintas etiologías de la cirrosis para cada uno de los grupos del metabolismo, no habiéndose encontrado diferencias significativas entre ellas (**Figura 26**).

		Metabolismo			Total	p
		Normal	Parcialmente Alterado	Alterado		
Alcohol	Recuento	34	52	44	130	0.083
	Porcentaje	26,2 %	40,0 %	33,8 %	100 %	
VHC	Recuento	34	27	17	78	
	Porcentaje	31,3 %	38,5 %	30,2 %	100 %	
VHB	Recuento	8	2	3	13	
	Porcentaje	61,5 %	15,4 %	23,1 %	100 %	
HAI	Recuento	2	2	0	4	
	Porcentaje	50 %	50 %	0	100 %	
CBP	Recuento	6	4	1	11	
	Porcentaje	54,5 %	36,4 %	9,1 %	100 %	
EHGNA	Recuento	4	4	1	9	
	Porcentaje	44,4 %	44,4 %	11,1 %	100 %	

Tabla 23: Distribución de la etiología de la cirrosis por grupos de metabolismo.

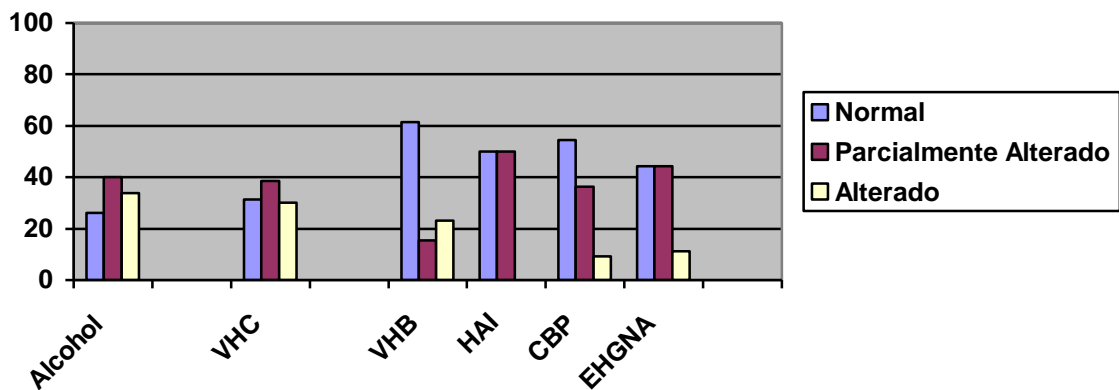


Figura 26: Etiología de la cirrosis según grupos de metabolismo

La **tabla 24** muestra el número de fallecimientos que se han producido en cada uno de grupo en función del metabolismo del amonio, no habiéndose encontrado diferencias significativas entre los tres grupos (**Figura 27**).

Metabolismo		Muerte		Total	p
		Si	No		
Normal	Recuento	24	65	89	0.257
	Porcentaje	27 %	73%	100 %	
Parcialmente Alterado	Recuento	33	60	93	
	Porcentaje	35,5 %	64,5 %	100 %	
Alterado	Recuento	26	41	67	
	Porcentaje	38,8 %	61,2 %	100%	

Tabla 24: Casos de muerte según el metabolismo del amonio.

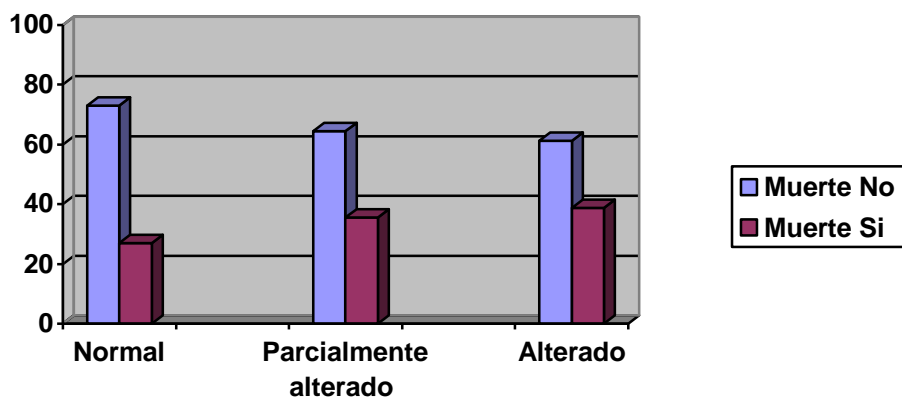


Figura 27: Casos de muerte por grupos de metabolismo del amonio.

En la **tabla 25** se muestra el número de casos y los porcentajes que fueron causa de fin del estudio para cada uno de los grupos del metabolismo del amonio. Habiéndose encontrado diferencias estadísticamente significativas entre los grupos (**Figura 28**).

Metabolismo		Causa Final Estudio				Total	p
		EH	Éxito	Trasplante	Fin de seguimiento		
Normal	Recuento	41	15	5	26	88	0.008
	Porcentaje	47,1 %	17,2 %	5,7 %	29,9 %		
Parcialmente Alterado	Recuento	25	16	9	43		
	Porcentaje	26,9 %	17,2 %	9,7 %	46,2 %		
Alterado	Recuento	15	15	8	28		
	Porcentaje	22,7 %	22,7 %	12,1 %	42,4 %		

Tabla 25: Causas de fin del estudio por grupo de metabolismo

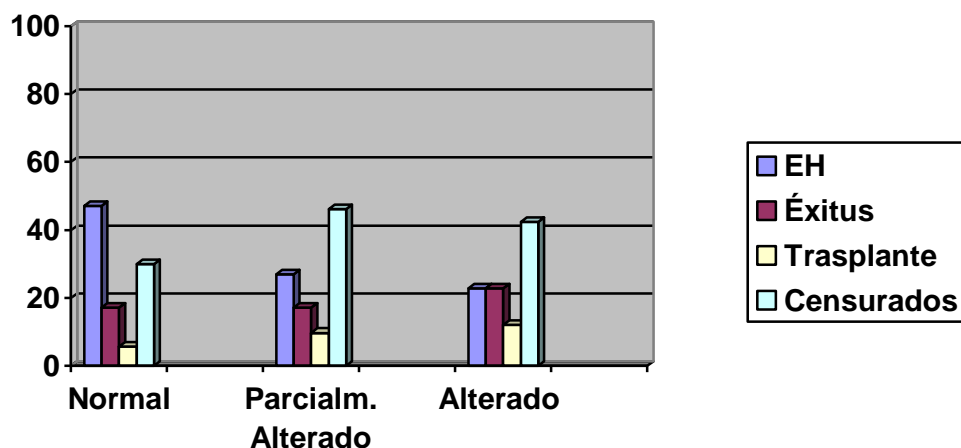


Figura 28: Causas de fin de estudio por grupos de metabolismo del amonio.

En la **tabla 26** se muestra la existencia o no de consumo de alcohol por grupo de metabolismo del amonio, habiéndose encontrado diferencias significativas entre ambos grupos (**Figura 29**).

		Metabolismo			Total	p
		Normal	Parcialmente Alterado	Alterado		
Si	Recuento	40	57	52	149	0.001
	Porcentaje	26,8 %	38,3%	34,9%	100	
No	Recuento	41	26	10	77	
	Porcentaje	53,2 %	33,8 %	13%	100	

Tabla 26: Consumo de alcohol por grupos de metabolismo

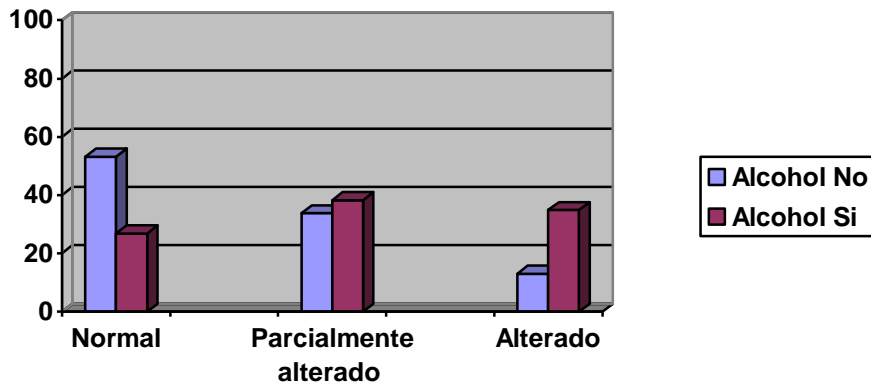


Figura 29: Consumo de Alcohol por grupos de metabolismo del amonio.

En la **tabla 27** se muestra el número de pacientes en cada estadio, según la clasificación Child-Pugh en el momento de comenzar el estudio por grupo de metabolismo. Se encontró diferencia estadísticamente significativa en cada uno de los grupos (**Figura 30**).

		Metabolismo			Total	p
		Normal	Parcialmente Alterado	Alterado		
A	Recuento	67	50	22	139	0.001
	Porcentaje	48,2 %	36 %	15,8 %	100 %	
B	Recuento	11	28	28	67	
	Porcentaje	16,4 %	41,8 %	41,8 %	100 %	
C	Recuento	0	2	5	7	
	Porcentaje	0 %	28,6 %	71,4 %	100 %	

Tabla 27: Estadio de Child-Pugh por grupos de metabolismo.

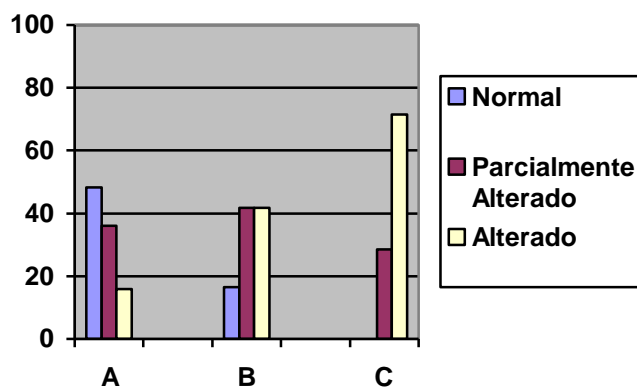


Figura 30: Estadio de Child-Pugh por grupos de metabolismo del amonio.

En la **tabla 28** se muestran los valores del índice MELD inicial por grupos de metabolismo, habiéndose encontrado diferencias estadísticamente significativas entre los tres grupos.

Variable	Grupos Metabolismo	Media	Desviación estándar	Mínimo	Máximo	p
Índice MELD	Normal	9.1	2.4	6	17	0.001
	Parcialmente alterado	11.2	3.3	6	20	
	Alterado	13.6	4.3	8	29	

Tabla 28: Índice MELD por grupos de metabolismo

5.3.- Análisis del estudio de marcadores genéticos en la población estudiada.

5.3.1.- Análisis del haplotipo TACC del gen de la glutaminasa.

Se realizó el estudio de marcadores genéticos a un total de 135 pacientes. La distribución de cada uno de los SNPs (Single Nucleotide Polymorphism) que componen el haplotipo TACC fue la siguiente (**Tablas 29-33**):

	n	%
TT	78	57,8 %
TC	44	32,6 %
CC	13	9,6 %

Tabla 29: Distribución del SNP 1 (rs37771310-intron 6) en la población estudiada

	n	%
GG	43	31,8%
GA	61	45,2%
AA	31	23%

Tabla 30: Distribución del SNP 2 (rs6743496-intron 7) en la población estudiada.

	n	%
TT	42	30,6%
TC	58	43,3%
CC	35	26,1%

Tabla 31: Distribución del SNP 3 (rs2883713-intron 9) en la población estudiada.

	n	%
GG	21	15,5%
GC	66	48,8%
CC	48	35,5%

Tabla 32: Distribución del SNP 4 (rs3088307-3UTR) en la población estudiada

	n	%
Presencia	78	57,6%
Ausencia	57	42,2%

Tabla 33: Distribución del Haplotipo TACC en la población estudiada

La distribución según los grupos de metabolismo de cada uno de los haplotipos se muestra en las **tablas** desde la **34 a la 38**. Se encontró diferencias significativas entre los grupos de metabolismo para el haplotipo 2 ($p=0.016$) y haplotipo 4 ($p= 0.001$).

		Metabolismo			Total	p
		Normal	Parcialmente Alterado	Alterado		
TT	Recuento	29	32	16	77	0.973
	Porcentaje	37,7%	41,6%	20,8%	100%	
TC	Recuento	18	17	8	43	
	Porcentaje	41,9%	39,5%	18,6%	100%	
CC	Recuento	6	5	2	13	
	Porcentaje	46,2%	38,5%	15,4%	100%	

Tabla 34: Distribución del SNP 1 (rs3771310-intron 6) por grupos de metabolismo.

		Metabolismo			Total	p
		Normal	Parcialmente Alterado	Alterado		
GG	Recuento	10	18	15	43	0.016
	Porcentaje	23,3%	41,9%	34,9%	100%	
GA	Recuento	29	23	7	59	
	Porcentaje	49,1%	39%	11,9%	100%	
AA	Recuento	14	13	4	31	
	Porcentaje	45,2%	41,9%	12,9%	100%	

Tabla 35: Distribución del SNP 2 (rs6743496-intron 7) por grupos de metabolismo.

		Metabolismo			Total	p
		Normal	Parcialmente Alterado	Alterado		
TT	Recuento	10	18	13	41	0.067
	Porcentaje	24,4%	43,9%	31,7%	100 %	
TC	Recuento	27	20	9	56	
	Porcentaje	48,2%	35,7%	16,1%	100%	
CC	Recuento	16	15	4	35	
	Porcentaje	45,7%	42,9%	11,4%	100%	

Tabla 36: Distribución del SNP 3 (rs2883713-intron 9) por grupos de metabolismo.

		Metabolismo			Total	p
		Normal	Parcialmente Alterado	Alterado		
GG	Recuento	4	5	11	20	0.001
	Porcentaje	20,0%	25,0%	55,0%	100%	
GC	Recuento	25	27	10	62	
	Porcentaje	40,3%	43,5%	16,1%	100%	
CC	Recuento	22	18	5	45	
	Porcentaje	48,9%	40,0%	11,1%	100%	

Tabla 37: Distribución del SNP 4 (rs3088307-3UTR) por grupos de metabolismo.

		Metabolismo			Total	p
		Normal	Parcialmente Alterado	Alterado		
Presencia	Recuento	41	29	13	83	0.054
	Porcentaje	49,4 %	34,9 %	15,7 %	100 %	
Ausencia	Recuento	20	26	18	64	
	Porcentaje	31,3 %	40,6 %	28,1 %	100 %	

Tabla 38: Distribución del Haplotipo TACC por grupos de metabolismo.

5.3.2.- Análisis de microsatélite.

Se analizó un microsatélite en la región del promotor (5'UTR) que se definió como 16xGCA en un total de 155 pacientes. Como ya se ha comentado en el material y métodos según el número de repeticiones los alelos se agruparon en microsatélites cortos ($n < 14$) y microsatélite largo ($n > 14$). La presencia del microsatélite largo (los dos alelos largos) se encontró en 25 (16,1%) de los 155 pacientes estudiados.

La distribución de los microsatélites, corto o largo, por grupos de metabolismo se muestra en la **tabla 39**. No se encontraron diferencias significativas entre los grupos de metabolismo para ninguno de los dos microsatélites.

		Metabolismo			p
		Normal	Parcialmente Alterado	Alterado	
Microsatélite corto	Recuento	56/63	47/57	23/31	0.118
	Porcentaje	88,9%	82,5%	74,2%	
Microsatélite largo	Recuento	7/63	10/57	8/31	
	Porcentaje	11,1%	17,5%	25,8%	

Tabla 39: Distribución de Microsatélites por grupos de metabolismo.

5.4.- Factores de riesgo para EH.

De los 256 pacientes que participaron en el estudio, en 86 casos (33,6%) se constató la aparición de EH, no apareciendo en los 170 casos (66,4%) restantes.

Para el análisis de los factores de riesgos dividimos éstos en distintos grupos:

- Variables epidemiológicas: sexo, edad, consumo de alcohol, score Child-Pugh inicial, score Meld inicial, episodios de EH previos.

- Variables analíticas bioquímicas-hematológicas: sodio, creatinina, bilirrubina total, INR, AST, ALT, glucosa, insulina, HOMA, albúmina, leucocitos, plaquetas,
- Variables asociadas a la respuesta a la SOG y por tanto relacionadas con el metabolismo del amonio. amonio basal, amonio a los 60 minutos, Δ Amonio.
- Variables asociadas con la presencia de EHM.

5.4.1.- Variables epidemiológicas:

A) Sexo: De los 86 casos que desarrollaron EH durante el seguimiento, 62 (72,1%) fueron hombres y 24 (27,9 %) mujeres (**Figura 31**). No encontrándose diferencias significativas por sexo entre los casos de EH y los que no ($p=0.965$). En la **tabla 40** se muestra el resumen de los datos con respecto al sexo.

B)

Sexo	ENCEFALOPATIA HEPÁTICA		p
	SI	NO	
Hombres	n	62	0.965
	%	72,1%	
Mujeres	n	24	
	%	27,9%	

Tabla 40: Distribución por sexo de los episodios de EH.

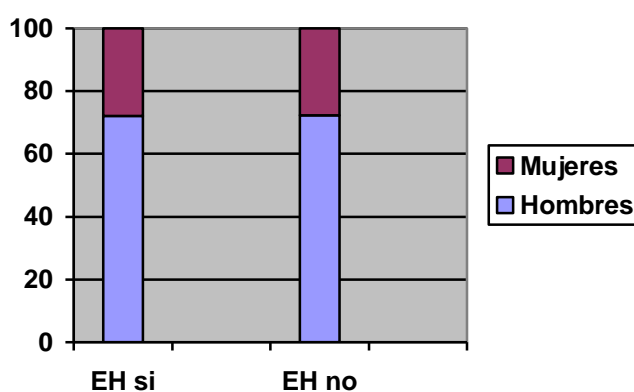


Figura 31: Distribución por sexo de la EH.

B) Edad: La media de edad de los pacientes que desarrollaron EH fue de 59.1 años frente a los 56.7 de los pacientes que no la desarrollaron, no encontrándose diferencias significativas entre ambos grupos (**Tabla 41**).

	ENCEFALOPATIA HEPÁTICA		p
	SI	NO	
Edad (media \pm DS)	59.1 \pm 11.2	56.7 \pm 9.1	0.128

Tabla 41: Edad media de los pacientes con y sin EH.

C) Consumo de Alcohol: En cuanto al consumo alcohol, de los 86 pacientes con EH, 55 (73.3 %) eran consumidores de alcohol (**Figura 32**). No existiendo diferencias significativas con respecto al consumo de alcohol entre los grupos con o sin EH ($p=0.195$). En la **tabla 42** se muestra el resumen de los casos con respecto al consumo de alcohol.

Consumo Alcohol	ENCEFALOPATIA HEPÁTICA		p
	SI	NO	
Si			0.195
n	55	98	
%	73,3%	62,4%	
No			
n	20	59	
%	26,7%	37,6%	

Tabla 42: Relación entre el consumo de alcohol y los episodios de EH.

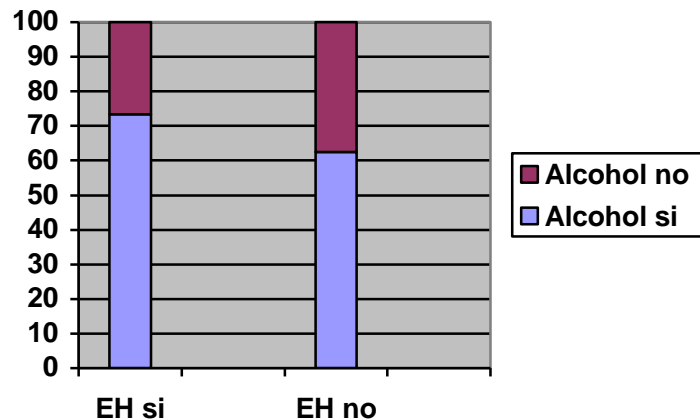


Figura 32: Relación entre la EH y el consumo de alcohol.

D) Child-Pugh inicial: Los pacientes que desarrollaron Encefalopatía Hepática presentaron un valor inicial en el score Child-Pugh de 6.9, frente a los que no presentaron EH que tuvieron un valor medio de score de 6. Encontrándose diferencias significativas ($p < 0.0005$) entre ambos grupos (**Tabla 43**).

	ENCEFALOPATIA HEPÁTICA		p
	SI	NO	
Child-Pugh (media \pm DS)	6.9 \pm 1.6	6 \pm 1.4	0.001

Tabla 43: Valores del score Child-Pugh en los pacientes con y sin EH.

E) Meld inicial: Al analizar los valores de Meld inicial también se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p = 0.001$) entre los pacientes con y sin EH, presentando los pacientes con EH un valor de Meld inicial de 12.3 frente a 10.6 de los pacientes que no presentaron cuadros de EH (**Tabla 44**).

	ENCEFALOPATIA HEPÁTICA		p
	SI	NO	
Meld (media \pm DS)	12.3 \pm 4.2	10.6 \pm 3.4	0.001

Tabla 44: Índice MELD en los pacientes con y sin EH.

F) EH previa: Del total de los pacientes que se incluyeron en el estudio, 44 casos habían tenido previo al estudio un episodio de encefalopatía hepática. De estos 44, la mitad (22) sufrieron un episodio de EH durante los seis años del estudio. Se encontró diferencias significativas entre los grupos de pacientes con y sin EH ($p < 0.018$). En la **tabla 45** se muestra el resumen de los casos con respecto a los antecedentes de EH preestudio (**Figura 33**).

EH pre-estudio	ENCEFALOPATIA HEPÁTICA		p
	SI	NO	
Si	n	22	0.018
	%	25,6%	
No	n	64	
	%	74,4%	

Tabla 45: Casos de EH en pacientes con episodios de EH previos.

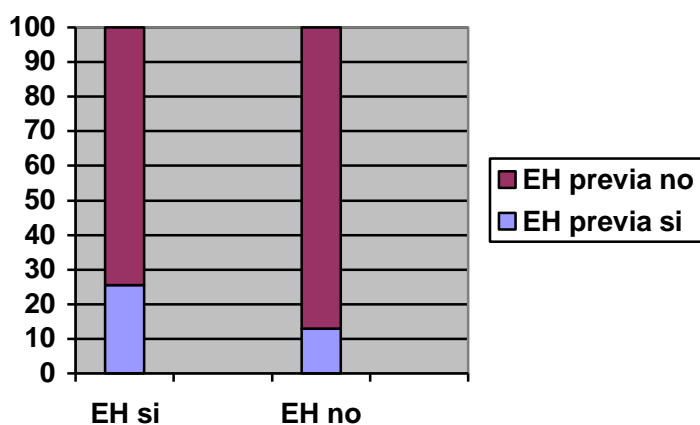


Figura 33: Casos de EH con episodios de EH previa.

Por tanto, la puntuación Child-Pugh inicial, el Meld inicial y los cuadros de EH previa fueron las variables epidemiológicas estadísticamente significativas como factores de riesgo para desarrollar EH durante el estudio. El sexo, la edad y el consumo de alcohol no fueron estadísticamente significativas como factores de riesgo asociados.

5.4.2.- Variables analíticas:

Respecto a las variables analíticas bioquímicas-hematológicas analizadas en el estudio, en la **tabla 46** se muestran los valores medios \pm desviación estándar en cada uno de los dos grupos: pacientes con y sin EH.

Al analizar los resultados no se encontraron diferencias significativas entre los grupos con y sin EH para las siguientes variables: Sodio, Creatinina, AST, ALT, Glucosa, Insulina, HOMA y Leucocitos.

Se encontraron diferencias estadísticamente significativas para: Bilirrubina total ($p=0.005$), INR ($p=0.003$), Albúmina ($p<0.001$), Recuento de plaquetas ($p=0.002$), Amonio basal ($p< 0.001$), Amonio a los 60 minutos ($p<0.001$) y Delta de Amonio ($p<0.001$).

Variables	ENCEFALOPATÍA HEPÁTICA		p
	SI	NO	
Sodio (media \pm DE)	138 \pm 4	139 \pm 3	0.202
Creatinina (media \pm DE)	1 \pm 0.4	0.9 \pm 0.2	0.05
Bilirrubina total (media \pm DE)	2.1 \pm 1.4	1.7 \pm 1.5	0.005
INR (media \pm DE)	1.4 \pm 0.4	1.3 \pm 0.2	0.003
AST (media \pm DE)	62 \pm 46	59 \pm 43	0.479
ALT (media \pm DE)	42 \pm 31	53 \pm 47	0.171
Glucosa (media \pm DE)	131 \pm 60	121 \pm 59	0.416
Insulina (media \pm DE)	19.9 \pm 12.2	19.1 \pm 10.9	0.793
HOMA (media \pm DE)	6.4 \pm 4.7	5.3 \pm 3.6	0.294
Albúmina (media \pm DE)	3523 \pm 698.21	3952.89 \pm 694.93	< 0.001
Leucocitos (media \pm DE)	5908 \pm 3005	5531 \pm 1833	0.979
Plaquetas (media \pm DE)	100 \pm 49	122 \pm 68	0.002
Amonio basal (media \pm DE)	86.9 \pm 46.3	68.2 \pm 40.3	< 0.001
Amonio 60 minutos (media \pm DE)	145.9 \pm 67.8	110.2 \pm 73.6	< 0.001
Δ Amonio (media \pm DE)	62.5 \pm 44.5	41.2 \pm 48.1	< 0.001

Tabla 46: Valores de las variables analíticas bioquímicas y hematológicas en pacientes con y sin EH.

5.4.3.- Variables asociadas a la respuesta a la SOG

Siguiendo la interpretación clásica de la SOG, de los 84 casos con EH, 52 casos (61,9%) presentaron una sobrecarga patológica (> 128 mg/dL). De los pacientes que no presentaron EH (n=167), 46 (31,6%) presentaron la sobrecarga patológica (p<0.0005) (Tabla 47. Figura 34).

Respuesta SOG	ENCEFALOPATIA HEPÁTICA		p
	SI	NO	
Normal	32	121	0.001
n	32	121	
%	38,1%	68,4%	
Patológica	52	46	
n	52	46	
%	61,9%	31,6%	

Tabla 47: Respuesta a la SOG en pacientes con y sin EH.

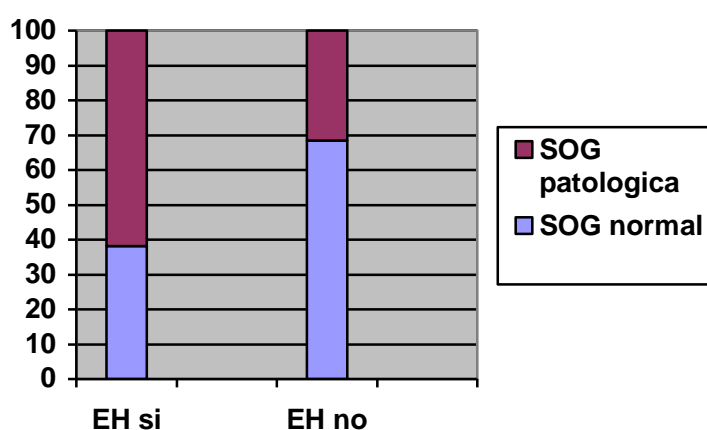


Figura 34: Respuesta a la SOG en pacientes con y sin EH

Como ya se ha comentado previamente, de la combinación de los valores del metabolismo basal y de la respuesta a la SOG (medida como Δ amonio), dividimos a los pacientes en tres grupos: pacientes con metabolismo normal, pacientes con metabolismo

parcialmente alterado y pacientes con metabolismo alterado. De los pacientes que sufrieron EH (n= 84), 14 (16,7%) presentaron un metabolismo del amonio normal, 32 (38,1 %) presentaron un metabolismo parcialmente alterado y 38 (45,2 %) presentaron un metabolismo totalmente alterado.

De los pacientes que no sufrieron episodios de EH (n=164), 74 (45,1 %) presentaron un metabolismo del amonio normal, 61 (37,2%) presentaron un metabolismo parcialmente alterado y 29 (17,7%) presentaron un metabolismo totalmente alterado.

Al analizar los casos de EH por grupo de metabolismo se encontró diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.0001$) entre los pacientes con y sin EH. Los casos y los porcentajes se muestran en la **tabla 48**.

Grupos de metabolismo	ENCEFALOPATIA HEPÁTICA		p
	SI	NO	
Normal	14	74	0.001
n	14	74	
%	16,7%	45,1%	
Parcialmente Alterado	32	61	
n	32	61	
%	38,1%	37,2%	
Alterado	38	29	
n	38	29	
%	45,2%	17,7%	

Tabla 48: Casos de EH por grupos de metabolismo.

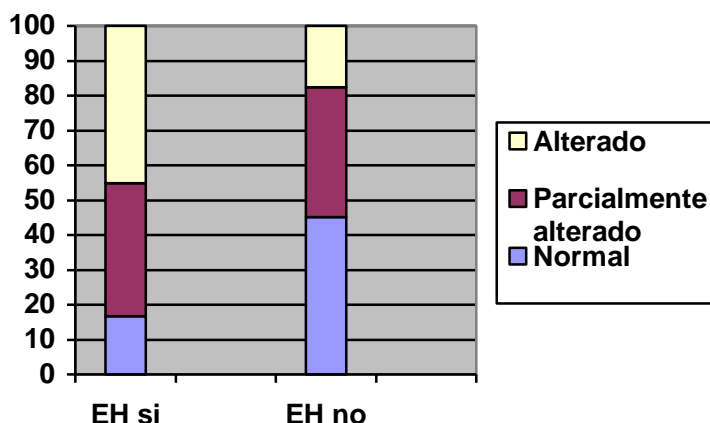


Figura 35: EH por grupos de metabolismo

5.4.3.1.- Impacto de la SOG en la Encefalopatía Hepática.

La interpretación actual de los resultados de la curva de la SOG se basa tan sólo en el valor del nivel del amonio a los 60 minutos tras la ingesta de glutamina, no teniendo en cuenta ni el valor basal ni el incremento de amonio (Δ amonio) a lo largo del tiempo. De tal manera que un valor superior a 128 mg/dL a los 60 minutos de la ingesta se considera patológico. En nuestro estudio de los 153 casos que presentaron un amonio a los 60 minutos de la sobrecarga oral de glutamina normal, es decir, inferior o igual a 128 mg/dL, 32 casos (20.9%) sufrieron un cuadro de EH. De los 98 pacientes que presentaron un amonio a los 60 minutos alterado, esto es, superior a 128 mg/dL, 52 casos (53.1%) presentaron un episodio de EH: Log Rank 39.622; $p < 0.0001$.

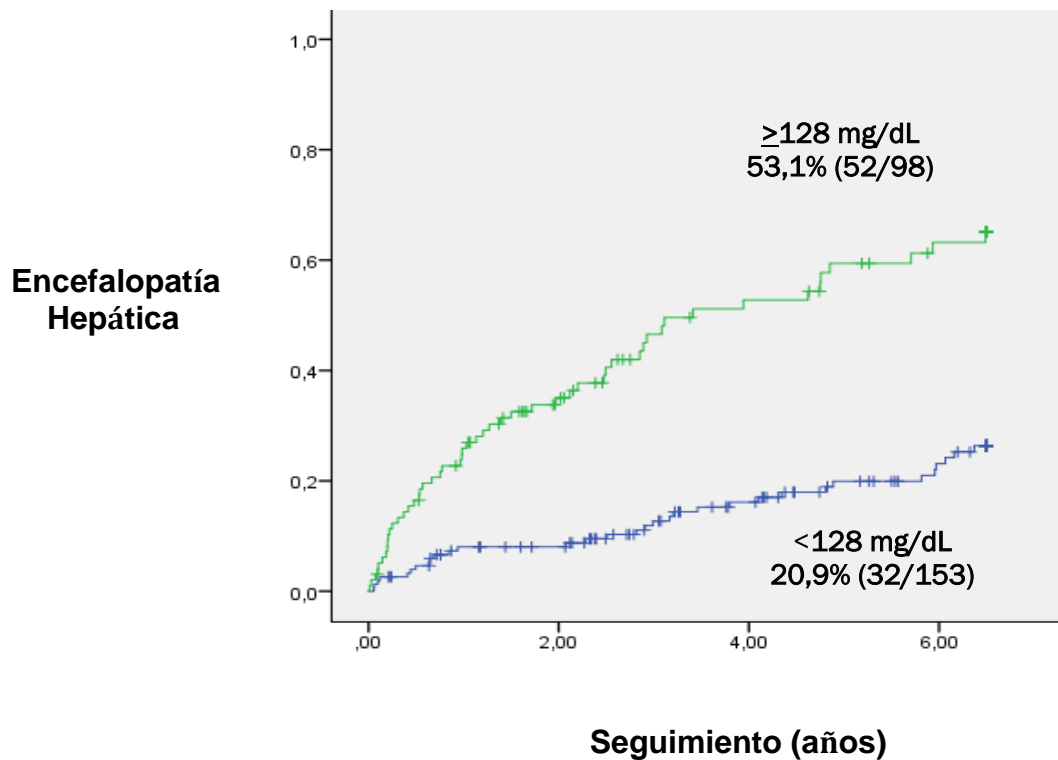


Figura 36: Impacto de la SOG en la EH en función de los valores del amonio a los 60 minutos

Sin embargo, en nuestra hipótesis de trabajo, no sólo tenemos en cuenta la respuesta a la sobrecarga, sino que se tienen en cuenta el valor de partida de amonio (basal) del paciente, así como el incremento del mismo que se produce tras la sobrecarga. Posteriormente, la interpretación conjunta del valor basal de amonio junto con el valor del Δ amonio (diferencia entre el amonio a los 60 minutos y el amonio basal) nos ha permitido clasificar a los pacientes en tres grupos respecto al metabolismo del amonio: metabolismo normal, metabolismo parcialmente alterado y metabolismo alterado.

Según el metabolismo basal, de los 162 casos que presentaron un metabolismo basal normal, es decir un amonio basal inferior o igual a 78 mg/dL, 41 casos (25,3%) sufrieron un cuadro de EH. De los 92 pacientes que presentaron un metabolismo basal alterado, esto es, superior a 78 mg/dL, 45 casos (48,9%) presentaron un episodio de EH: Log Rank 22.901; $p < 0.0001$.

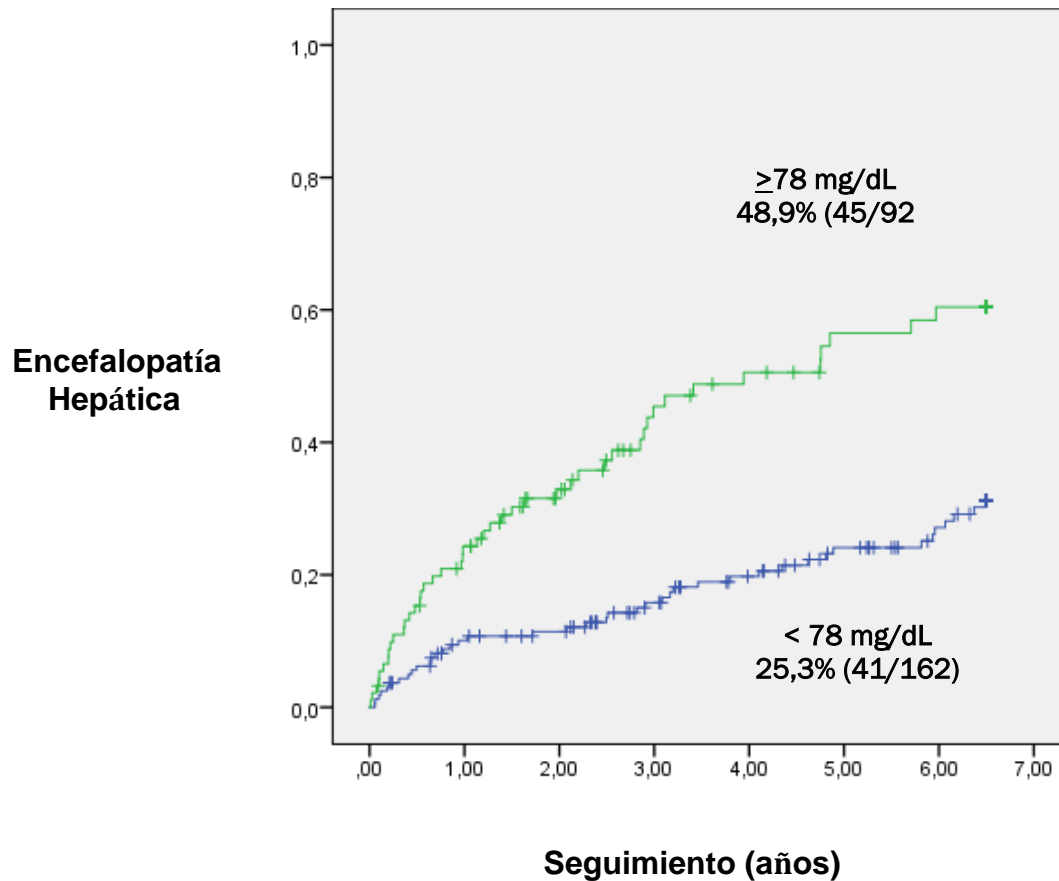


Figura 37: Impacto de la SOG en la EH en función de los valores del amonio basal.

Analizando los resultados según el Δ de amonio, de los 112 casos que presentaron un delta de amonio normal, es decir inferior o igual a 33 mg/dL, 19 casos (17%) sufrieron un cuadro de EH. De los 137 pacientes que presentaron un Δ de amonio alterado, esto es, superior a 33 mg/dL, 65 casos (47,4%) presentaron un episodio de EH: Log Rank 33.154; $p < 0.0001$.

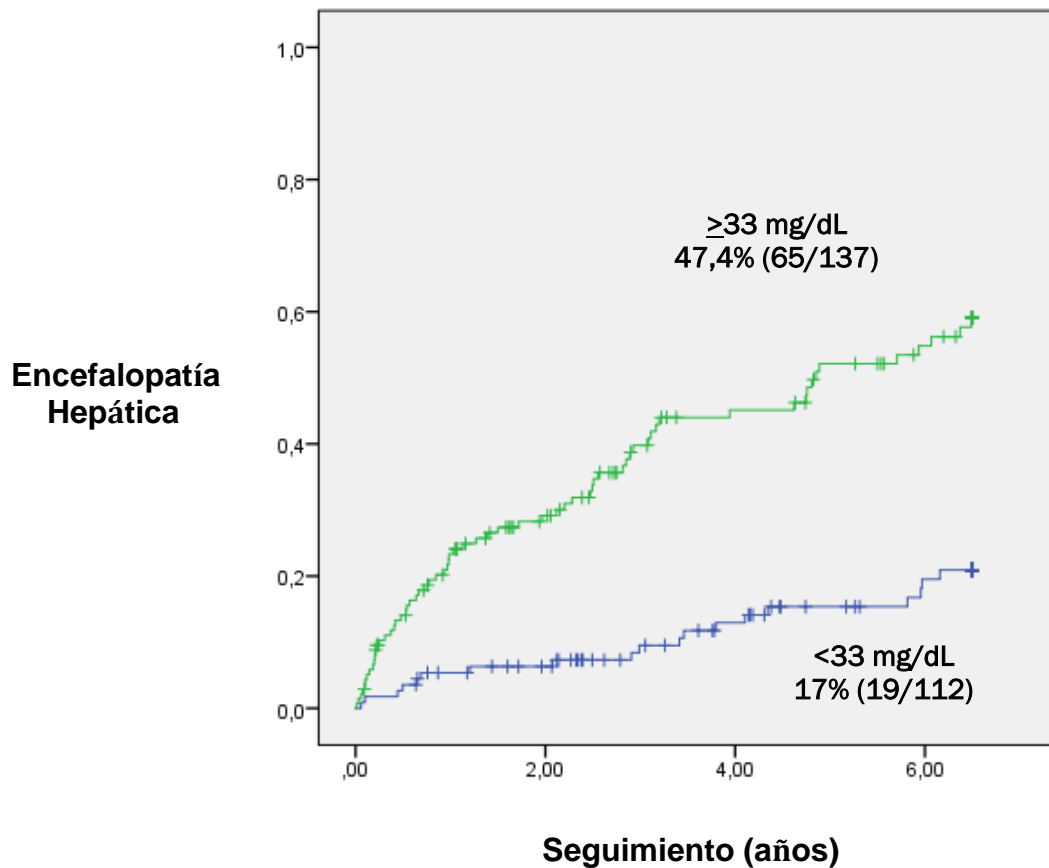


Figura 38: Impacto de la SOG en la EH en función de los valores del Δ amonio.

Al analizar de forma conjunta los resultados del amonio basal y Δ amonio, dividiendo los pacientes en cada uno de los grupos de metabolismo previamente descritos, obtenemos los siguientes resultados: 88 pacientes presentaron un metabolismo del amonio normal, de los cuales, 14 (15,9%) presentaron EH. 93 pacientes presentaron un metabolismo parcialmente alterado, 32 de ellos (34,4%) presentaron EH. Finalmente 67 pacientes presentaron un metabolismo alterado, 38 de ellos (56,7%) presentaron EH. Log Rank: 45.787; $p < 0.0001$.

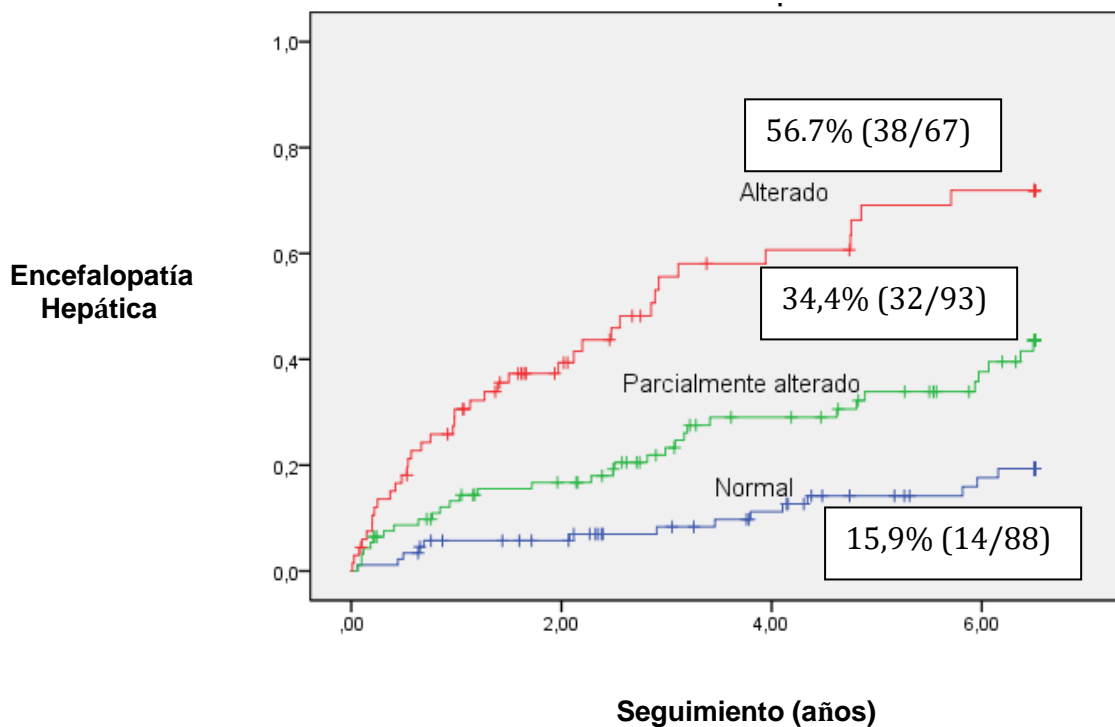


Figura 39: Impacto de la SOG en la EH por grupos de metabolismo.

Finalmente, cabe destacar que la prueba de la SOG resultó ser una prueba segura, ya que fue bien tolerada por todos los pacientes, no presentando ninguno de ellos efectos adversos.

5.4.3.2.- Propuesta de redefinición de SOG

Como ya se ha comentado anteriormente, la interpretación actual de los resultados de la SOG tiene tan sólo en cuenta el valor del amonio medido a los 60 minutos tras la administración de glutamina. Sin embargo, la sobrecarga oral de glutamina proporciona más información adicional que pensamos puede ser de gran utilidad en el manejo de los pacientes. Por un lado, proporciona datos sobre el valor basal de amonio del paciente y por otra parte aporta también el valor de la diferencia entre el valor medido a los 60 minutos de la sobrecarga y el valor basal (Δ amonio). Teniendo todo esto en cuenta, junto con los otros factores relacionados de manera independiente con la EH (Child Pugh ($p < 0.001$), Meld ($p < 0.001$), Bilirrubina total

($p < 0.001$), INR ($p = 0.003$), Albúmina ($p < 0.001$), Plaquetas ($p = 0.002$), amonio basal ($p < 0.001$), amonio a los 60 minutos ($p < 0.001$), Δ amonio ($p < 0.001$)) realizamos un análisis de riesgo en el que se incluyó el amonio basal, amonio medido a los 60 minutos tras la sobrecarga y el Δ amonio. En este modelo sólo el Δ amonio se asoció de manera independiente con la EH (HR: 2.34 (95 % IC: 1.25-4.42); $p = 0.008$). Como ya hemos referido anteriormente el Δ amonio se obtiene de la diferencia entre el valor de amonio a los 60 minutos y el valor basal del mismo, este hecho podría explicar que este sea el parámetro que se asocie de manera independiente porque en realidad contempla los otros dos valores. En segundo lugar, realizamos un segundo modelo en el que se tuvieron en cuenta los tres tipos de metabolismo del amonio que hemos descrito en función de la combinación del amonio basal y el delta de amonio. En este caso, y tomando como referencia los pacientes con metabolismo de amonio normal, los pacientes con metabolismo del amonio parcialmente alterado (HR: 2.62 (95 % IC: 1.40-4.93); $p = 0.03$), los pacientes con metabolismo del amonio totalmente alterado (HR: 6.55 (95 % IC: 3.5-12.18); $p = 0.0001$), la edad (HR: 1.030 (95% IC:1.006-1.054); $p = 0.014$) el Meld inicial (HR: 1.063 (95 % IC: 1.001-1.129); $p = 0.045$) y la albúmina (HR:0.99 (95 % IC:0.99-1.00); $p = 0.001$) se asociaron de manera independiente con la EH.

Como resumen podemos concluir que la definición actual de la SOG sólo tiene en cuenta el valor de amonio a los 60 minutos tras la sobrecarga oral con glutamina, sin embargo este valor no se asocia de manera independiente con la EH, sin embargo si utilizamos el valor del Δ amonio y la combinación de éste junto con el amonio basal que da lugar a la clasificación de los pacientes en los tres grupos ya vistos según el metabolismo del amonio sí conseguimos una asociación de manera independiente con la EH lo que nos permitiría clasificar a los pacientes en distintos grupos de riesgo para desarrollar dicha enfermedad.

5.4.4.- Prevalencia de EHM.

La presencia de EHM, se constató mediante la evaluación de dos pruebas: Realización de Tests Psicométricos (PHES) y Frecuencia Crítica del Parpadeo (FCP). Estas pruebas se realizaron el mismo día de la SOG, de forma previa en el tiempo a la misma.

El diagnóstico de EHM se realizó cuando el valor de los PHES fue inferior a -4 y el de la FCP inferior o igual a 39. No se encontraron diferencias estadísticas significativas para ninguna de los dos tests entre los grupos con y sin EH (**Tablas 49 y 50**).

PHES	ENCEFALOPATIA HEPÁTICA		p
	SI	NO	
Normal	n 23	64	0.096
	% 60,5%	77,1%	
Patológico	n 15	19	
	% 39,5%	22,9%	

Tabla 49: Resultados de los PHES en pacientes con y sin EH.

FCP	ENCEFALOPATIA HEPÁTICA		p
	SI	NO	
Normal	n 17	47	0.530
	% 53,12%	61,8%	
Patológica	n 15	29	
	% 46,9%	38,2%	

Tabla 50: Resultado de la FCP en pacientes con y sin EH.

5.4.5.- Variables genéticas en la predicción de EH.

La incidencia de cada uno de los SNPs que componen el haplotipo TACC respecto la EH se resume en las tablas 51-54. De los pacientes que presentaron EH, el 70.4% presentaron el polimorfismo TT, el 20.4 % presentaron el polimorfismo TC y el 9.1 % presentaron el polimorfismo CC del SNP 1 (rs3771310-intrón 6). De los pacientes que no presentaron EH, la distribución de los distintos polimorfismos fue: 50.5 % TT, 37.6 % TC y 11.8 % CC. La diferencia entre los pacientes con y sin EH fue estadísticamente significativa ($p=0.038$) (**Tabla 51**).

		ENCEFALOPATIA HEPÁTICA		p
		SI	NO	
TT	n	31	47	0.038
	%	70,4%	50,5%	
TC	n	9	35	
	%	20,4%	37,6%	
CC	n	2	11	
	%	9,1%	11,8%	

Tabla 51: Distribución del SNP 1 (rs3771310-intrón 6) en los pacientes con y sin EH.

Respecto al SNP 2 (rs6743496-intrón 7), de los pacientes que presentaron EH, el 50% presentaron el polimorfismo GG, el 33.3% GA y el 16.7% AA. De los pacientes que no presentaron EH, el 23.6 % presentó el polimorfismo GG, el 50.5% GA y el 25.8 % AA. La diferencia entre los pacientes con y sin EH respecto a este SNP 2 fue también estadísticamente significativa ($p=0.01$) (**Tabla 52**)

	ENCEFALOPATIA HEPÁTICA		p
	SI	NO	
GG	n	21	0.01
	%	50%	
GA	n	14	
	%	33,3%	
AA	n	7	
	%	16,6%	

Tabla 52: Distribución del SNP 2 (rs6743496-intrón 7) en los pacientes con y sin EH.

De los pacientes con EH, el 47,6% presentaron el polimorfismo TT del SNP 3 (rs2883713-intrón 9), el 28,6% TC y 23,8% CC. De los pacientes que no presentaron EH la distribución de los distintos polimorfismos fue: 22,8% TT, 50% TC y 27,2% CC. Se encontró diferencias estadísticamente significativas entre los pacientes con y sin EH ($p=0.011$) (**Tabla 53**).

	ENCEFALOPATIA HEPÁTICA		p
	SI	NO	
TT	n	20	0.011
	%	47,6%	
TC	n	12	
	%	28,6%	
CC	n	10	
	%	23,8%	

Tabla 53: Distribución del SNP 3 (rs2883713-intrón 9) en los pacientes con y sin EH

Para el último SNP (SNP 4: rs3088307-3 UTR) del haplotipo TACC, la distribución de los diferentes polimorfismos fue la siguiente: de los pacientes con EH el 27,5% fue GG, el 40% GC y el 32,5% CC. De los pacientes sin EH el 10,1% fue GG, el 52,8% GC y el 37,1% CC. Hubo diferencias significativas entre los pacientes con y sin EH ($p=0.039$) (**Tabla 54**).

		ENCEFALOPATIA HEPÁTICA		p
		SI	NO	
GG	n	11	9	0.039
	%	27,5%	10,1%	
GC	n	16	47	
	%	40%	52,8%	
CC	n	13	33	
	%	32,5%	37,1%	

Tabla 54: Distribución del SNP 4 (rs3088307-3 UTR) en los pacientes con y sin EH

De los pacientes con EH, el haplotipo TACC lo presentaron el 48.9% frente al 51,1% que no lo presentaron. De los pacientes que no presentaron EH, el haplotipo TACC se encontró en el 61,3%. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos ($p=0.217$) (**Tabla 55**).

		ENCEFALOPATIA HEPÁTICA		p
		SI	NO	
Si	n	22	65	0.217
	%	48,9%	61,3%	
No	n	23	41	
	%	51,1%	38,7%	

Tabla 55: Distribución del Haplotipo TACC en los pacientes con y sin EH.

Respecto al estudio del microsatélite largo descrito previamente, de los pacientes con EH el 80,4% no lo presentaron, encontrándose un porcentaje muy similar, 85,3%, en los pacientes sin EH. La diferencia entre ambos grupos no fue estadísticamente significativa ($p=0.478$) (**Tabla 56**).

		ENCEFALOPATIA HEPÁTICA		p
		SI	NO	
Si	n	9	16	0.478
	%	19,6%	14,7%	
No	n	37	93	
	%	80,4%	85,3%	

Tabla 56: Distribución del microsatélite en los pacientes con y sin EH.

Desde el punto de vista genético, ni el haplotipo TACC ni la presencia del microsatélite largo se asociaron con un mayor riesgo de desarrollar EH. Sin embargo, cuando se analizaron los distintos SNPs que componen el haplotipo TACC de manera independiente, sí se vio que los pacientes con y sin EH presentaron los distintos polimorfismos de los distintos SNPs en distintos porcentajes, siendo todos ellos estadísticamente significativos.

5.5.- Tipos de EH según el metabolismo del amonio.

En los pacientes con EH se analizaron los valores (media \pm DS) de distintas variables por grupos de metabolismo del amonio, es decir, valorando la respuesta a la SOG. Los valores se muestran en la **tabla 57**.

VARIABLES	Metabolismo del amonio	EH	
		SI	p
Edad	Normal	63.4 ± 9.1	0.089
	Parcialmente Alterado	60.2 ± 12.1	
	Totalmente Alterado	56.3 ± 10.4	
MELD inicial	Normal	9.8 ± 2.8	0.001
	Parcialmente Alterado	11.4 ± 3.4	
	Totalmente Alterado	14.1 ± 4.6	
Albúmina	Normal	3888 ± 551	0.039
	Parcialmente Alterado	3576 ± 767	
	Totalmente Alterado	3344 ± 659	
AST	Normal	46 ± 26	0.211
	Parcialmente Alterado	61 ± 46	
	Totalmente Alterado	72 ± 52	
ALT	Normal	33 ± 24	0.267
	Parcialmente Alterado	40 ± 34	
	Totalmente Alterado	49 ± 32	
Creatinina	Normal	0.9 ± 0.2	0.408
	Parcialmente Alterado	1.1 ± 0.4	
	Totalmente Alterado	1 ± 0.4	
Sodio	Normal	138 ± 3	0.981
	Parcialmente Alterado	139 ± 5	
	Totalmente Alterado	139 ± 4	
	Normal	140 ± 63	

Glucosa	Parcialmente Alterado	124 ± 50	0.646
	Totalmente Alterado	123 ± 56	
Insulina	Normal	21.8 ± 14.9	0.04
	Parcialmente Alterado	14.7 ± 7.4	
	Totalmente Alterado	23.9 ± 12.9	
Bilirrubina Total	Normal	1.5 ± 1.0	0.011
	Parcialmente Alterado	1.6 ± 0.8	
	Totalmente Alterado	2.6 ± 1.7	
Leucocitos	Normal	5946± 3042	0.750
	Parcialmente Alterado	6272± 3056	
	Totalmente Alterado	5515 ± 3116	
Plaquetas	Normal	113± 58	0.307
	Parcialmente Alterado	106 ± 57	
	Totalmente Alterado	91 ± 41.4	
INR	Normal	1.3 ± 0.1	0.042
	Parcialmente Alterado	1.3 ± 0.1	
	Totalmente Alterado	1.5 ± 0.5	

Tabla 57: Pacientes con EH: análisis de variables por grupos de metabolismo del amonio.

Analizando cada una de las variables se observa lo siguiente:

1º) Edad: Los pacientes con EH y un metabolismo del amonio normal fueron de mayor edad que aquellos con un metabolismo parcialmente alterado o alterado (63.4 vs. 60.2 vs. 56.3). No se encontró diferencia significativa entre los distintos grupos (p=0.089).

2º) MELD inicial: Los pacientes con EH y metabolismo del amonio normal presentaron un índice MELD inicial menor que aquellos con un metabolismo parcialmente alterado o alterado (9.9 vs. 11.4 vs. 14.1), encontrándose diferencias estadísticamente significativas entre los grupos ($p= 0.001$).

3º) Albúmina: Los pacientes con EH y metabolismo del amonio normal presentaron valores de albúmina en suero superiores que aquellos con un metabolismo parcialmente alterado o alterado (3888 vs. 3576 vs. 3344 g/dL). Entre los tres grupos del metabolismo del amonio si se encontró diferencias estadísticamente significativas ($p=0.039$).

4º) AST: Los pacientes con EH y metabolismo del amonio normal presentaron valores de AST inferiores que aquellos con un metabolismo parcialmente alterado o alterado (46 vs. 61 vs. 72 U/L). Entre los tres grupos del metabolismo del amonio no se encontró diferencias estadísticamente significativas ($p=0.211$).

5º) ALT: Los pacientes con EH y metabolismo del amonio normal presentaron valores de ALT inferiores que aquellos con un metabolismo parcialmente alterado o alterado (33 vs. 40 vs. 49 U/L). No se encontró diferencia estadísticamente significativa entre los tres grupos ($p=0.267$).

6º) Creatinina: Los pacientes con EH y metabolismo normal del amonio presentaron valores de creatinina inferiores que aquellos con metabolismo parcialmente alterado o alterado (0.9 vs. 1.1 vs. 1 mg/dL). No hubo diferencia estadísticamente significativa entre los grupos ($p=0.408$).

7º) Sodio: Los valores de sodio de los pacientes con EH fue prácticamente igual en los tres grupos de metabolismo del amonio (138 vs. 139 vs. 139 mEq/L), no habiendo, por tanto, diferencias estadísticamente significativas ente los mismos ($p=0.981$).

8º) Glucosa: Los pacientes con EH y metabolismo del amonio normal presentaron valores de glucosa superiores a aquellos con metabolismo parcialmente alterado o alterado (140 vs. 124 vs. 123 mg/dL). No hubo diferencias estadísticamente significativas entre los grupos ($p=0.646$).

9°) Insulina: Respecto a la insulina, los pacientes con metabolismo normal y metabolismo alterado del amonio presentaron valores superiores (21.8 vs. 23.9 $\mu\text{U}/\text{mL}$ respectivamente) frente a aquellos con un metabolismo parcialmente alterado (14.7). Sí se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos ($p=0.04$).

10°) Bilirrubina total: Los pacientes con EH y metabolismo normal del amonio presentaron valores de bilirrubina total inferiores que aquellos con metabolismo parcialmente alterado o alterado (1.5 vs. 1.6 vs. 2.6 mg/dL). Hubo diferencia estadísticamente significativa entre los grupos ($p=0.011$).

11°) Leucocitos: Los pacientes con metabolismo normal y parcialmente alterado del amonio presentaron valores superiores de leucocitos (5946 vs. 6272 $\times 10^9/\text{L}$ respectivamente) que aquellos con un metabolismo totalmente alterado (5515). No hubo diferencias estadísticamente significativas entre los grupos ($p=0.750$).

12°) Plaquetas: Los pacientes con EH y metabolismo del amonio normal presentaron valores de recuento plaquetario superiores a aquellos con metabolismo parcialmente alterado o alterado (113 vs. 106 vs. 91 $\times 10^9/\text{L}$). No hubo diferencias estadísticamente significativas entre los grupos ($p=0.307$).

13°) INR: Los pacientes con EH y metabolismo del amonio normal presentaron valores de INR inferiores a aquellos con metabolismo parcialmente alterado o alterado (1.3 vs. 1.3 vs. 1.5). La diferencia entre los grupos fue estadísticamente significativa ($p=0.042$).

Con todos estos datos, se observa que aquellos pacientes con EH y con una respuesta a la SOG normal, es decir, con un metabolismo del amonio normal, presentan alterados aquellos parámetros analíticos asociados la inflamación: presentan una edad mayor, mayores niveles de glucosa y de insulina y, por tanto, de resistencia a la insulina, y valores superiores de recuento leucocitario (**Figuras 40-42**).

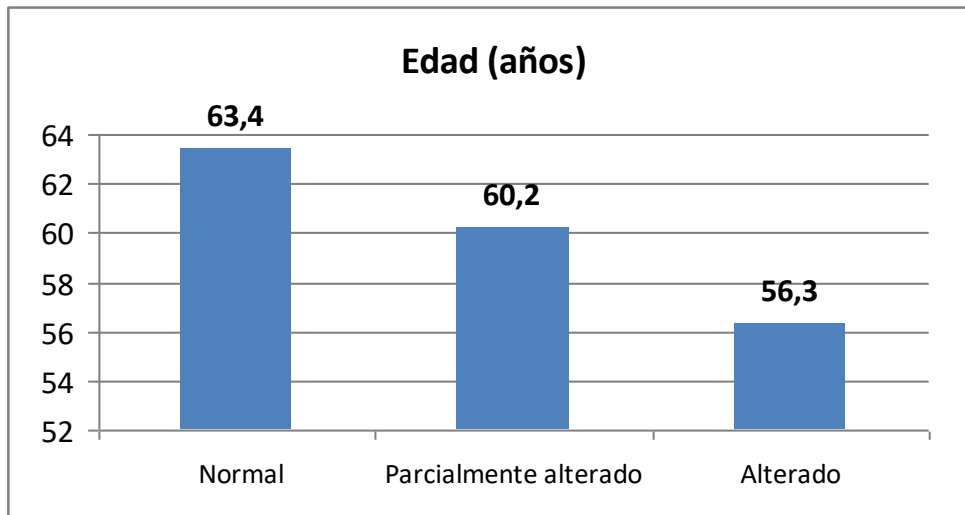


Figura 40: Edad media por grupos de metabolismo en los pacientes con EH.

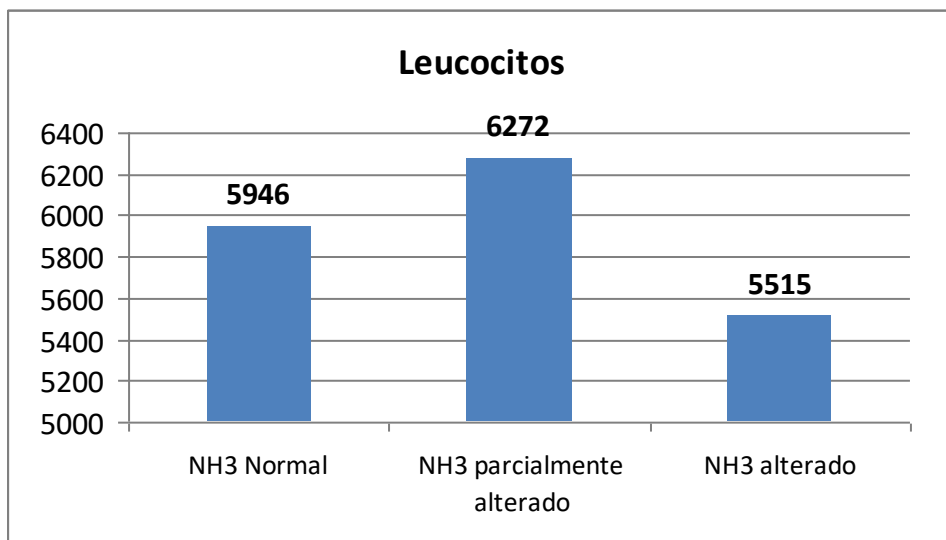


Figura 41: Valores de recuento leucocitario por grupos de metabolismo en los pacientes con EH.

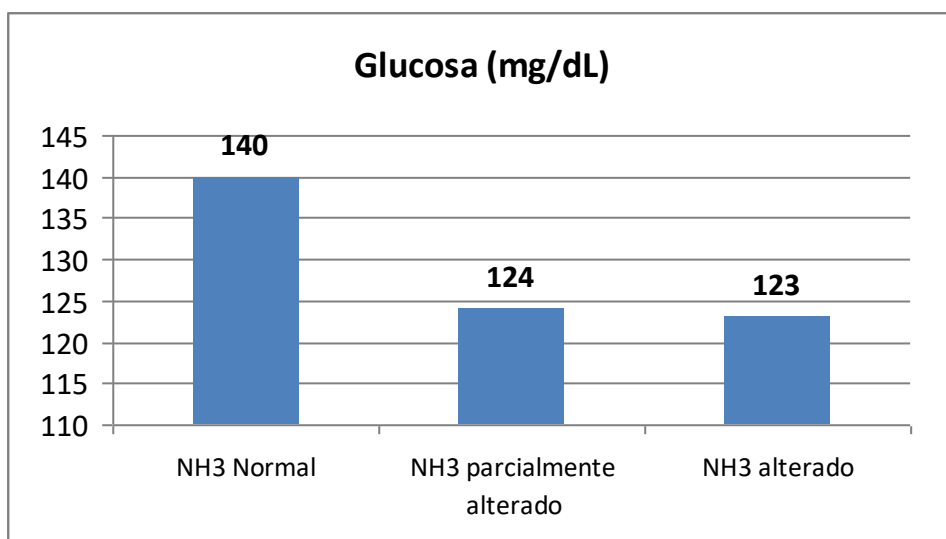


Figura 42: Valores de glucosa por grupos de metabolismo en los pacientes con EH.

Por otro lado, aquellos pacientes con EH y con una respuesta alterada a la SOG, es decir con un metabolismo del amonio parcialmente alterado o totalmente alterado, presentan alterados aquellos parámetros asociados a disfunción hepática: así presentan valores mayores del índice MELD inicial, valores inferiores de albúmina sérica y de plaquetas y valores superiores de enzimas hepáticas (AST y ALT), de bilirrubina total y de INR (**Figura 43-49**).

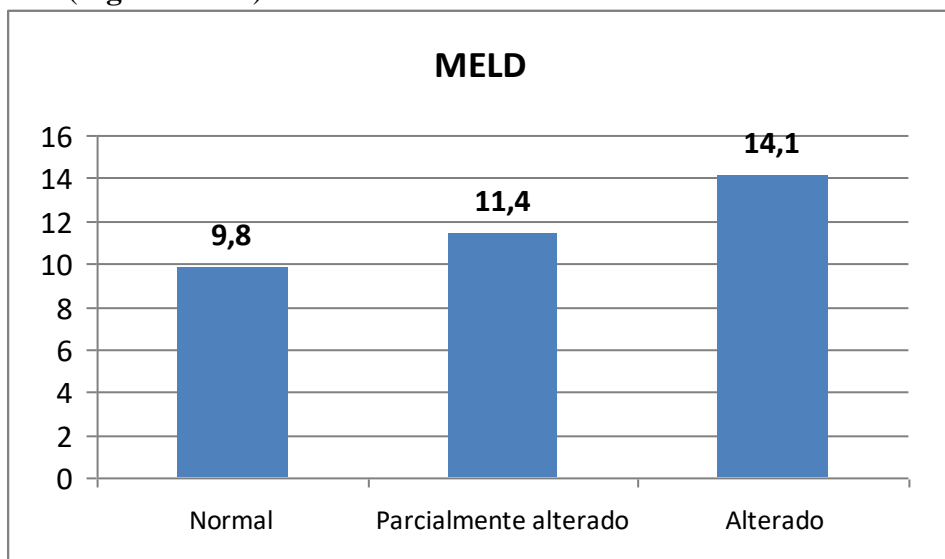


Figura 43: Índice MELD por grupos de metabolismo en los pacientes con EH

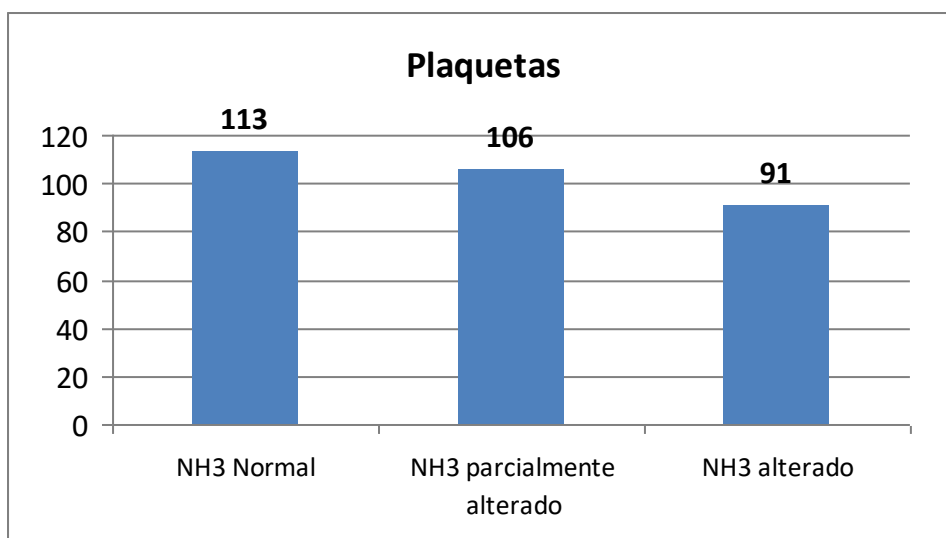


Figura 44: Valores de recuento plaquetario por grupos de metabolismo en los pacientes con EH.

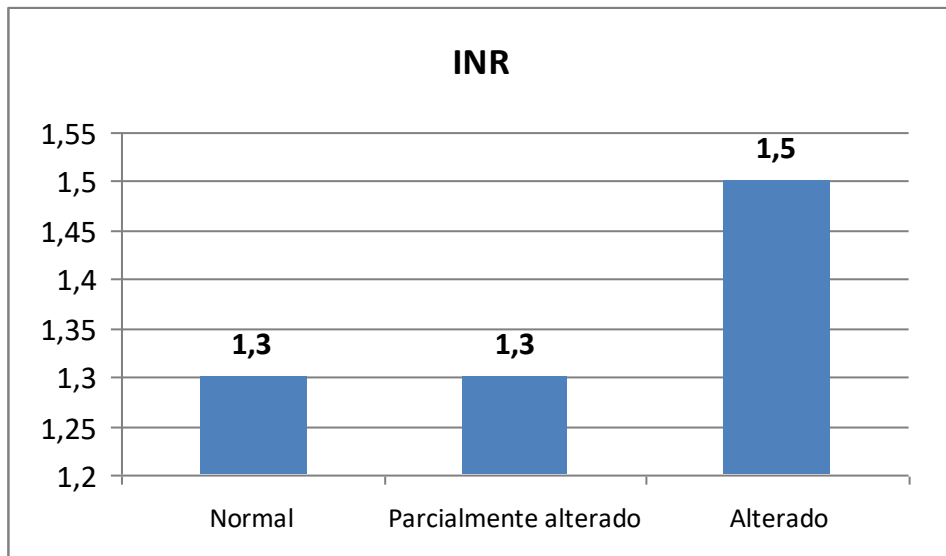


Figura 45: Valores de INR por grupos de metabolismo en los pacientes con EH.

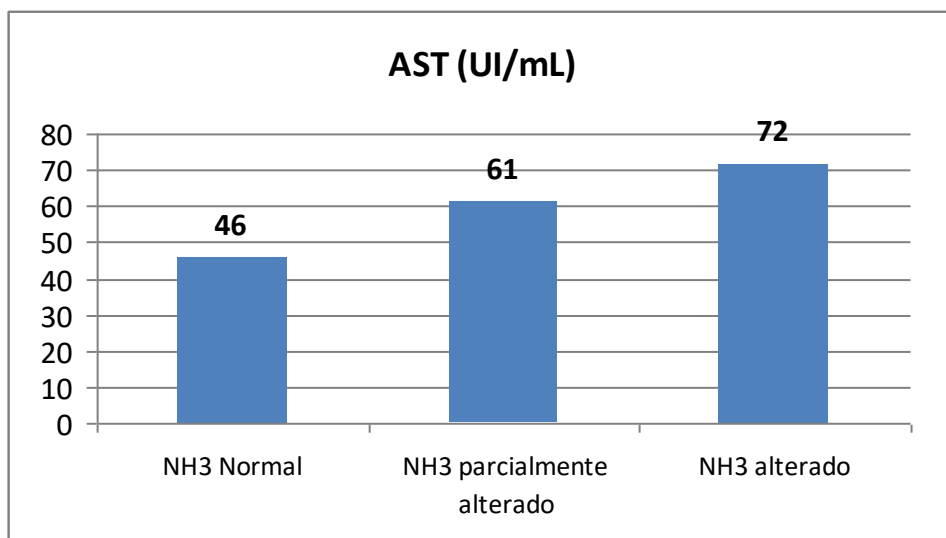


Figura 46: Valores de AST por grupos de metabolismo en los pacientes con EH.

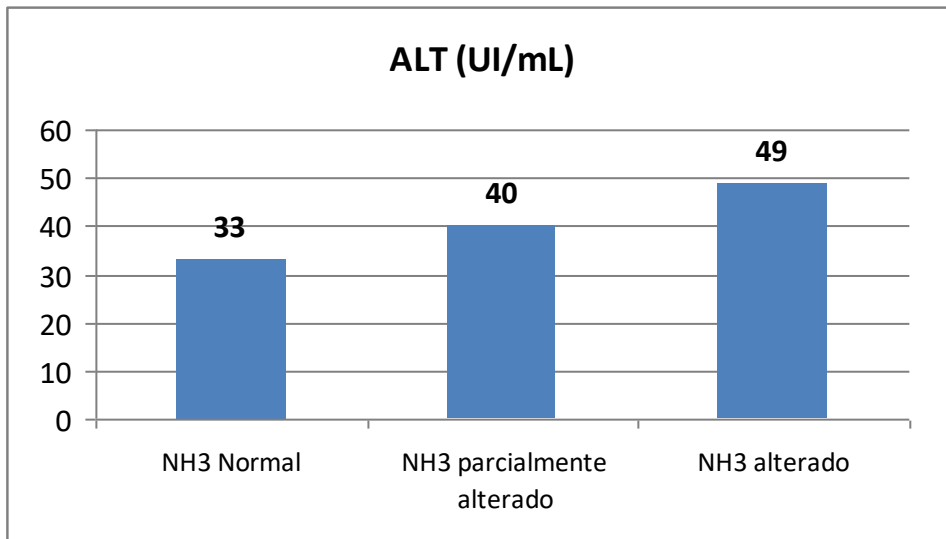


Figura 47: Valores de ALT por grupos de metabolismo en los pacientes con EH.

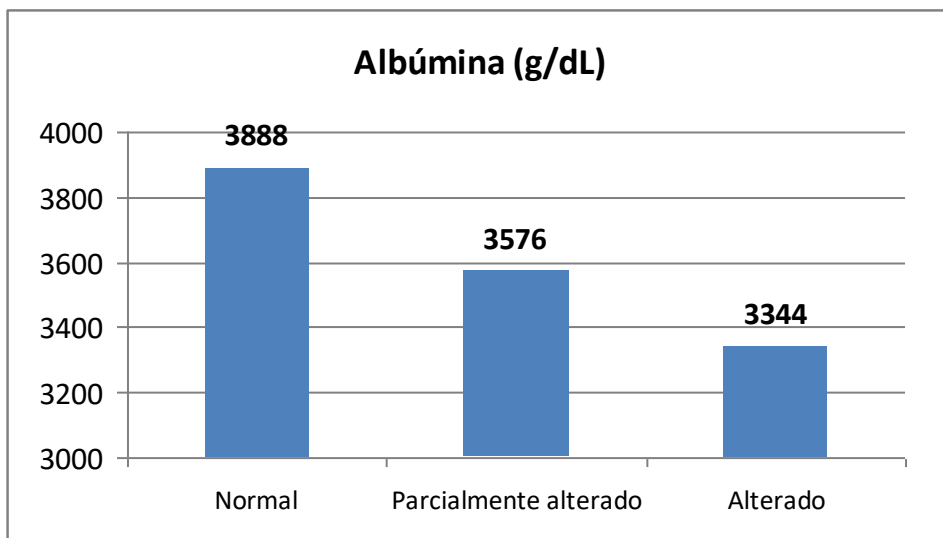


Figura 48: Valores de albúmina por grupos de metabolismo en los pacientes con EH.

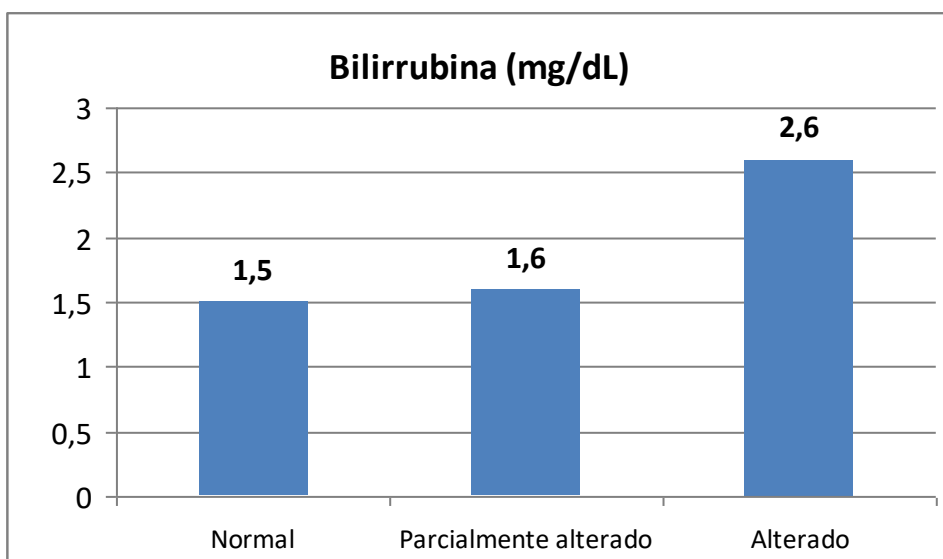


Figura 49: Valores de bilirrubina por grupos de metabolismo en los pacientes con EH.

Por tanto, estos datos nos permiten clasificar la EH en dos tipos, una asociada a disfunción hepática y otra asociada a la inflamación.

6.- Discusión.

La EH es una enfermedad que afecta a un tercio de los pacientes con cirrosis hepática, siendo considerada una de las complicaciones mayores de dicha patología **(Romero-Gómez y cols., 2014)**. Sin embargo, los datos exactos, en cuanto a incidencia y prevalencia se refieren, son difíciles de conocer ya que, a veces, las manifestaciones clínicas no son claramente evidentes, lo que ha hecho que se desarrollen múltiples herramientas para su detección **(Vilstrup H y cols., 2014)**, dificultando también este hecho la exactitud de los datos.

Un diagnóstico correcto de la EH es necesario por varios motivos, entre los que cabe destacar:

1. Actualmente, se sabe con exactitud que tras un episodio de EH aparecen secuelas a nivel cerebral que favorecen un deterioro cognitivo precoz **(Bajaj y cols., 2010; Riggio y cols., 2011)**.
2. La EH es la descompensación de la cirrosis hepática que provoca un peor pronóstico de la enfermedad a corto plazo **(Planas y cols., 2004)**.
3. El riesgo de recurrencia tras un primer episodio de EH se sitúa en torno al 40% en el primer año **(Romero-Gómez y cols., 2001)**.
4. La supervivencia al año de haber presentado el primer episodio de EH se sitúa en torno al 50%, pudiendo descender hasta el 15-23% a los tres años del primer episodio **(Bustamante y cols., 1999; Planas y cols., 2004)**.
5. Los pacientes con EH tienen un mayor riesgo de caídas **(Tapper y cols., 2015)** y accidentes de tráfico **(Bajaj y cols., 2008)**.
6. La EH es la principal causa de hospitalización en pacientes cirróticos **(Tapper y cols., 2016; Di Pascoli M y cols., 2017)**.
7. La aparición de signos por primera vez de EH es motivo suficiente para indicar posibilidad de trasplante cardiaco.

Sin embargo, este diagnóstico no siempre resulta fácil de realizar de forma precoz. La EH en estadios iniciales, EHM, es una de las entidades que más dificultad

diagnóstica presenta, debido a que la clínica en el momento del diagnóstico no es evidente siendo necesario la utilización de pruebas neuropsicométricas y neurofisiológicas. La detección precoz de EHM es importante por:

1. Aproximadamente el 84% de los pacientes que desarrollan EH durante el seguimiento presentan EHM en el estudio basal (**Ferenci y cols., 2002**)
2. Existe clara evidencia de que la presencia de EHM afecta la calidad de vida, incluyendo su aptitud laboral, de los pacientes (**Groeneweg y cols., 2000**).
3. En el año 2018 Ampuero y cols., publicaron un estudio multicéntrico de 320 pacientes seguidos prospectivamente durante 5 años, en el que demostraron que la presencia de EHM se asociaba con una progresión más agresiva de la enfermedad (**Ampuero y cols., 2018**).

Por todo lo dicho anteriormente, es fundamental prevenir el desarrollo de EH. Identificar a los pacientes de riesgo permitiría diseñar estudios farmacológicos encaminados a la prevención y a una mejora de las opciones terapéuticas que se les puede ofrecer a estos pacientes (**Riggio y cols., 2015**). Además, la detección de pacientes con mayor riesgo de presentar EH permitiría un seguimiento más exhaustivo de los mismos con revisiones más frecuentes, proporcionando una formación al paciente y familiares que ayuden a evitar los posibles desencadenantes (**Riggio y cols., 2015**). Es necesario, por tanto, disponer de herramientas que permitan estratificar a los pacientes en distintos grupos de riesgo y así poder actuar de manera preventiva sobre ellos. Para que estas herramientas sean útiles deben permitir realizar un screening a todos los pacientes con cirrosis para lo cual deben ser pruebas simples, baratas y que pueden ser utilizadas durante el seguimiento rutinario de estos pacientes (**Tapper y cols., 2018**).

En los últimos años, se han publicado algunos estudios en los que se ha propuesto distintos modelos que permitirían estratificar a los pacientes en distintos grupos de riesgos para desarrollar EH. Así, en el año 2015 Riggio y cols., publicaron un estudio observacional prospectivo en el que siguieron a un total de 216 pacientes cirróticos durante 14.7 ± 11.6 meses. En el análisis multivariante que realizaron el desarrollo de EH durante el seguimiento se relacionó con la presencia de EH previa, y de EHM diagnosticada mediante tests psicométricos y con niveles de albúmina

inferiores a 3.5 g/dL (ABC= 0.74, 95% IC:0.66-0.83). Se creó un segundo modelo en el que se excluyó la EHM dejando los otros dos parámetros (ABC= 0.71, 95% IC:0.63-0.78). No hubo diferencia estadísticamente significativa entre los dos modelos en la capacidad de identificar pacientes en riesgo de EH (p=0.104). Se realizó un tercer modelo en el que se excluyeron los pacientes con episodios de EH previa. En este análisis las únicas variables que se asociaron significativamente de forma independiente con el desarrollo de EH fueron la presencia de EHM y la albúmina (Área bajo la curva. (AUROC): 0.72). Como conclusión final, los autores sugieren que se puede predecir la posibilidad de desarrollar EH, principalmente usando el modelo que incluye los niveles de albúmina, episodios de EH previa, así como la presencia de EHM diagnosticada mediante tests psicométricos. En caso de que estos últimos no estuvieran disponibles, con los dos otros parámetros también se obtienen buenos resultados. Tres años más tarde, en el año 2018, Tapper y cols., han publicado un estudio retrospectivo de 1979 pacientes sin episodios de EH previa y seguidos durante 5 años. Diseñaron dos modelos multivariantes, uno con los datos basales de los pacientes y el otro con los datos obtenidos longitudinalmente en el tiempo, y en los que incluyeron cuatro parámetros de fácil obtención: dos pruebas de laboratorio rutinarias (bilirrubina total y albúmina) y la toma o no de dos medicamentos (estatinas y beta bloqueantes no selectivos), información obtenida durante la anamnesis. Estos modelos presentaron un AUROC de 0.68 (0.66-0.70) y de 0.73 (0.71-0.75), respectivamente, concluyendo que el riesgo de los pacientes con cirrosis para desarrollar EH pueden ser estratificados utilizando este simple modelo. No obstante, son conscientes de que al tratarse de un estudio retrospectivo necesitaría una validación externa prospectiva. Además de esta limitación, Ridola y col., apuntan como otras limitaciones el hecho de que este estudio no tenga en cuenta los episodios previos de EH, así como el uso inadecuado de métodos estadísticos en el análisis de resultados. Estos estudios predicen el desarrollo o no de EH pero no estratifican a los pacientes en distintos grupos de riesgo.

En nuestro estudio, presentamos una redefinición en la interpretación de los resultados de la SOG que ayudaría a estratificar el riesgo de EH en los pacientes cirróticos. La SOG es una curva de estimulación que consiste en medir los niveles de amonio basal y a los 60 minutos tras la ingesta de 10 gramos de glutamina. Hasta ahora el resultado de la misma se considera patológico o no en función del valor de amonio a los 60 minutos, independientemente del valor de amonio basal de partida y del

incremento del mismo que se produce durante la sobrecarga. En el año 2002 Romero-Gómez y cols, situaron el punto de corte en 128 $\mu\text{g/dL}$ y sus resultados se utilizaban como un marcador pronóstico y de mortalidad en la EH (**Romero-Gómez y cols., 2002**). En nuestro estudio proponemos tener en cuenta tanto el valor basal de amonio como el Δ del amonio (diferencia entre los valores de amonio a los 60 minutos y el amonio basal) de tal manera que la combinación de ambos nos permite realizar una clasificación de los pacientes en tres grupos de riesgo para desarrollar EH (pacientes con metabolismo del amonio normal, pacientes con metabolismo del amonio parcialmente alterado y pacientes con metabolismo totalmente alterado). La clasificación de los pacientes en estas tres categorías usando la combinación de datos descrita permite identificar mejor a los pacientes de riesgo que la definición clásica que tan sólo tiene en cuenta el valor del amonio a los 60 minutos tras la sobrecarga. La potencia de nuestro estudio frente al del año 2002 se basa, en primer lugar, en que hay que tener en cuenta que en el primer estudio el número de pacientes fue de 70 frente a los 256 pacientes incluidos en nuestro trabajo. En segundo lugar, también existe una diferencia importante en el tiempo de seguimiento, 10 meses frente a los 6 años de nuestro estudio estudio.

Clasificando a los pacientes en estos tres grupos de riesgo para EH, los pacientes con metabolismo normal de amonio presentaron un riesgo de desarrollar EH de 15,9%, frente al 34,4% de los pacientes con metabolismo parcialmente alterado y el 56,7% de los pacientes con metabolismo totalmente alterado, lo que nos permitiría clasificar a los pacientes en de bajo, intermedio y alto riesgo para desarrollar EH a lo largo del tiempo.

Esta interpretación de la SOG, nos permite observar que los pacientes con metabolismo del amonio alterado y parcialmente alterado presentaron niveles más elevados que los pacientes con metabolismo normal de los parámetros de disfunción hepática: bilirrubina total (2.60 vs. 1.91 vs. 1.18 mg/dL), AST (64.97 vs 63.05 vs. 54.74 U/L), recuento de plaquetas (90.65 vs 119.54 vs 124.86 $\times 10^9/\text{L}$) e INR (1.47 vs 1.31 vs 1.16)

Por otro lado, en los pacientes sin alteración del metabolismo del amonio se encontraron alterados parámetros relacionados con la inflamación que no se observaron en los pacientes con un metabolismo parcialmente alterado y alterado: edad (63.36 vs 60.22 vs 56.30), glucosa en sangre (140.08 vs 124.14 vs 123.28 mg/dL) y leucocitos (5946.15 vs 6272.22 vs 5515 $\times 10^9/\text{L}$).

Mientras que los pacientes con un metabolismo del amonio normal presentan alteración de los parámetros inflamatorios frente a los pacientes con un metabolismo parcialmente alterado y alterado del amonio. Con ello, definimos dos tipos de EH, una con respuesta normal a la SOG y asociada en su patogénesis a procesos inflamatorios y un segundo tipo con respuesta alterada a la SOG y por tanto relacionada con alteración en el metabolismo del amonio. Esta clasificación permitiría dirigir los tratamientos de forma personalizada y permitiría diseñar estudios dirigidos para la prevención y tratamiento de ambos tipos de EH.

Además, la SOG resulta una prueba sencilla, de fácil realización, poco costosa, que se realiza en un tiempo relativamente corto (60 minutos) y que es bien tolerada por los pacientes. Ninguno de los pacientes de nuestro estudio presentó efectos adversos ni durante ni posteriormente a su realización.

En el análisis de los factores de riesgo estudiados para desarrollar EH, además de los relacionados tanto con el metabolismo del amonio como con la inflamación, se analizaron dos variables genéticas (haplotipo TACC del gen de la glutaminasa y el estudio del microsatélite largo en la región del promotor (5'UTR del mismo)) con el objetivo de analizar si estos factores, que en estudios previos publicados habían demostrado su vinculación con la EH, influían en la respuesta a la SOG.

Así, en el año 2010, Romero-Gómez y col. publicaron un trabajo con 286 pacientes cirróticos y 107 sujetos sanos en los que los pacientes que presentaron los dos alelos largos del microsatélite mostraron un mayor riesgo de EH. En nuestro estudio, aunque la diferencia entre grupos no fue estadísticamente significativa, los porcentajes de pacientes que presentaron el microsatélite largo fue superior en aquellos con un metabolismo del amonio alterado (25,81%) y parcialmente alterado (17,54 %) que en aquellos con un metabolismo normal del amonio (11,1%). En el caso de los pacientes con metabolismo totalmente alterado, el porcentaje de pacientes con microsatélite largo era mayor al doble que aquellos con un metabolismo del amonio normal. En nuestro caso, el número de pacientes a los que se le realizó el estudio genético (n= 135) es menos de la mitad de los del estudio previo del año 2010, lo que podría explicar el hecho de que no fuera estadísticamente significativo con nuestro tamaño muestral.

Respecto al haplotipo TACC, en el año 2009, Jover y col, demostraron que su presencia actuaba como haplotipo protector apareciendo sólo en el 2,6% de los pacientes con EH. Estos datos prácticamente se confirman en nuestro estudio ($p=0.054$), de tal manera que el haplotipo aparece en el 49,4% de los pacientes con un metabolismo del amonio normal, mientras que en los pacientes con un metabolismo del amonio alterado sólo aparece en el 15,7%. La presencia, por tanto, del haplotipo TACC parece que podría influir en la respuesta a la SOG. Al igual que ocurría al analizar estadísticamente los datos anteriores probablemente al aumentar el tamaño muestral los datos muestren diferencias claramente significativas entre los distintos grupos de metabolismo.

Con todo lo dicho, podemos concluir que la SOG es una prueba sencilla, bien tolerada por los pacientes y que, con la nueva interpretación propuesta en nuestro estudio, permite identificar a pacientes cirróticos en riesgo de desarrollar EH lo que permitiría intensificar la vigilancia en los mismos, así como la toma de medidas preventivas. Así mismo, puede diferenciar dos tipos de encefalopatía (asociada a disfunción hepática o a procesos inflamatorios). Esta clasificación permitiría optimizar y personalizar los tratamientos, individualizándolos, para cada caso concreto, para incidir en cada uno sobre el mecanismo de acción principal que provoque dicha patología actuando sobre distintas dianas terapéuticas. Así mismo permitiría el desarrollo farmacológico de distintas terapias dirigidas a los distintos mecanismos de acción.

7.- Conclusiones.

1.- La curva de Sobrecarga Oral de Glutamina permite identificar a los pacientes cirróticos en riesgo de desarrollar Encefalopatía Hepática. Para ello proponemos interpretar los resultados de la misma teniendo en cuenta tanto el valor basal de amonio como el valor a los 60 minutos tras la sobrecarga, pero este último para calcular el valor delta (diferencia entre amonio a los 60 minutos y amonio basal).

2.- La combinación de los valores de amonio basal ($> 78 \mu\text{g/dL}$) y el incremento tras la sobrecarga (delta $> 33 \mu\text{g/dL}$) permite establecer tres grupos en función del riesgo a desarrollar EH: bajo (pacientes con metabolismo normal), medio (pacientes con metabolismo parcialmente alterado) y alto riesgo (pacientes con metabolismo totalmente alterado).

3.- La Sobrecarga Oral de Glutamina permite identificar dos tipos de encefalopatía hepática:

- Una asociada con disfunción hepática y por tanto con alteración del metabolismo del amonio.
- Un segundo tipo asociado a inflamación y a resistencia a la insulina.

4.- La Sobrecarga Oral de Glutamina es una prueba segura y bien tolerada por los pacientes.

Bibliografía

Aguilar Reina J. Encefalopatía hepática. *Medicine*. 2012; 11: 652-9.

Alman RW, Ehrmantraut WR, Fazekas JF, Ticktin HE. Cerebral metabolism in hepatic insufficiency. *Am J Med* 1956; 21:843-9.

Amodio P, Ampuero J. Solving Doubts About L-Ornithine L-Aspartate for Overt Hepatic Encephalopathy: Whom and How to Treat. *Hepatology* 2018; 67:476-8.

Amodio P, Del Piccolo F, Marchetti P, Angeli P, Iemmolo R, Caregaro L, Merkel C, Gerunda G, Gatta A. Clinical features and survival of cirrhotic patients with subclinical cognitive alterations detected by the number connection test and computerized psychometric test. *Hepatology* 1999;29:1662-7.

Amodio P, Marchetti P, Piccolo F, Campo G, Rizzo C, Iemmolo RM et al. Visual attention in cirrhotic patients: A study on covert visual attention orienting. *Hepatology* 1998; 27:1517-23.

Ampuero J, Montoliú C, Simón-Talero M, Aguilera V, Millán R, Márquez C, et al. Minimal hepatic encephalopathy identifies patients at risk of faster cirrhosis progression. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 2018; 33:718-725.

Ampuero J, Ranchal I, del Mar Díaz_Herrero M, Del Campo JA, Bautista JD, Romero Gómez M. Role of diabetes mellitus on hepatic encephalopathy. *Metab. Brain Dis.* 2013;28:277-279.

Ampuero J, Simón M, Montoliú C, Jover R, Serra MÁ, Córdoba J, et al: Minimal Hepatic Encephalopathy and Critical Flicker Frequency are associated with survival of patients with cirrhosis. *Gastroenterology* 2015; 149: 1483-1489.

Anthony PP, Ishak KG, Nayak NC, Poulsen HE, Scheuer PJ, Sobin LH. The morphology of cirrhosis. Recommendations on definition, nomenclature, and classification by a working group sponsored by the World Health Organization. *J Clin Pathol.* 1978;31: 395-414.

Bajaj JS, Hafeezullah M, Franco J, Varma RR, Hoffmann RG, Knox JF, et al: Inhibitory control test for the diagnosis of minimal hepatic encephalopathy. *Gastroenterology* 2008;135:1591-1600.

Bajaj JS, Hafeezullah M, Hoffmann RG, Varma RR, Franco J, Binion DG, et al. Navigation skill impairment: another dimension of the driving difficulties in minimal hepatic encephalopathy. *Hepatology* 2008;47:596-604.

Bajaj JS, Pinkerton SD, Sanyal AJ, Heuman DM. Diagnosis and treatment of minimal hepatic encephalopathy to prevent motor vehicle accidents: a cost-effectiveness analysis. *Hepatology* 2012; 55: 1164-71.

Bajaj JS, Saeian K, Verber MD, Hirschke D, Hoffmann RG, Franco J, et al. Inhibitory control test is a simple method to diagnose minimal hepatic encephalopathy and predict development of overt hepatic encephalopathy. *Am J Gastroenterol* 2007; 102: 754-60.

Bajaj JS, Schubert CHM, Heuman DM, Wade JB, Gibson D, Hafeezullah DP, et al. Persistence of cognitive impairment after resolution of overt hepatic encephalopathy. *Gastroenterology* 2010; 138:2332-40.

Bajaj JS, Wade JB, Sanyal AJ. Spectrum of neurocognitive impairment in cirrhosis: implications for the assessment of hepatic encephalopathy. *Hepatology*. 2009;50:2014-21.

Basu S, Zethelius B, Helmersson J, Berne C, Larsson A, et al. Cytokine-mediated inflammation is independently associated with insulin sensitivity measured by the euglycemic insulin clamp in a community-based cohort of elderly men. *Int J ClinExp Med* 2011; 4: 164–168.

Benvegnù L, Gios M, Boccato S, Alberti A. natural history of compensated viral cirrhosis: a prospective study on the incidence and hierarchy of major complications. *Gut*. 2004;53:744-9.

Bessman SP, Bradley JE. Uptake of Ammonia by muscle: Its implications in ammoniagenic Coma. *N Engl J Med* 1955; 253: 1143-7.

Blei AT. Treatment of hepatic encephalopathy. *Lancet* 2005; 365:1383-4.

Bustamante J, Rimola A, Ventura PJ, Navasa M, Cirera I, Reggiardo V, Rodes J. Prognostic significance of hepatic encephalopathy in patients with cirrhosis. *J Hepatol.* 1999;30:890-95.

Butterworth RF. Pathogenesis of hepatic encephalopathy: new insights from neuroimaging and molecular studies. *J Hepatol* 2003;39:278-285.

Butterworth RF. Pathophysiology of hepatic encephalopathy: New look at ammonia. *Metab brain dis* 2002; 17: 221-6.

Butterworth RF. The neurobiology of hepatic encephalopathy. *Semin Liver Dis* 1996; 16:235-44.

Catafau AM, Kuliesevisky J, Berná L, et al. Relationship between cerebral perfusion in frontal-limbic-basal ganglia circuits and neuropsychologic impairment in patients with subclinical hepatic encephalopathy. *J Nucl Med* 2000; 41: 405-10.

Cordoba J. New assessment of hepatic encephalopathy. *J Hepatol.* 2011;54:1030-40.

Córdoba J, Alonso J, Rovira A, Jacas C, Sampedro F, castells L et al. The development of low-grade cerebral edema in cirrhosis is supported by the evolution of H-magnetic resonance abnormalities after liver transplantation. *J Hepatol* 2001; 35: 598-604.

Cordoba J, Flavia M, Jacas C, Sauleda S, Esteban JI, Vargas V, et al. Quality of life and cognitive function in hepatitis C at different stages of liver disease. *J Hepatol.* 2003;39:231-8.

Córdoba J, Minguez b. Hepatic encephalopathy. *Semin Liver Dis* 2008; 28:70-80.

Curthoys NP, Kuhlenschmidt T. Phosphate-Independent Glutaminase from rat Kidney. Partial Purification and identity with Gamma-Glutamyltranspeptidase. *J.Biol.Chem* 1975; 250:2099-2105.

Curthoys NP and Watford M. Regulation of Glutaminase Activity and Glutaminase Metabolism. *Annu. Rev. Nutr* 1995; 15: 133-59.

D'Amico G, García-Tsao G, Pagliaro L. Natural history and prognostic indicators of survival in cirrhosis: a systematic review of 118 studies. *J Hepatol.* 2006;44:217-31.

Dam M, Burra P, Tedaschi U, et al. Regional cerebral blood flow changes in patients with cirrhosis assessed with ^{99m}Tc-HM-PAQ single photon emission computed tomography: effect of liver transplantation. *J Hepatol* 1998;29:78-84.

Diamond T, Stiel D, Lunzer M, Wilkinson M, Roche J, Posen S. Osteoporosis and skeletal fractures in chronic liver disease. *Gut* 1990;31:82-87.

Di Pascoli M, Ceranto E, De Nardi P, Donato D, Gatta A, Angeli P, et al. Hospitalizations due to cirrhosis: clinical aspects in a large cohort of Italian patients and cost analysis report. *Dig Dis* 2017;35:433-438.

Elgadi KM, Meguid RA, Quian M, Souba W, Abcouwer SF. Cloning and Analysis of Unique Human Glutaminase Isoforms Generated by Tissue-Specific Alternative Splicing. *Physiol Genomics* 1999; 31; 1:51-62.

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: 716-21.

Finlayson MH, Superville B. Distribution of cerebral lesions in acquired hepato-cerebral degeneration. *Brain* 1981;104:79-95.

Fischer JE, Baldessarini RJ. False neurotransmitters and hepatic failure. *Lancet*. 1971;2:75-80.

Garcia Buey I, Gonzalez Mateos F, Moreno-Otero R. Cirrosis Hepática. *Medicine*. 2012; 11: 625-33.

Geissler A, Lock G, Frund R, Held P, Hollerbach S, Andus T, et al. Cerebral abnormalities in patients with cirrhosis detected by proton magnetic resonance spectroscopy and magnetic resonance imaging. *Hepatology* 1997;25:48-54.

Good DW, DuBose TD Jr. Ammonia transport by early and late proximal convoluted tubule of rat. *J Clin Invest* 1987; 79:684-91.

Grande L, Ramos Guerrero R, Collantes de Teran L, Camacho I, Corpas R, Diaz D, Bautista JD, Romero-Gómez M. Actividad Glutaminasa Mitocondrial del Enterocito en la Encefalopatía Hepática Incipiente. *Gastroenterol Hepatol* 2003; 26(Suppl2):67.

Grande, L., Romero Gómez, M. Diagnóstico de la Encefalopatía Hepática. *Revisiones en Gastroenterologia*. 2002; 4:183-195.

Gregorios JB, Mozes LW, Norenberg MD. Morphologic effects of ammonia on primary astrocyte cultures II. Electron microscopic studies. *J Neuropathol Exp Neurol* 1985; 44:404-14.

Groeneweg M, Moerland W, Quero JC, Hop WC, Krabbe PF, Schalm SW. Screening of subclinical hepatic encephalopathy. *J Hepatol* 2000;32:748-753.

Groeneweg M, Quero JC, de Bruijn I, Hartmann IJ, Essink-Bot ML, Hop WC, et al. Subclinical hepatic encephalopathy impairs daily functioning. *Hepatology*. 1998;28:45-9.

Hahn M, Massen O, Nenecki M, Pavlov J. Die Eck´She Fistel Zwischen Der Unteren Hohlvene Und Der Pfortader Und Ihre Folgen Für Den Organismus. *Arch Exp Pathol Pharm* 1893: 32:161-210.

Hamm LL, Simon EE. Ammonia Transport in the Proximal Tubule. *Miner Electrolyte Metab* 1990; 16:283-90.

Hatzakis A, Wait S, Bruix J, Buti M, Carballo M, Cavaleri M, et al. the state of hepatitis B and C in Europe: report from the hepatitis B and C summit conference. *J viral Hepat*. 2011;18Suppl1:1-16.

Häussinger D et al. Hepatic encephalopathy in chronic liver disease: a clinical manifestation of astrocyte swelling and low-grade cerebral edema. *J Hepatol* 2000;32:1035-8.

Haussinger D, Laubenberger J, vom Dahl S, Ernst T, Bayer S, Langer M, et al. Proton magnetic resonance spectroscopy studies on human brain myo-inositol in hypoosmolarity and hepatic encephalopathy. *Gastroenterology* 1994; 107:1475-80.

Häussinger D, Schliess F, Kircheis G. Pathogenesis of Hepatic Encephalopathy. *J Gastroenterol Hepatol* 2002; 17:S256-59.

Herneth AM, Steindl P, Ferenci P, Roth E, Hörtnagl H. Role of Tryptophan in the Elevated Serotonin-Turnover in Hepatic Encephalopathy. *J Neural Transmission* 1998; 105:975-86.

Idrovo V. Encefalopatía hepática. *Rev Col Gastroenterol* 2003; 18: 40-7.

Imbert G, Saudou F, Yvert G, Devys D, Trottier Y, garnier JM, Weber C, Mandel JL, Cancel G, Abbas N, DurrA, Didierjean O, Stevanin G, Agid Y, Brice A. Cloning of the gene for spinocerebellar ataxia 2 reveals a locus with high sensitivity to expanded CAG/Glutamine Repeats. *Nat Gene* 1996;14:285-91.

Jalan R, Kapoor D. Enhanced Renal Ammonia Excretion Following Volume Expansion In Patients with well compensated Cirrhosis of the liver. *Gut* 2003; 52:1041-5.

Jalan R, Olde Damink SWM, Lee A, Hayes PC, Williams R. Brain Production of Inflammatory Cytokines in Patients with acute liver failure and uncontrolled intracranial hypertension. *Hepatology* 2003; 38:548-9.

James LA, Lunn PG, Elia M. Glutamine Metabolism in the Gastrointestinal tract of the rat assessed by the Relative Activity of Glutaminase (E.C. 3.5.1.2) and Glutamine Synthetase (E.C 6.3.1.2). *Br J Nutrition* 1988; 79: 365-72.

James LA, Lunn PG, Middleton S, Elia M. Distribution of Glutaminase and Glutamine Synthetase Activities in the Human Gastrointestinal Tract. *Clin Sci (Lond)* 1998 Mar; 94:313-9.

Joebges EM, Heidemann M, Schimke N, Hecker H, Ennen JC, Weissenborn K. Bradykinesia in minimal hepatic encephalopathy is due to disturbances in movement initiation. *Journal of hepatology* 2003; 38: 273-280.

Jover R, Company L, Gutierrez A, Zapater P, Perez-Serra J, Girona E, Aparicio JR, Perez-Mateo M. Minimal hepatic encephalopathy and extrapyramidal signs in patients with cirrhosis. *The American journal of gastroenterology* 2003; 98: 1599-1604.

Kanamori K, Ross BD, Chung JC, Kuo EL. Severity of hiperammonemic encephalopathy correlates with brain ammonia level and saturation of glutamine synthetase in vivo. *J Neurochem* 1996; 67: 1584-94.

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; 4:527-35.

Kircheis G, Wettstein M, Timmermann L, Schnitzler A, Häussinger D. Critical flicker frequency for quantification of low-grade hepatic encephalopathy. *Hepatology* 2002;35:357-366.

Krabbe KS, Reichenberg A, Yirmiya R, Smed A, Pedersen BK, Bruunsgaard H. Low-dose endotoxemia and human neuropsychological functions. *Brain Behav Immun.* 2005; 19: 453-60.

Krieger D, Krieger S, Jansen O, Gass P, Thielmann L, Lichtnecker H. Manganese and chronic hepatic encephalopathy. *Lancet* 1995; 346:346-70.

Kullmann F, Hollerbach S, Holstege A, et al. Subclinical hepatic encephalopathy: the diagnostic value of evoked potentials. *J Hepatol* 1995; 22: 101-10.

Kulisevsky J, Pujol J, Balanzo J, et al. Pallidal Hyperintensity on Magnetic Resonance Imaging in Cirrhotic Patients: Clinical Correlations. *Hepatology.* 1992;16:182-8

Kulisevsky J, Pujol J, Deus J, Balanzó J, Pujol A. Magnetic resonance imaging pallidal hypersignal in cirrhotic subjects. *Hepatology* 1996;24:282-283.

Labow B, Souba W, Abcouwer S. Mechanisms Governing the Expression of the Enzymes of Glutamine Metabolism-Glutaminase Synthetase. *J Nutr* 2001; 131 :2467S-74S.

Laterza OF, Curthoys NP. Specificity and functional análisis of the pH responsive element within renal glutaminase mRNA. *Am J Physiol* 2000;278:F970-7.

Laubenberger J, Haussinger D, Bayer S, Gufler H, Henning J, Langer M. Proton magnetic resonance spectroscopy of the brain in symptomatic and asymptomatic

patients with liver cirrhosis. *Gastroenterology* 1997; 112:1610-6.

Lee JH, Seo Dn, Lee Ys, Kim ST, Mun CN, Lim TH et al. Proton magnetic resonance spectroscopy (1H-RMNs) findings for the brain in patients with liver cirrhosis reflect the hepatic functional reserve. *Am J Gastroenterol* 1999; 94:2206-13.

Lezak MD. Domains of behavior from a neuropsychological perspective: the whole story. *Nebr Symp Motiv* 1994;41:23-55.

Lockwood AH, Yap EW, Wong WH. Cerebral ammonia metabolism in patients with severe liver disease and minimal hepatic encephalopathy. *J Cereb Blood Flow Metab* 1991; 11: 337-41.

Loguercio C, Del Vecchio-Blanco C, Coltorti M. Psychometric tests and "latent" portal-systemic encephalopathy. *Br J Clin Pract* 1984;38:407-11.

Maharshi S, Sharma BC, Sachdeva S, Srivastava S, Sharma P. Efficacy of nutritional therapy for patients with cirrhosis and minimal hepatic encephalopathy in a randomized trial. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2016;14:454-460.

McDemmott 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.

Montoliu C, Cauli O, Urios A, ElMlili N, Serra MA, Giner-Duran R, Gonzalez-Lopez O, Del Olmo JA, Wassel A, Rodrigo JM, Felipe V 3-nitro-tyrosine as a peripheral biomarker of minimal hepatic encephalopathy in patients with liver cirrhosis. *Am J Gastroenterol*. 2011; 106: 1629-37.

Montoliu C, Piedrafita B, Serra MA, del Olmo JA, Urios A, Rodrigo JM, et al. IL-6 and IL-18 in blood may discriminate cirrhotic patients with and without minimal hepatic encephalopathy. *J Clin Gastroenterol* 2009; 43: 272–279.

Muckart D J, Bhagwanjee S. Definitions of the Systemic Inflammatory Response Syndrome and Allied Disorders in Relation to Critically injured Patients. *Crit Care Med* 1997; 25: 1789-95.

Murray KF, Carithers RL. AASLD practice guidelines: evaluation of the patient for liver transplantation. *Hepatology* 2005; 41: 1-36.

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: 441-46.

Nissim I. Newer Aspects of Glutamine/Glutamate Metabolism: The Role of Acute PH changes. *Am J Physiol* 1999; 277: 493-7.

Norenberg MD. The role of astrocytes in Hepatic Encephalopathy. *Neurochem Pathol* 1987; 6 : 13-33.

Odeh M, Sabo E, Srugo I, Oliven A. Serum levels of tumor necrosis factor-alpha correlate with severity of hepatic encephalopathy due to chronic liver failure. *Liver international: official journal of the International Association for the Study of the Liver* 2004;. 24, 110-116.

Olalla L, Gutierrez A, Campos JA, Khan ZU, Alonso FJ, Segura JA, Marquez J, Aledo JC. Nuclear localization of L-Type Glutaminase in Mammalian Brain. *J Biol Chem* 2002; 11:277:38939-44.

Olde Damink SW, Jalan R, Redhead DN, Hayes PC, Deutz NE, Soeters PB. Interorgan Ammonia and Amino Acid Metabolism in Metabolically Stable Patients with Cirrhosis and a TIPSS. *Hepatology* 2002; 36: 1163-71.

Ong JP, Aggarwal A, Krieger D, Easley KA, Karafa MT, Van Lente F, Arroglija AC, Mullen KD. Correlation between Ammonia levels and the Severity of Hepatic Encephalopathy. *Am J Med* 2003; 114: 188-93.

Oppong Kn, Al-Mardini H, Thick M, Record CO. Oral glutamine challenge in cirrhotics pre and post liver transplantation: a psychometric and analyzed EEG study. *Hepatology* 1997;26:870-6.

Ortiz M, Jacas C, Córdoba J. Minimal hepatic encephalopathy: diagnosis, clinical significance and recommendations. *J. Hepatol* 2005; 42: 45-53.

Philips G, Schwartz R, Gabuzda G, Davidson C. The Syndrome of Impeding Hepatic Coma in Patients with Cirrhosis of the liver given certain nitrogenous substances. *New Engl J Med* 1952; 247:239-46.

Planas R, Ballesté B, Alvarez MA, et al. Natural history of decompensated hepatitis C virus-related cirrhosis. A study of 200 patients. *J Hepatol* 2004; 40:823-30.

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: 849-855.

Plauth M, Schütz, T. Branched-chain amino acids in liver disease: new aspects of long known phenomena. *Clinical Nutrition & Metabolic Care* 2011; 14:61-6. doi:10.1097/MCO.0b013e3283413726.

Poordad F. Review article: the burden of hepatic encephalopathy. *Aliment Pharmacol Ther.* 2007; 25: 3-9.

Quero JC, Hartmann IJ, Meulstee J, Hop WC, Schalm SW. The diagnosis of subclinical hepatic encephalopathy in patients with cirrhosis using neuropsychological tests and automated electroencephalogram analysis. *Hepatology* 1996;24:556-560.

Quero JC, Schalm S. Subclinical hepatic encephalopathy. *Semin Liver Dis* 1996; 16: 321-8.

Rama Rao KV, Chen M, Simard JM, Norenberg MD. Ammonia Neurotoxicity: Role of the Mitochondrial Permeability Transition. *Metabolic Brain Disease* 2003; 18: 113-27.

Rama Rao KV, Chen M, Simard JM, Norenberg MD. Increased Aquaporin-4 Expression in ammonia-Treated Cultured astrocytes. *Neuroreport* 2003; 14:2379-82.

Rama Rao KV, Chen M, Simard JM, Norenberg MD. Induction of the Mitochondrial Permeability Transition in cultured astrocytes by glutamine. *Neurochem Int* 2003; 43: 517-23.

Rama Rao KV, Chen M, Simard JM, Norenberg MD. Suppression of ammonia-induced

astrocyte swelling by Cyclosporin A. *J Neurosci Res* 2003; 74:891-7.

Randolph C, Hilsabeck R, Kato A, et al. Neuropsychological assessment of hepatic encephalopathy: ISHEN practise guidelines. *Liver Int* 2009;29 :629-35.

Ridola L, Riggio O. Prediction of Hepatic Encephalopathy: Why disregard well Known risk factors? *Hepatology* 2018;67: 1637.

Riggio O, Amodio P, farcomeni A, Merli M, Nardelli S, Pasquale C, et al. A model for predicting development of overt hepatic encephalopathy in patientswith cirrhosis. *Clin Gastroenterology. Hepatol* 2015;13:1346-1352.

Riggio O, Ridola L, Pasquale C, Nardelli S, Pentassuglio I, Moscucci F, Merli M. Evidence of Persistent Cognitive Impairment After Resolution of Overt Hepatic Encephalopathy. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2011;9:181-3.

Roberg B, Torgner IA, Laake J, Takumo Y, Ottersen O, Kvamme E. Properties and submitochondrial localization of pig and rat renal phosphate-activated Glutaminase. *Am J Physiol Cell Physiol*; 279:C648-C657.

Román E, Córdoba J, Torrens M, Torras X, Villanueva C, Vargas V, et al. Minimal hepatic encephalopathy is associated with falls. *Am J Gastroenterol* 2011; 106: 476-82.

Romero-Gómez M, Boza F, García-Valdecasas MS, Garcia E, Aguilar Reina J. Subclinical Hepatic Encephalopathy Predicts The Development Of Overt Hepatic Encephalopathy. *Am J Gastroenterol* 2001;96:2718-23.

Romero-Gomez M, Cordoba J, Jover R, del Olmo JA, Ramirez M, Rey R, de Madaria E, Montoliu C, Nunez D, Flavia M, Company L, Rodrigo JM, Felipe V. Value of the critical flicker frequency in patients with minimal hepatic encephalopathy. *Hepatology* 2007.; 45:879-885.

Romero-Gómez M, Córdoba J, Jover R, del Olmo J, Fernández A, Flavià M, et al. Red Española de Encefalopatía Hepática. Tablas de normalidad de la población española para los tests psicométricos utilizados en el diagnóstico de la encefalopatía hepática mínima. *Med Clin (Barc)* 2006;127:246-249.

Romero-Gómez 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: 781-7.

Romero-Gómez M, Jover M, Del Campo JA, Royo JL, Hoyas E, Galán JJ, et al. Variations in the promoter region of the glutaminase gene and the development of hepatic encephalopathy in patients with cirrhosis: a cohort study. *Ann Intern Med* 2010; 153: 281-8.

Romero-Gómez M, Montagnese S, Jalan R. Hepatic encephalopathy in patients with acute decompensation of cirrhosis and acute-on-chronic liver failure. *J Hepatol* 2014. Pii: S0168-8278-00646-1. Doi: 10.1016/j.hep.2014.09.005.

Romero-Gómez M, Ramos-Guerrero R, Grande L, de Terán 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: 49-54.

Ross BD, Danielsen ER, Bluml S. Proton magnetic resonance spectroscopy: the new gold standard for diagnosis of clinical and subclinical hepatic encephalopathy?. *Dig Dis* 1996;14 Suppl 1: 30-9.

Ross BD, Jacobson S, Villamil F, Korula J, Kreis R, Ernst T, Shonk T, Moats RA. Subclinical hepatic encephalopathy: proton MR spectroscopic abnormalities. *Radiology* 1994; 193:457-63.

Saito H, Ejima A. Liver dysfunction and probable manganese accumulation in the brainstem and basal ganglia. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1995; 58:760-61.

Seo YS, Yim SY, Jung JY, et al. Psychometric hepatic encephalopathy score for the detection of minimal hepatic encephalopathy in Korean patients with liver cirrhosis. *J Gastroenterol Hepatol* 2012;27:1695–1704.

Sidhu SS, Sharma BC, Goyal O, Kishore H, Kaur N. L-Ornithine L-aspartate in bouts of overt hepatic encephalopathy. *Hepatology* 2018; 67:700-710.

Sigal SH, Stanca CM, Kontorinis N, Bodian C, Ryan E. Diabetes mellitus is associated with hepatic encephalopathy in patients with HCV cirrhosis. *Am J Gastroenterol* 2006;

101:1490–96.

Sobel RA, DeArmond SJ, Forno LS, Eng LF. Glial Fibrillary Acidic Protein in Hepatic Encephalopathy. An Immunohistochemical Study. *J. Neuropathol Exp Neurol* 1981; 40: 625-32.

Sofroniew MV, Vinters HV Astrocytes: biology and pathology. *Acta neuropathologica* 2010. 119, 7-35.

Spahr L, Vingerhoets F, Lazeyras F, Delavelle J, Du pasquier R, Giostra E. Magnetic Resonance Imaging and Proton Spectroscopic Alterations Correlate with Parkinsonian Signs in Patients with Cirrhosis. *Gastroenterology* 2000; 119:774-81.

Stabenau JR, Warren KS, Rall DP. The role of gradient in the distribution of ammonia between blood and cerebrospinal fluid, brain and muscle. *J Clin Invest* 1959; 38: 373-83.

Stewart ChA, Malinchoc M, Kim WR, Kamath PS. Hepatic encephalopathy as a predictor of survival in patients with end-stage. *Liver Disease Liver Transpl.* 2007; 13: 1366-71.

Szweda L, Atkinson D. Response of rat liver Glutaminase to Ph, Ammonium and Citrate. *The Journal of Biological Chemistry*; 265:20869-73.

Tapper EB, Finkelstein D, Mittleman MA, Piatkowski G, Chang M, Lai M. A quality improvement initiative reduces 30 day rate of readmission for patients with cirrhosis. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2016;14:753-759.

Tapper EB, Halbert B, Mellinger J. Rates of and reasons for hospital readmissions in patients with cirrhosis: a multistate population-based cohort study. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2016; 14:1181-1188.

Tapper EB, Parikh N, Sengupta N, Mellinger J, Ratz D, Lok As, et al. A Risk Score to Predict the Development of Hepatic Encephalopathy in a Population-Based cohort of patients with cirrhosis. *Hepatology*, 2017 Nov 1. doi.10.1002/hep.29628.

Tapper EB, Risech- Neyman Y, sengupta N. Psychoactive medications increase the risk

of falls and fall-related injuries in hospitalized patients with cirrhosis. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2015; 13: 1670-1675.

Taylor-Robinson SD, Sargentoni J, Oatridge A, Bryant DJ, Hagnal JV, Marcus CD, et al. MR imaging and spectroscopy of the basal ganglia in chronic liver disease: correlations of T1-weighted contrast measurements with abnormalities in proton and phosphorous-31 Mr spectra. *Metab Brain Dis* 1996; 11:249-68.

Thomsen KL, Macnaughtan J, Tritto G, Mookerjee RP, Jalan R. Clinical and pathophysiological characteristics of cirrhotic patients with grade I and minimal hepatic encephalopathy. *PLoS One* 2016; 11:e0146076.

Ventura Cots M, Carmona I, Moreno C, Ampuero J, Simón-Talero M, Sanpedro F, et al. Duration of the acute hepatic encephalopathy episode determines survival in cirrhotic patients. *Therap. Adv. Gastroenterol.* 2018;11:1756283X1774341.

Watford M, Smith EM, Erbeling EJ. The regulation of phosphate-activated glutaminase activity and glutamine metabolism in the streptozotocin-diabetic rat. *Biochem* 1984; 224:207–214.

Weaver JD, Huang MH, Albert M, Harris T, Rowe JW, Seeman TE. Interleukin-6 and risk of cognitive decline: MacArthur studies of successful aging. *Neurology* 2002; 59:371-8.

Weber FL, Veach G. The importance of the small intestine in gut ammonium production in the fasting dogs. *Gastroenterology* 1979; 3:235-240.

Weissenborn K, Ennen JC, Schomerus H, Rückert N, Hecker H. Neuropsychological characterization of hepatic encephalopathy. *J Hepatol* 2001;34:768-773.

Weissenborn K, Rückert N, Hecker H et al. The number connection tests A and B: interindividual variability and use for the assessment of early hepatic encephalopathy. *J Hepatol* 1998; 28: 646-53.

Weissenborn K, Scholz M, Hinrichs H, Wiltfang J, Schmidt FW, Künkel H. Neurophysiological assessment of early hepatic encephalopathy. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 1990;75:289-295.

Wolpert E, Phillips SF, Summerskill WH. Ammonia production in the human colon. Effects of cleansing, neomycin and acetohydroxamic acid. N England J Med 1970; 283: 159-164.

Yurdaydin C. Blood Ammonia determination in Cirrosis: still confusing alter all these years? Hepatol 2003; 38: 1307-10.