

Efecto de la aplicación de dexametasona en la evolución de la enfermedad hepática crónica, en un modelo de experimentación murino*

Jorge Mario Cruz Amaya**, Willian Vicente Narváz Solarte***, Martha Isabel Urrea Quiroga****, Melina Flórez Cuadros*****, Henry Mesa Echeverri*****

Resumen

Introducción. La cirrosis hepática se presenta como uno de los mayores problemas de salud pública a nivel mundial. Se ha avanzado considerablemente en el conocimiento de los aspectos moleculares de esta enfermedad. El entendimiento detallado de dicho mecanismo sería la base para investigar las posibilidades terapéuticas en la reversión de la fibrogenesis. **Objetivo.** Determinar el efecto de la terapia con dexametasona sobre la fibrogenesis y la función hepática en un modelo experimental murino de cirrosis. **Materiales y método.** Se utilizaron 36 ratas wistar, procedentes del bioterio de la Universidad de Caldas, a las cuales se les indujo cirrosis con tetracloruro de carbono (CCl₄). El proyecto fue avalado por la comisión de ética para la investigación con animales de la Universidad de Caldas. Se conformaron dos tratamientos (T1=CCl₄ y T2=CCl₄ + dexametasona). Se tomaron muestras cada dos semanas para histopatología y medición plasmática de albúmina. Los tratamientos se distribuyeron en un Diseño Irrestrictamente al Azar, conformado por 2 tratamientos, 5 repeticiones y tres animales por unidad experimental y un grupo control (n=6). Se realizó el análisis de varianza (ANOVA), fijando una $p \leq 0.05$ y se utilizó la prueba de comparación múltiple de Tukey en la presencia de diferencia estadísticamente significativa. **Resultados.** No se observaron diferencias significativas en la fibrogenesis, infiltración leucocitaria y degeneración vacuolar entre tratamientos. En T2 se observó un consumo

de alimento y un peso corporal estadísticamente inferior a T1; los niveles plasmáticos de albúmina en T2 fueron estadísticamente superiores a T1. **Conclusión.** La aplicación de dexametasona mantuvo un nivel de albúmina plasmática superior, lo que podría indicar una mejor funcionalidad hepática; no se observaron diferencias en la progresión de la fibrogenesis con este tratamiento.

Palabras clave: albúmina, cirrosis, corticoides, fibrogenesis.

Effect of the application of dexamethasone on the evolution of the chronic liver disease, in a murine experimental model

Abstract

Introduction. Liver cirrhosis is one of the biggest public health problems Worldwide. There have been great advances in learning about the molecular aspects of this disease. The detailed knowledge of such mechanism would be the basis of research about the therapeutic possibilities in the reversal of fibrogenesis. **Objective.** To Determine the effect of the therapy with dexomethasone on fibrogenesis and on the liver's function in a cirrhosis murine experimental model. **Materials and method.** 36 Wistar rats were used. They came from the Universidad de Caldas' vivarium and they were given cirrhosis with carbon tetrachloride (CCl₄). The project was supported by the Universidad de Caldas' Ethics Commission

* Derivado de la investigación: evaluación del suplemento de aminoácidos de cadena ramificada y la aplicación de dexametasona en la progresión de la enfermedad hepática crónica, en un modelo de experimentación murino. Proyecto patrocinado por la Vicerrectoría de Investigaciones y postgrados de la Universidad de Caldas.

** MV, PhD. Docente Departamento de Salud Animal, Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad de Caldas, calle 65 N° 26-10. Manizales; Colombia.

*** Zootecnista, PhD. Docente Departamento de Salud Animal, Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad de Caldas.

**** MV, Candidato Esp. Docente Departamento de Salud Animal, Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad de Caldas.

***** MVZ, MSc, Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad de Caldas.

***** MVZ, PhD. Docente Departamento de Producciones. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad de Caldas.

for Research with Animals. Two treatments were taken (T1=CCl4 and T2=CCl4 + dexamethasone). Samples were taken every two weeks for histopathology and plasma albumin measurement. Those treatments were distributed in an Unrestricted Random Design, made up by 2 treatments, 5 repetitions and three animals per experimental unit and a control group (n=6). A variance analysis (ANOVA) was performed, fixing a $p \leq 0.05$ and the Turkey's multiple comparison test was performed when a statistically significant difference appeared. **Results.** Significant differences were not observed in the fibrogenesis, leukocyte infiltration and vacuolar degeneration between treatments. In T2, reduced food consumption and a body weight loss statistically inferior to that of T1 were observed. **Conclusion.** The application of dexamethasone kept a superior plasma albumin level, which possibly means a better function of the liver. No differences were observed in the fibrogenesis progression with this treatment..

Key words: albumin, cirrhosis, corticosteroids, fibrogenesis.

Efeito da aplicação de dexametasona na evolução da doença hepática crônica, num modelo de experimentação murino

Resumo

Introdução. A cirrose hepática se apresenta como um dos maiores problemas de saúde pública a nível mundial. Avançou-se consideravelmente no conhecimento dos aspectos moleculares desta doença. O entendimento detalhado de dito mecanismo seria a

base para pesquisar as possibilidades terapêuticas na reversão da fibrogenesis. **Objetivo.** Determinar o efeito da terapia com dexametasona sobre a fibrogénese e a função hepática num modelo experimental murino de cirrose. **Materiais e método.** Utilizaram-se 36 ratos wistar, procedentes do biotério da Universidade de Caldas, às quais se lhes induziu cirroses com tetracloruro de carbono (CCl4). O projeto foi avalizado pela comissão de ética para a investigação com animais da Universidade de Caldas. Conformaram-se dois tratamentos (T1=CCl4 e T2=CCl4 + dexametasona). Tomaram-se mostras cada duas semanas para histopatológica e medição plasmática de albumina. Os tratamentos se distribuíram num Desenho Irrestritamente a esmo, conformado por 2 tratamentos, 5 repetições e três animais por unidade experimental e um grupo controle (n=6). Realizou-se a análise de variância (ANOVA), fixando um $p \leq 0.05$ e se utilizou a prova de comparação múltipla de Tukey na presença de diferença estatisticamente significativa. **Resultados.** Não se observaram diferenças significativas na fibrogénese, infiltração leucocitária e degeneração vacuolar entre tratamentos. Em T2 se observou um consumo de alimento e um peso corporal estatisticamente inferior a T1; os níveis plasmáticos de albumina em T2 foram estatisticamente superiores a T1. **Conclusão.** A aplicação de dexametasona manteve um nível de albumina plasmática superior, o que poderia indicar uma melhor funcionalidade hepática; não se observaram diferenças na progressão da fibrogénese com este tratamento.

Palavras importantes: albumina, cirrose, corticóides, fibrogenesis.

Introducción

Muchas enfermedades hepáticas crónicas se caracterizan por el depósito de tejido fibroso y la aparición de cirrosis en última instancia. Una vez se llega a este estadio, el pronóstico es malo, y el trasplante de hígado es la única alternativa real de aumentar la sobrevida en estos pacientes; no obstante, dicha posibilidad es costosa y está disponible para muy pocos enfermos¹. La cirrosis hepática se presenta como uno de los mayores problemas de salud pública en el mundo².

Se ha avanzado considerablemente en el conocimiento de los aspectos moleculares de la cirrosis hepática. El entendimiento detallado de dicho mecanismo sería la base para investigar las posibilidades terapéuticas en la reversión de la fibrogénese³.

La regulación celular y molecular de la fibrosis hepática proporciona una explicación de la posible reversibilidad del proceso⁴. La acumulación de matriz extracelular en enfermedades crónicas del hígado no es un acontecimiento unidireccional, sino un proceso dinámico y regulado que se puede intervenir⁵.

Bajo ciertos estímulos la célula estrellada cambia su fenotipo y funcionalidad, y se convierte de una unidad quiescente que almacena retinoides, a una célula proliferativa con características contráctiles y gran capacidad de generar matriz extracelular con abundante colágeno tipos I, II y III en el espacio perisinusoidal o de Disse, lo que dificulta el intercambio de sustancias entre el capilar y los hepatocitos⁶. Los me-

diadores clave en la activación y proliferación de células hepáticas estrelladas incluyen una amplia gama de citocinas, intermediarios reactivos de oxígeno, y otras señales paracrinas y autocrinas⁷.

La fibrogénesis está directamente relacionada con la liberación de dichos mediadores desde las células inflamatorias⁸.

A la luz del entendimiento en la fisiopatología de la fibrogénesis, se han hecho esfuerzos para desarrollar compuestos que atenúen la respuesta fibrótica e idealmente den lugar a su regresión⁹. Sin embargo, en la actualidad no se dispone de una cura definitiva y los tratamientos disponibles solo atenúan los síntomas¹⁰.

Durante años se ha investigado la manera de revertir el proceso fibrótico. Fármacos como la colchicina, interleucina 10, pentoxifilina, S-adenosina y diversos glucocorticoides han sido empleados en la terapia de la fibrosis hepática progresiva, con resultados variables y contradictorios¹¹. Algunas sustancias se han estudiado poco y faltan ensayos clínicos controlados que avalen o desautoricen su uso¹². El modelo experimentación murino ha sido de gran ayuda en la investigación preliminar de estos medicamentos, como un paso que precede a la indicación de los mismos en el ser humano.

Cuando la fibrosis hepática está avanzada causa complicaciones graves o mortales, incluyendo el sangrado varicoso, la formación

de ascitis, síndrome hepatorenal y carcinoma hepatocelular¹³.

El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la aplicación de dexametasona en la progresión de la fibrogenesis hepática y los niveles plasmáticos de albúmina en un modelo experimental murino de cirrosis.

Materiales y método

El experimento se llevó a cabo en las instalaciones del bioterio de la Universidad de Caldas, ubicado en la ciudad de Manizales a 2,150 m. s. n. m. con temperatura promedio de 20 °C y humedad relativa de 78%. El proyecto fue avalado por el comité de ética de la Universidad de Caldas.

Animales. Se utilizaron 36 ratas Wistar, procedentes del bioterio de la Universidad de Caldas. Se distribuyeron en 30 cajas plásticas transparentes con 500 gramos de cascarilla de arroz como cama con recambio semanal, además de objetos de enriquecimiento ambiental como tubos plásticos, papel, heno y trozos de madera.

Alimentación. Los animales fueron alimentadas *ad libitum* hasta los siete meses de edad con una dieta balanceada que contenía 18% de proteína bruta, 4% de extracto etéreo, 5% de fibra bruta, 1,0% de calcio y 0,8% de fósforo total. Después de este período, se inició la etapa de adaptación de ocho días a la dieta AIN 76 (tabla 1) descrita por el *American Institute of Nutrition* para ratas de laboratorio¹⁴.

Tabla 1. Composición dieta AIN 76.

Materia prima	Gr de materia prima /Kg de dieta
Sucrosa	500
Caseína	200
Fécula de maíz	150
Celulosa	50
Aceite de maíz	50
DL metionina	3
Cloruro de colina	2
<i>Total</i>	1000gr

Los animales se pesaron semanalmente desde el inicio del experimento, en una báscula digital; también se registró en una ficha de seguimiento

el consumo de alimento diario, la mortalidad y los signos clínicos observados en cada tratamiento.

El alimento se fabricó en la Unidad Tecnológica de Alimentos de la Universidad de Caldas; para tal efecto se utilizó: una mezcladora de tipo cilíndrico con 50 L de capacidad. Cada ingrediente de la dieta fue vertido al aparato, además, 6% de agua a 60 °C, permitiendo una mezcla uniforme durante 15 minutos. La mezcla fue pasada por un molino con criba (Omega®) para formar los pellets, que fueron secados en un horno a temperatura promedio de 55°C, durante 2 horas para disminuir la humedad y lograr conservar el alimento. El alimento se almacenó a -4°C en un congelador (Electroluz®).

Inducción de daño hepático: A los ocho meses de edad, se indujo daño hepático con la administración subcutánea de tetracloruro de carbono según el protocolo descrito en la literatura¹⁵, a una tasa de dilución de 1:1 en aceite de oliva; se aplicó dos veces por semana, 1 mL / kg de peso corporal /subcutáneo, durante diez semanas, tiempo en el cual se evaluó la progresión de la enfermedad.

Diseño experimental y análisis estadístico: Los tratamientos se dividieron en un Diseño Irrestrictamente al Azar, conformado por 2 tratamientos, 5 repeticiones y tres animales por unidad experimental. Además, se conformó un grupo control de seis individuos. Se realizó el análisis de varianza (ANOVA), fijando una $p \leq 0.05$ y se utilizó la prueba de comparación múltiple de Tukey en la presencia de diferencia estadísticamente significativa.

Tratamientos: Se utilizaron dos tratamientos y un grupo control.

Control: Sin aplicación de medicamentos.

T1 (Tratamiento CCl4): Se aplicó CCl 4, dos veces por semana.

T2 (Tratamiento dexametasona): Se aplicó CCl4 y dexametasona 1mg/kg/subcutáneo/2 veces por semana.

Toma de muestras: A partir de la sexta semana, se realizó la eutanasia de 12 animales (cinco por tratamiento), y dos en el grupo control. Se repitió el procedimiento la semana ocho, y por último la semana 10. La eutanasia se realizó con el gas anestésico isoflurano (Isorane®, Lab. Abbot) según lo recomendado por la American Veterinary Medical Association¹⁶, aplicando una mascarilla que se adapta a la cara, y esta se conecta con un dispositivo que contiene una gasa impregnada en el anestésico.

Una vez logrado el paro cardiorrespiratorio generado por el anestésico, se tomó muestra de sangre intracardiaca sin anticoagulante, para medición de albúmina plasmática, muestra de tejido hepático de lóbulo central, utilizando como conservante y fijador formol 10%. A la necropsia se registraron los hallazgos macroscópicos.

Las muestras de tejido hepático fueron coloreadas con hematoxilina-eosina. La lectura se realizó teniendo en cuenta el grado de actividad o cantidad de inflamación en una escala de valores de 0 a 3, en donde 0 es ninguna actividad y 3 es actividad necroinflamatoria masiva (tabla 2). El estado de fibrosis también se midió bajo la misma escala, de 0 a 3. Esta escala utilizada se basó en el sistema marcador METAVIR, diseñado especialmente para pacientes con hepatitis¹⁷ y a diferencia de este, en este estudio se tomó el grado de actividad y fibrosis en todas las zonas del acino hepático.

Tabla 2. Graduación histopatológica del daño hepático

Grado Lesión	0	1	2	3
Actividad inflamatoria	Ninguna	Leve	Moderada	Severa
Degeneración (Vacuolización)	Ninguna	Leve	Moderada	Severa
Fibrosis	Ninguna	Leve	Moderada	Severa

Resultados

En este estudio no se observaron diferencias entre tratamientos en el grado de infiltración leucocitaria, fibrosis y vacuolización hepática. No obstante, se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos, al evaluar las variables consumo de alimento, peso corporal y concentración plasmática de albúmina.

Los animales tratados con dexametasona mostraron un consumo de alimentos y un peso corporal estadísticamente inferior al grupo CCl₄; los niveles plasmáticos de albúmina en dicho tratamiento presentaron un nivel superior.

Si bien los niveles plasmáticos de albúmina en el tratamiento dexametasona fueron significativamente mayores ($P \leq 0.05$), no alcanzaron a mantenerse dentro del nivel fisiológico (su promedio fue de 32.5 gr/dL). En el grupo control estos niveles estuvieron dentro del rango fisiológico: 35-40g/dL, con un promedio de 35,2g/ dL, mientras que en el tratamiento CCl₄ el promedio se mantuvo en 28.2 gr /dL.

Durante el experimento no se presentaron signos compatibles con fallo hepático en ningún tratamiento; de otra parte, durante las necropsias tampoco se hallaron evidencias macroscópicas importantes de daño hepático; sin embargo, el estudio histopatológico reveló daños severos al órgano en ambos tratamientos como degeneración, fibrosis y necrosis de la zona centrolobulillar.

Discusión

Los corticosteroides son potentes antiinflamatorios con una amplia gama de efectos metabólicos y farmacológicos; reducen la migración de leucocitos polimorfonucleares, la extravasación de monocitos y suprimen la actividad fagocítica¹⁸. De otra parte, estos medicamentos también disminuyen la producción de radicales libres y citocinas por parte de los leucocitos. Además, a largo plazo tienen un profundo efecto impidiendo la elaboración de colágeno a partir de los fibroblastos¹⁹.

Está claramente establecido que el colágeno depositado en el hígado cirrótico proviene de

las células estrelladas activadas y los miofibroblastos hepáticos²⁰. Por todo esto, los corticoides serían una alternativa atractiva desde el punto de vista terapéutico para intervenir la fibrogénesis en un hígado lesionado. De hecho, se han utilizado de manera rutinaria, pero no carente de cierto empirismo, en un síndrome infantil caracterizado por atrofia del colédoco y desarrollo de cirrosis²¹.

En este trabajo la aplicación de dexametasona no afectó el grado de infiltración leucocitaria, el depósito de tejido fibroso y la aparición de degeneración vacuolar en el hígado. Hallazgos que coinciden con otro reporte donde no se observó efecto favorable en la fibrogénesis y progresión de la cirrosis cuando se medicaban corticoides²². Por el contrario, en un estudio de cirrosis inducida en ratas con ligadura del colédoco, la terapia de prednisolona sola o en combinación con pentoxifilina redujo la fibrogénesis²³.

Los datos referentes al uso de corticoides en afecciones hepáticas son confusos y a veces contradictorios. De un lado, se afirma que los corticoides pueden detener la fibrosis del hígado dañado²⁴, reducir la mortalidad en hepatitis alcohólica grave²⁵ y disminuir la expresión de citocinas proinflamatorias en pacientes con cirrosis alcohólica²⁶. Se consideran la piedra angular en la terapia a largo plazo de la hepatitis inmunomediada canina²⁷ y humana²⁸. De otra parte, el uso prolongado de estas sustancias puede generar una vacuolización hepática degenerativa que ocasionalmente desemboca en necrosis²⁹. Además, la terapia con prednisolona en personas que padecían hepatitis inmunomediada fue asociada a la aparición de graves complicaciones como diabetes mellitus³⁰.

La medición de albúmina plasmática se utiliza tradicionalmente como un índice de función hepática. La disminución de la síntesis de albúmina en el hígado y el catabolismo acelerado de las proteínas musculares, con frecuencia están presentes en el paciente con fallo hepático³¹. Hasta el 90% de estos pacientes presenta algún grado de desnutrición relacionada con las proteínas y la energía³².

El tratamiento con dexametasona mostró una diferencia significativa, al presentar niveles superiores de albúmina en plasma. En este ensayo, los corticoides no evitaron la progresión

del daño hepático, ni la formación de tejido fibrótico, pero tuvieron un efecto benéfico en la función del órgano al preservar los niveles de albúmina más cerca de lo fisiológico.

Una concentración muy baja de albúmina produce disminución de la presión oncótica, lo que trae como consecuencia en el paciente con fallo hepático el desarrollo de ascitis y edema periférico³³. En este experimento no se observó sintomatología relacionada con hipoalbuminemia.

Se observó que las ratas tratadas con dexametasona presentaron un peso corporal inferior al grupo CCl₄, efectos que pueden explicarse debido a las propiedades catabólicas de los corticoides³⁴. Estos medicamentos aumentan el nivel de aminoácidos en el plasma a expensas de una mayor desintegración de proteínas en el músculo; también entorpecen el transporte de aminoácidos a través de la membranas celulares, excepto en el hígado, donde está incrementado para favorecer la gluconeogénesis y la síntesis de proteínas plasmáticas³⁵. Debido a esta particularidad farmacológica, los pacientes con fallo hepático tratados con corticoides podrían beneficiarse de la suplementación con aminoácidos de cadena ramificada.

Conclusión

La terapia con corticoides en un paciente con hepatitis inducida por tóxicos podría mantener un nivel de albúmina más cerca de lo fisiológico evitando la formación de edemas por disminución de la presión oncótica, pero no alteraría la progresión de la fibrogénesis, la infiltración leucocitaria y el grado de vacuolización. Se requieren estudios adicionales para establecer si el tratamiento con corticoides puede mejorar la expectativa de vida en pacientes con fallo hepático tóxico.

Referencias bibliográficas

1. ALBANIS, E.; SAFADI, R. and FRIEDMAN, S. L. Treatment of Hepatic Fibrosis: Almost There Current. En: Gastroenterology Reports. 2003. Vol.5. p. 48-56.
2. GARCIA, L.; GÁVEZ, J. y ARMENDÁRIZ, B. Blancos terapéuticos potenciales para revertir la cirrosis hepática. En: Revista Médica de Chile. 2007. Vol.135. p. 783-791.
3. FRIEDMAN, J. Hepatic fibrosis-overview. En: Toxicology. 2008. Vol. 254. p. 120-129.
4. ALBANIS, E. and FRIEDMAN, S. L. Antifibrotic Targets and Therapy in HCV. Current Science. En: Current Hepatitis Reports. 2006. Vol.5, N°3, p. 94-100.
5. KUMAR, M.; SARIN, S. Is cirrhosis of the liver reversible? En: Indian Journal of Pediatrics. 2007. Vol.7. p. 393-399.
6. REEVES, H. and FRIEDMAN, S. L. Activation of hepatic stellate cells- A key issue in liver fibrosis. En: Frontiers in Bioscience. 2002. Vol. 7. p. 808-826.
7. BONIS, P. A.; FRIEDMAN, S. L. and KAPLAN, M. M. Is liver fibrosis reversible? En: New England Journal of Medicine. 2001. Vol.344. p. 452-454.
8. IREDALE, J. Defining therapeutic targets for liver fibrosis: exploiting the biology of inflammation and repair. En: Pharmacological Research. 2008. Vol. 58. p. 129-136
9. ALBANIS, Op.Cit., p.48-56.
10. GARCIA, Op.Cit., p.783-791.
11. ROCKEY, D. C. Current and future anti-fibrotic therapies for chronic liver disease. En: Clinical Liver Diseases. 2008. Vol.1. p. 939-62.
12. HONECKMAN, A. Current Concepts in the Treatment of Canine Chronic Hepatitis. En: Clinical Techniques in Small Animal Practice. 2003. Vol. 18. p. 239-244.
13. GARCIA, Op.Cit., p.783-791.
14. AMERICAN INSTITUTE OF NUTRITION. Report of American Institute of Nutrition Ad Hoc Committee on Standards for Nutrition Studies. En: Journal of Nutrition. 1977. Vol.107. p. 1340-1348.
15. PROCTOR, E. y CHATAMRA, K. Standardized micronodular cirrhosis in the rat. En: European Surgical Research. 1984. Vol. 16. p. 182-186.
16. AMERICAN VETERINARY MEDICAL ASSOCIATION. Guidelines on euthanasia. [On line]. Schaumburg: AVMA, 2007. [citado el 9 de diciembre de 2010]. Url disponible en: <http://www.avma.org/resources/euthanasia.pdf>.
17. THEISE, N. Liver biopsy assessment in chronic viral hepatitis. En: Modern Patology. 2007. Vol.20. p. 3-14.
18. BRUNTON, L.; LAZO, J. and PARKER, K. Las Bases farmacológicas de la Terapéutica. 11ª ed. México. McGraw-Hill, 2009. p. 598-599.
19. Ibid., p.598-599.

20. GARCIA, Op.Cit., p.783-791.
21. ANDRADE, W.; *et al.* Effects of the administration of pentoxifilline and prednisolone on the evolution of portal fibrogénesis secondary to biliary obstruction, an experimental study in growing animals. En: Journal of Pediatric Surgery. 2009. Vol.44. p. 2017-2077.
22. SUMMERSKILL, W.; KERMAN, M. and AMMON, H. Predsinone for chronic active liver disease: dose tritration, standar dose and combination with azathioprine compared. En: Gut. 1975. Vol.1. p. 876-878.
23. 23. ANDRADE, Op.Cit., p.2017-2077.
24. CZAJA, A. J. and CARPENTER, H. A. Progressive Fibrosis During Corticosteroid Therapy of Autoimmune Hepatitis. En: Hepatology. 2004. Vol.39. p. 1631–1638.
25. BARRERA, F.; *et al.* Evaluación de meta-análisis. Utilidad de corticoides en el tratamiento de la hepatitis alcohólica grave. En: Gastroenterología Latinoamericana. 2005. Vol.16. p. 58-68.
26. SPAHR, L.; *et al.* Rapid Changes in alcoholic hepatitis histology under steroids: correlation with soluble intercelluar adhesion molecule 1in hepatitis venous blood. En: Journal of Hepatology. 2001. Vol. 35. p. 582-589.
27. HONECKMAN, Op.Cit., p.239-244.
28. HENEGHAN, M. and McFARLANE, I. Current and novel inmunosuppressive therapy for autoimmune hepatis. En: Hepatology. 2002. Vol.35. p. 7-13.
29. BRUNTON, Op.Cit., p. 598-599.
30. YONEYAMA, K. efficacy and safety of prednisolone in patiens with autoimmune hepatitis.En: Advanves in Therapy. 2006. Vol. 23. p.74-91.
31. MORIWAKI, H.; *et al.* Branched-chain amino acids as a protein-and energy source in liver cirrhosis. En: Biochemical and Biophysical Research Communications. 2003. Vol. 31. p. 405-409.
32. Ibid., p. 405-409.
33. BRUNTON, Op. Cit., p. 598-599.
34. Ibid., p. 598-599.
35. Ibid., p. 598-599.