



**UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA**

**DEPARTAMENT DE MEDICINA**

**Desarrollo y validación de un modelo experimental de encefalopatía hepática en ratas con ascitis. Efectos de la administración de IGF-1 frente a rifaximina en este modelo experimental**

**MIREIA MIQUEL PLANAS**

**Barcelona, 2008**

## Abreviaturas

Ala	Alanina
ALT	Aspartatoaminotransferasa
AMPA	$\alpha$ -amino-3-hidroxi-metilixosazol-4-propiónico
AST	Aspartatoaminotransferasa
AUC	Área bajo la curva
CCl <sub>4</sub>	Tetracloruro de carbono
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
Cr	Creatina
EEG	Electroencefalograma
EH	Encefalopatía hepática
GALT	Tejido linfoide del tubo digestivo (Gut associated lymphoid tissue)
GH	Hormona de crecimiento (Growth factor)
GLM	Ganglios linfáticos mesentéricos
Gln	Glutamina
Glu	Glutamato
5HT	5-Hidroxitriptamina o serotonina
IGF-1	Factor de crecimiento parecido a la insulina tipo-I (Insulina-like growth factor)
IL-6	Interleuquina 6
Lac	Lactato
LTP	Ligadura total de la vena porta
MAO	Monoaminoxidasa
NAA	N-acetilaspártato
NMDA	ácido-N-metil-D-aspartato
NO	Óxido nítrico
PAG	Glutaminasa intestinal (Phosphate-activated intestinal glutaminase)
PBE	Peritonitis bacteriana espontánea
SB	Sobrecrecimiento bacteriano
SNC	Sistema nervioso central
Tau	Taurina

TB	Translocación bacteriana
TIPSS	Derivación intrahepática porto-sistémica (Transjugular intrahepatic porto-systemic shunt)
TSP	Trimetilsililpropionato sódico

<b>ÍNDICE</b>	<b>Páginas</b>
<b>PREFACIO</b> .....	1
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	4
<b>1. ENCEFALOPATIA HEPÁTICA</b> .....	5
1.1 Características Clínicas.....	5
1.2 Fisiopatología de la EH.....	9
1.2.1 Circulación de neurotoxinas.....	9
1.2.2 Astrocitos .....	15
1.2.3 Sistemas de neurotransmisión .....	17
1.2.4 Otras teorías .....	23
1.3 Alteraciones Asociadas a la Cirrosis.....	27
1.3.1 Alteración del sistema inmunitario en los pacientes con cirrosis .....	28
- Inmunidad local .....	28
- Inmunidad sistémica .....	28
- Translocación bacteriana .....	32
1.4 Hipótesis Patogénica Global.....	38
1.5 Diagnóstico de la EH.....	39
1.6 Tratamiento de la EH.....	44
1.7 Nueva posibilidad terapéutica.....	48
 <b>2 MODELOS EXPERIMENTALES</b> .....	55
2.1 Modelos Experimentales de EH.....	55
2.1.1. Derivación de la Circulación del Sistema Venoso Portal .....	56
2.1.2 Fallo Hepático Agudo.....	57

2.1.3. Modelos de Origen Metabólico.....	58
2.2 Limitaciones de los Modelos Descritos.....	59
2.3 Necesidad de un nuevo modelo.....	59
2.3.1 Modelo de Tetracloruro de Carbono.....	60
2.3.2 Modelo de Ligadura Total de la vena Porta.....	67
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>70</b>
<b>MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>73</b>
<b>1. ESTUDIO 1 .....</b>	<b>74</b>
1.1 Estabulación de los animales.....	74
1.2 Grupos de estudio.....	74
1.3 Laparotomía media.....	77
1.4 Ligadura de la vena porta.....	77
1.5 Inducción de cirrosis.....	78
1.6 Paracentesis exploradora.....	79
1.7 Test de sobrecarga de glutamina.....	79
1.8 Valoración del grado de derivación portosistémica.....	80
1.9 Recogida de muestras.....	80
1.10 Cuantificación de los niveles plasmáticos de endotoxina.....	81
1.11 Parámetros analíticos de función hepática.....	82
1.12 Cuantificación del grado de derivación portosistémica.....	82
1.13 Histología hepática y cerebral.....	84
1.14 Técnica de cuantificación de amonio plasmático y cerebral..	85
1.15 Determinación de mioinositol.....	87
1.16 Determinación del grado de edema cerebral.....	88

<b>2. ESTUDIO 2</b> .....	90
2.1 Estabulación de los animales.....	90
2.2 Grupos de estudio .....	90
2.3 Recogida de muestras .....	93
2.4 Procesamiento de las muestras .....	94
2.4.1 Determinación de IGF-1.....	94
A. Determinación IGF-1 murino.....	94
B. Detección IGF-1 exógeno.....	96
2.4.2 Contenido bacteriano intestinal.....	97
 <b>3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO</b> .....	 98
 <b>RESULTADOS</b> .....	 99
 <b>1. ESTUDIO 1</b> .....	 100
1.1 Mortalidad y desarrollo de ascitis .....	100
1.2 Parámetros bioquímicos y función hepática.....	100
1.3 Grado de derivación portosistémica.....	102
1.4 Endotoxina plasmática.....	104
1.5 Amonio plasmático basal.....	105
1.6 Test de sobrecarga de glutamina .....	106
1.7 Amonio cerebral.....	107
1.8 Mioinositol y otros osmolitos cerebrales.....	108
1.9 Edema cerebral.....	111
1.10 Histología.....	112
- Histología hepática.....	112
- Histología cerebral.....	113
 <b>2. ESTUDIO 2</b> .....	 115
2.1 Mortalidad.....	115
2.2 Parámetros bioquímicos .....	115
2.3 Niveles de endotoxina plasmática.....	117

2.4 Amonio plasmático.....	118
2.5 Sobrecrecimiento bacteriano intestinal.....	119
2.6 Amonio cerebral.....	120
2.7 Test de sobrecarga de glutamina .....	121
2.8 Edema de bajo grado cerebral.....	122
2.9 Determinación de IGF-1.....	123
2.10 Histología.....	124
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>125</b>
<b>ESTUDIO 1 .....</b>	<b>126</b>
<b>ESTUDIO 2 .....</b>	<b>133</b>
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>141</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>144</b>
<b>COMUNICACIONES.....</b>	<b>167</b>

<b>Índice figuras:</b>	<b>Páginas</b>
Figura 1: Ciclo del amonio	12
Figura 2: Neurotransmisión glutamérgica	19
Figura 3: Fisiopatología de la EH	39
Figura 4: Test de PHES	44
Figura 5: Mecanismos de acción de CCl <sub>4</sub>	54
Figura 6: Hipótesis de los mecanismos de acción de rifaximina e IGF-1	61
Figura 7: Esquema de trabajo. Estudio 1	76
Figura 8: Esquema de trabajo. Estudio 2	92
Figura 9: Grado de derivación portosistémica	102
Figura 10: Relación entre grado derivación portosistémica y niveles de amoniemia	103
Figura 11: Endotoxemia. Estudio 1	104
Figura 12: Amonio basal. Estudio 1	105
Figura 13: Área bajo la curva de amonio. Estudio 1	106
Figura 14: Amonio cerebral. Estudio 1	107
Figura 15: Espectro monodimensional de los osmolitos	109
Figura 16: Espectro C2-COSY de los osmolitos	110
Figura 17: Edema cerebral. Estudio 1	111
Figura 18: Histología hepática en ratas tratadas con CCl <sub>4</sub>	112
Figura 19: Histología hepática grupo control	113
Figura 20: Histología cerebral grupo control	114
Figura 21: Histología cerebral grupo cirrosis	114
Figura 22: Endotoxemia. Estudio 2	117
Figura 23: Amonio basal. Estudio 2	118
Figura 24: Contenido bacteriano cecal	119
Figura 25: Amonio cerebral. Estudio 2	120
Figura 26: Área bajo la curva de amonio. Estudio 2	121
Figura 27: Edema cerebral de bajo grado. Estudio 2	122
Figura 28: Niveles plasmáticos e IGF-1 murino	123



<b>Índice tablas:</b>	<b>Páginas</b>
Tabla 1: Clasificación de Child-Pugh	5
Tabla 2: Clasificación de West-Haven	6
Tabla 3: Factores precipitantes de la EH	41
Tabla 4: Dosis de administración del CCl <sub>4</sub>	78
Tabla 5: Clasificación de Scheuer	85
Tabla 6: Metabolitos cerebrales	88
Tabla 7: Parámetros analíticos. Estudio 1	101
Tabla 8: Osmolitos cerebrales	108
Tabla 9: Parámetros analíticos. Estudio 2	116

# **PREFACIO**

---

La unidad de investigación en enfermedades hepato-digestivas del Hospital Germans Trias i Pujol lleva más de 10 años estudiando la patogenia, el tratamiento y la profilaxis de las infecciones que acompañan a la cirrosis hepática y que son una de las causas más frecuentes de muerte intrahospitalaria de los pacientes cirróticos. Siguiendo en la misma línea de estudio de los enfermos cirróticos se ha planteado la necesidad de intentar mejorar el tratamiento de otra de las complicaciones que se asocian a la cirrosis, la encefalopatía hepática, causa de importantes problemas en estos pacientes.

Para validar nuevos tratamientos es imprescindible disponer de un modelo experimental que asemeje al máximo posible a la patología humana a estudiar. En el caso de la encefalopatía hepática se dispone de modelos experimentales pero ninguno de ellos en animales que presenten, además, cirrosis hepática descompensada. Puesto que en clínica es frecuente la encefalopatía hepática en pacientes con cirrosis descompensada creemos interesante buscar un modelo animal que reúna las dos patologías: la cirrosis hepática descompensada y la encefalopatía.

El trabajo que se presenta consta de dos partes. En la primera de ellas, teórica, se revisa la clínica, fisiopatología, tratamientos y modelos experimentales disponibles en la actualidad de encefalopatía hepática. Asimismo, se pone de manifiesto la no existencia de modelos de encefalopatía hepática en animales con cirrosis descompensada (ascitis) que presenten trastornos conductuales secundarios al fallo hepático (encefalopatía hepática).

La segunda parte consta a su vez de dos trabajos experimentales, en el primero de ellos, se propone un modelo experimental que supla las carencias arriba mencionadas y que remedie la sintomatología presente en pacientes con cirrosis e insuficiencia hepática evolucionada. En el segundo estudio, se utiliza el modelo previamente obtenido para valorar el efecto de dos tipos de tratamiento de la encefalopatía hepática. Uno de ellos, rifaximina, ya utilizada en la práctica clínica habitual, mientras que el segundo, el factor de crecimiento semejante a la insulina tipo-I (IGF-I), es un factor de crecimiento que aún se encuentra en fase de ensayo clínico.

A fin de conservar la unidad de los dos estudios, ya que se trata de investigaciones complementarias y con una continuidad temporal, se han unificado los objetivos de los dos trabajos y se ha hecho una discusión conjunta de los resultados obtenidos.

Finalmente se recogen las comunicaciones a congresos y las publicaciones derivadas de los dos trabajos que se presentan en esta memoria y la bibliografía utilizada.

# INTRODUCCIÓN

---

# 1. ENCEFALOPATÍA HEPÁTICA

Se conoce como encefalopatía hepática (EH) a los cambios producidos en la función neurológica como consecuencia de una enfermedad hepática. La EH abarca una amplia gama de signos y síntomas neurológicos y neuropsiquiátricos que presentan los enfermos con insuficiencia hepática grave aguda o crónica<sup>1</sup> y que no pueden ser atribuidos a otras enfermedades orgánicas, o a enfermedades hepáticas que se asocian a síntomas neurológicos, como la enfermedad de Wilson. La EH es especialmente frecuente en pacientes cirróticos, pudiéndose presentar hasta en un 50-70 % de los casos<sup>2</sup>. Es una complicación grave de la cirrosis pues no sólo disminuye la calidad de vida sino que la probabilidad de reingreso por este motivo al año es del 73,3 %, a los dos años del 86,7% y a los 5 años del 100 %. Asimismo, la supervivencia al año del primer episodio de EH es del 58 % y a los 3 años del 36 %. El único tratamiento curativo es el trasplante hepático.

## 1.1 Características Clínicas

Se trata de un trastorno potencialmente reversible, aunque su presencia es un marcador de mal pronóstico en caso de insuficiencia hepática dado que implica una escasa reserva hepática funcional. De hecho, es un parámetro presente en varias clasificaciones de pronóstico como por ejemplo la de Child-Pugh<sup>3</sup> (Tabla 1):

	<b>1 Punto</b>	<b>2 Puntos</b>	<b>3 Puntos</b>
Albúmina sérica	> 35 g/dL	28-35 g/dL	< 28 g/dL
Bilirrubina sérica	< 2 mg/dL	2-3 mg/dL	> 3 mg/dL
T. Protrombina	> 50 %	30-50 %	< 30 %
Ascitis	No	Leve	Severa
Encefalopatía hepática	Ausente	Grado I-II	Grado III-IV

Tabla 1. Clasificación de Child-Pugh: Cuando la suma de puntos es de 5-6 se considera como insuficiencia hepática leve (Child A). Si puntúa entre 7 y 9 se clasifica como insuficiencia hepática moderada (Child B). 10 puntos o más (hasta 15, puntuación máxima) es una insuficiencia hepática grave (Child C).

Las manifestaciones clínicas de la EH pueden variar desde formas muy leves, subclínicas, sólo detectables mediante diferentes cuestionarios y pruebas psicotécnicas, pasando por formas apenas detectables clínicamente como cambios de carácter sutiles, pérdida del ciclo sueño-vigilia, a estadios confusionales progresivamente más graves que incluso interfieren en la vida cotidiana pudiendo llegar a acarrear una grave incapacitación y una disminución de la calidad de vida estos pacientes<sup>4</sup>. La EH puede llegar a ser crónica o, en ocasiones, recurrente.

En los casos de encefalopatía hepática clínicamente detectable se utilizan los criterios de West Haven para valorar el grado de la misma<sup>5</sup>.

<b>Estadio</b>	<b>Estado Mental</b>	<b>Asterixis</b>	<b>Electroencefalograma</b>
<b>I</b>	Euforia o depresión, confusión leve, habla poco clara, desórdenes del sueño (inversión del ciclo sueño-vigilia)	+/-	Ligeramente anormal
<b>II</b>	Letargia, confusión moderada	+	Ondas trifásicas lentas
<b>III</b>	Confusión marcada, habla incoherente, dormido pero despertable	+	Ondas trifásicas lentas
<b>IV</b>	Coma; respuesta inicial a estímulos dolorosos, posteriormente sin respuesta	-	Ondas lentas

Tabla 2. Estadios clínicos de la E.H de acuerdo con la clasificación de West-Haven.

Así pues, el término EH abarca desde un episodio aislado en un paciente con una enfermedad hepática crónica hasta un signo más de un fallo hepático agudo. Dada la amplitud del término, en el 11<sup>o</sup> Congreso Mundial de Gastroenterología que tuvo lugar en Viena en 1998 se llegó a un consenso para estandarizar la nomenclatura de acuerdo con el tipo de patología hepática<sup>6</sup>:

- Tipo A: Encefalopatía asociada a fallo hepático agudo.
- Tipo B: Encefalopatía asociada a by-pass porto-sistémico sin enfermedad hepática intrínseca.
- Tipo C: Encefalopatía asociada a cirrosis con hipertensión portal y/o shunts porto-sistémicos. A su vez se subdivide según las características de la clínica neurológica en:

a) Episódica:

a.1) Precipitada. Los factores desencadenantes suelen ser: diuréticos, infecciones, hemorragia gastrointestinal,... (Tabla 3)

a.2) Espontánea. Hay que descartar previamente la presencia de factores precipitantes.

a.3) Recurrente. Cuando se presentan dos o más episodios al año de EH.

b) Persistente: Implica déficits cognitivos que impactan negativamente en las funciones sociales y ocupacionales. Las anomalías no-cognitivas persistentes (por ejemplo: alteraciones extrapiramidales o alteraciones del sueño) requieren una clasificación distinta. La EH persistente se subclasifica según el grado de pérdida de autonomía (ver criterios de West Haven) en:

b.1) Leve: EH grado 1.

b.2) Moderada-grave: EH grado 2 a 4.



b.3) Tratamiento-dependiente: cuando presenta sintomatología clínica tras cesar el tratamiento.

c) Mínima: Aquellos casos en que sin presentar clínica evidente de EH presenta cambios sutiles en la actividad diaria habitual como un menor nivel de energía, alteración del ciclo sueño-vigilia, etc.

En caso de pacientes con cirrosis, la fisiopatogenia por la que pueden presentar EH es la suma de varios factores. Los más importantes son:

- La presencia de circulación colateral que realiza un efecto de by-pass del hígado (shunt). El grado de shunt, probablemente, esté en relación a la cantidad de sustancias nitrogenadas que fluye por la circulación colateral.
- El grado de insuficiencia hepatocelular: a menor capacidad depurativa del hígado mayor acúmulo de sustancias nitrogenadas procedentes del intestino que interfieren en las funciones cerebrales, mediante la alteración en el funcionamiento de los neurotransmisores que afecta la conciencia y el comportamiento. De forma experimental, se ha descrito que los sistemas neurotransmisores afectados son el sistema glutamatérgico, dopaminérgico, serotoninérgico, GABA-érgico y catecolaminérgico<sup>1</sup>.

En el caso de pacientes con fallo hepático fulminante, el motivo por el cual presentan encefalopatía hepática no está tan relacionado con la presencia de circulación colateral sino que el mecanismo parece ser la formación de edema cerebral agudo. Éste puede ser de origen vasogénico (acumulación de líquido en el espacio extracelular por alteración de la barrera hematoencefálica) o bien, de tipo citotóxico (acumulación de líquido intracelular, principalmente en los astrocitos). Blei et al<sup>7</sup> demostraron, en un estudio realizado en conejos con hepatitis fulminante inducida por galactosamina, un incremento progresivo del agua intracerebral que se correlaciona con la gravedad de la encefalopatía.

## **1.2 Fisiopatología de la EH**

Dado el comportamiento clínico de esta entidad, es poco probable que la causa desencadenante sea única. Al contrario, parece que puede existir más de un factor independiente y que interactúen entre sí e, incluso, se ha postulado que pudieran tener un efecto sinérgico<sup>8</sup>. Se ha observado que los pacientes con cirrosis presentan un descenso de los niveles plasmáticos de aminoácidos de cadena ramificada y un aumento de los aminoácidos aromáticos en el cerebro. Otros factores que potencialmente podrían estar involucrados son niveles altos de manganeso, radicales libres de oxígeno, péptidos opioides circulantes, citoquinas inflamatorias, reducción de los neurotransmisores serotoninérgicos y depleción de los antioxidantes endógenos del sistema nervioso central<sup>9</sup>.

Las teorías más estudiadas y por tanto mejor conocidas son:

### **1.2.1 Circulación de neurotoxinas**

Desde hace muchos años, el debate se ha centrado en el origen intestinal de las toxinas. Ya en 1952, se evidenció el alto contenido en nitrógeno de este tipo de toxinas como lo demuestra la presencia de EH cuando hay un aporte excesivo de productos nitrogenados, por ejemplo glutamina, o bien en caso de estreñimiento por un déficit de eliminación de las mismas<sup>10</sup>.

#### **•Amonio**

Es considerado el principal responsable de la EH dado que en estudios realizados por Weber et al se objetivó que:

a) Las medidas terapéuticas que disminuyen las concentraciones de amonio plasmático mejoran el grado de conciencia<sup>11</sup>.

b) El mecanismo de acción de diversos factores precipitantes puede explicarse a través de un incremento de las concentraciones de amonio plasmático<sup>12</sup>.

c) El amonio es una toxina que procede principalmente del colon y, en gran parte, es producida por la flora intestinal<sup>13</sup>.

En 1978, se demostró que en el intestino humano se generan nitritos y nitratos mediante procesos de nitrificación realizada por bacterias heterotróficas<sup>14</sup>. Posteriormente, se objetivó que los mamíferos pueden catalizar la formación de óxido nítrico (NO) a partir de nitrógeno de la L-arginina. El NO participa en funciones fisiológicas del cuerpo humano en el sistema cardiovascular, inmunológico y nervioso central. A pesar de todo esto, la mayoría del nitrógeno es ingerido, asimilado y excretado en estado oxidativo<sup>15</sup>.

Parece que la amoniogénesis depende del metabolismo de los aminoácidos (principalmente glutamina) en la mucosa del intestino delgado y de la metabolización de la urea por las bacterias del colon. Se ha observado que la actividad de la glutaminasa intestinal (PAG) (phosphate-activated intestinal glutaminase) es casi cuatro veces mayor en los pacientes cirróticos respecto al grupo control<sup>16</sup>. También se ha demostrado a nivel experimental en rata portadora de una derivación portocava un incremento de la actividad de la PAG de los enterocitos<sup>17</sup>. Esto podría explicar algunos aspectos ya descritos como sería el incremento de los niveles de amonio tras una sobrecarga de glutamina en pacientes cirróticos pero que no ocurre en personas sanas o en pacientes a los que se les sometió a un trasplante hepático con éxito<sup>16,18,19</sup>. Asimismo también se ha detectado concentraciones más altas de amonio en la vena porta en los pacientes cirróticos portadores de una derivación intrahepática portosistémica (TIPSS)<sup>20</sup>. El mecanismo fisiopatológico por el cual este enzima está incrementado todavía no es conocido pero se ha demostrado que la glutaminasa es activada por el glucagón y por la angiotensina-II. Al mismo tiempo, se ha observado una hiperglucagonemia en pacientes cirróticos<sup>16,21,22</sup>. Se ha evidenciado que la glutamina y la PAG son esenciales para el mantenimiento del recambio de los enterocitos evitando así la atrofia intestinal, así como, también juegan un papel en el mantenimiento de la respuesta inmune contra las infecciones intestinales<sup>23</sup>.

Habitualmente el amonio se detoxifica mediante síntesis de urea en el hígado. Se considera que el hígado sano metaboliza por esta vía el 90 % del amonio que le llega por la vena porta<sup>24</sup>. La capacidad de sintetizar urea está disminuida en los pacientes cirróticos debido a su disfunción y a los shunts portosistémicos intra y extrahepáticos<sup>25</sup>.

Una vía alternativa para la detoxificación del amonio es la síntesis de glutamina con el consiguiente incremento de sus niveles plasmáticos. En este momento el sistema muscular adquiere una gran importancia<sup>25</sup>, ya que es allí donde el glutamato reacciona con el amonio formando glutamina.

A causa del incremento del amonio plasmático en los pacientes con EH se produce un aumento en el porcentaje de amonio que llega al sistema nervioso central<sup>26</sup> (SNC). Este incremento es debido posiblemente a la presencia de trastornos de la microcirculación cerebral<sup>27</sup>. A pesar de ello se ha observado que el grado de concentración de amonio plasmático no se correlaciona con la intensidad de la EH, dado que existen diferencias individuales en el paso de amonio al SNC. Sin embargo, se ha demostrado que los valores de glutamina en el líquido cefalorraquídeo, un índice de la exposición cerebral a amonio, sí que guardan buena relación con el grado de EH<sup>28</sup>. La permeabilidad de la barrera hematoencefálica al amonio está incrementada y el incremento de amonio en el SNC conlleva un mayor depósito de esta sustancia en los ganglios de la base y en el cerebelo lo que genera una disfunción motora y la presencia de síntomas extrapiramidales<sup>9</sup>. La hipótesis conocida como “el caballo de troya”, refiere que este exceso de amonio se intenta compensar mediante la conjugación de éste con el glutamato formando glutamina a través de la glutamina-sintetasa en el retículo endoplasmático liso, asimismo la glutamina es hidrozilada en la mitocondria por la PAG liberándose amonio y radicales libres que alteran la permeabilidad mitocondrial y facilita el edema astrocitario inducido por amonio<sup>27,28</sup>.

Los efectos deletéreos del amonio sobre el SNC son múltiples. Por acción directa disminuye la actividad de la enzima  $\alpha$ -cetoglutarato deshidrogenasa, por lo que inhibe el metabolismo energético cerebral<sup>29</sup>. Además, en la insuficiencia

hepática fulminante las concentraciones muy elevadas de amonio serían las responsables de la formación de potenciales de acción neuronales, que conducen a una acción proconvulsiva<sup>30</sup>. Asimismo, puede causar diversas alteraciones de la neurotransmisión<sup>31</sup>: interfiere con la neurotransmisión excitadora porque afecta al tránsito entre neurona y astrocito de glutamato y monoaminas, que son sustratos y compuestos neuroactivos en múltiples sistemas de neurotransmisión excitadora<sup>32</sup>. Además, el amonio tiene efectos agonistas sobre la transmisión gabérgica<sup>33</sup>, que es el principal sistema neurotransmisor inhibitor. El GABA actúa en la membrana de la neurona postsináptica activando un canal de cloro. (Ver apartado 1.2.3).

El ciclo de la urea es responsable de la eliminación del 90 % del exceso de nitrógeno y de la producción de arginina para la síntesis de proteínas o la conversión a urea. Un fallo del sistema implica un acúmulo de amonio y secundariamente de glutamina. Además, la arginina deviene un aminoácido esencial excepto si el fallo afecta al enzima final, la arginasa<sup>34</sup>.

La mayor parte de la ureogénesis ocurre en el hígado, el cual contiene los cinco enzimas implicados en el ciclo de la urea: carbamil-fosfato sintetasa-I, ornitina transcarbamilasa, ácido arginino-succínico sintetasa, arginosuccinasa y arginasa. Estos enzimas se encuentran sobre todo en los hepatocitos periportales, concretamente dos de ellos (carbamil-fosfato sintetasa-I y ornitina transcarbamilasa) en la matriz mitocondrial de los hepatocitos y en el intestino. Los otros tres (ácido arginino-succínico sintetasa, arginosuccinasa y arginasa) a nivel del citosol de las células hepáticas, pero también se hallan presentes en otros tejidos extrahepáticos como riñón y cerebro. La succinil-arginina y la arginosuccinasa se hallan también en los fibroblastos (tejido muscular). De ahí, que cuando el hígado no puede metabolizar el amonio por insuficiencia hepática, el riñón, el tejido muscular, el intestino e incluso el cerebro metabolizan, al menos parcialmente, el amonio (Figura 1).

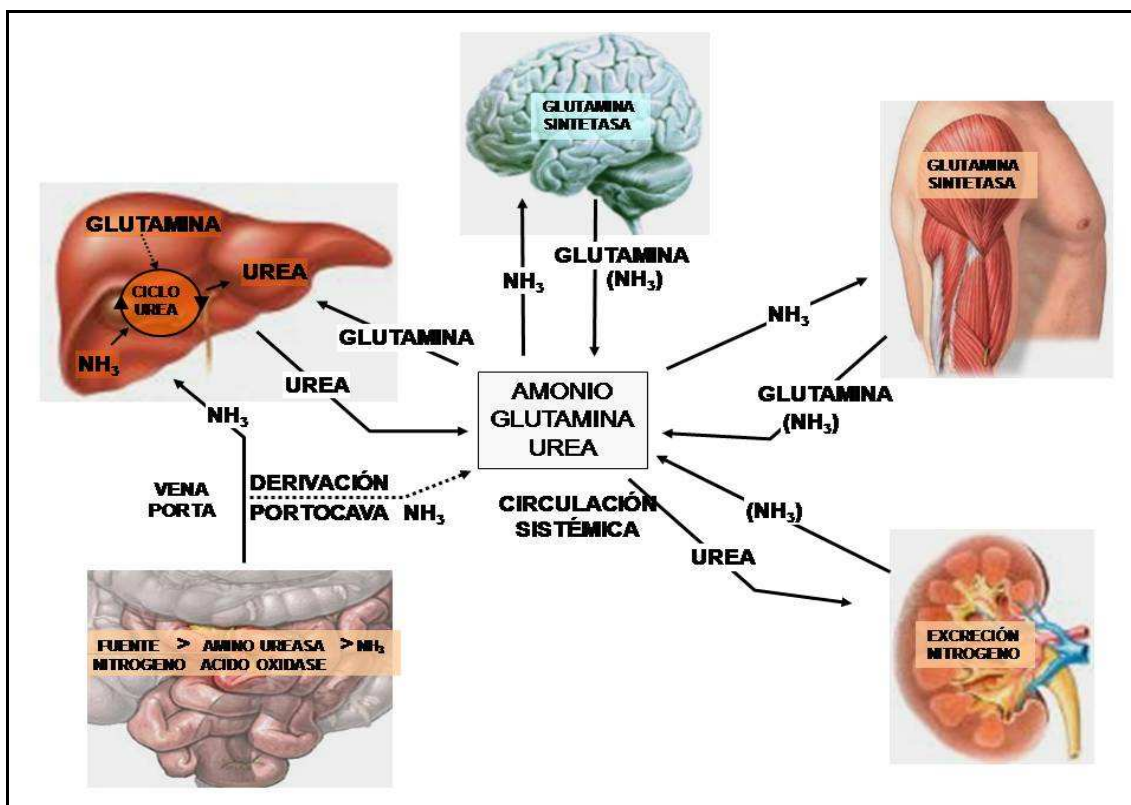


Figura 1: El ciclo del amonio (producción, metabolismo y excreción) y su relación con los diferentes órganos del cuerpo humano.

Otra fuente de amonio sería el riñón. La glutamina circulante, a nivel renal, se convierte en amonio. La excreción de amonio por la orina juega un papel importante en la regulación del equilibrio ácido-base<sup>15</sup>, cuando se produce una situación de acidosis los niveles plasmáticos de glutamina permanecen estables, por lo que para mantener estos niveles, otros órganos han de aumentar la excreción de glutamina. Se ha demostrado en ratas que la acidosis estimula el incremento de excreción de glutamina en el músculo, por el contrario, el hígado habitual consumidor de glutamina deviene un productor de ésta<sup>15</sup>.

## • Benzodiazepinas

La administración de benzodiazepinas se considera un factor desencadenante de EH en pacientes cirróticos. Las benzodiazepinas son el grupo farmacológico más empleado en el tratamiento de la ansiedad. La primera de ellas, el

clordiazepóxido, se introdujo en 1957 y abrió el camino para la comercialización de una gran cantidad de otros derivados. Sus acciones farmacológicas: acción ansiolítica, relajante muscular, anticonvulsionante e hipnótica se deben a que mimetizan los efectos del GABA. La acción del GABA permite la entrada del ión cloro ( $\text{Cl}^-$ ) dentro de las neuronas lo que lleva a su hiperpolarización. Como consecuencia la neurona se vuelve menos sensible a los estímulos activadores por lo que se produce un estado de inhibición neuronal. Es posible potenciar este efecto mediante la acción facilitadora de las benzodiazepinas que actúan sobre el sitio benzodiazepínico del complejo del receptor  $\text{GABA}_A$ ; este efecto no se produce en ausencia de GABA.

El efecto de las benzodiazepinas modifica la disposición estructural tridimensional del receptor, potenciando el efecto de apertura del canal de cloro por la acción del GABA. Esta acción se conoce como modulación alostérica (región de la enzima que modula la actividad de la enzima).

Al mismo complejo de receptor  $\text{GABA}_A$  se fijan otros fármacos como la picrotoxina, los barbitúricos, el alcohol o algunos péptidos endógenos que lo hacen en puntos diferentes y con efectos también diferentes<sup>35,36</sup> pero que podrían tener una acción parecida a las benzodiazepinas (benzodiazepinas-like)<sup>37</sup>.

El flumazenilo es un antagonista benzodiazepínico; en realidad se trata de un agonista parcial con mínima actividad intrínseca. Su vida media plasmática no llega a los 60 minutos por lo que debe administrarse de forma repetida en caso de intoxicación por benzodiazepinas de semivida larga. Este mecanismo de acción podría explicar la presencia, en los estudios, de un subgrupo de pacientes (en torno al 30%) que mejora su grado de EH gracias a la administración de flumazenilo<sup>37</sup>, sin haberse administrado benzodiazepinas.

## • Manganeso

El manganeso es un neurotóxico que afecta tanto a las neuronas como a los astrocitos (genera cambios tipo II de Alzheimer<sup>38</sup>). Se han objetivado niveles elevados de manganeso en plasma y en tejido cerebral en pacientes con

cirrosis fallecidos en coma hepático<sup>39</sup>. El metabolismo del manganeso no es del todo bien conocido pero parece que en este tipo de pacientes el incremento de manganeso se produce por derivación de sangre portosistémica y por una eliminación biliar deficiente<sup>40</sup>. Se considera que la acumulación de manganeso origina el incremento característico de la señal T1 que se observa en la resonancia magnética cerebral<sup>41</sup>. Estos cambios parece que corresponden a un depósito anómalo de manganeso, especialmente en el núcleo caudado y en el globus pallidus. Estos hallazgos han sido corroborados en estudios *post.mortem* en pacientes cirróticos fallecidos en coma hepático<sup>42,43,44</sup>. Aunque la correlación entre las concentraciones plasmáticas de manganeso y las manifestaciones clínicas de EH no es buena<sup>45</sup>, se cree que por similitud con la intoxicación crónica por manganeso, el incremento de este elemento podría ser el responsable de los síntomas extrapiramidales que se observan con la progresión de la enfermedad hepática ya que la neurotoxicidad del manganeso afecta principalmente a la neurotransmisión dopaminérgica<sup>44</sup>.

### **1.2.2 Astroцитos**

Los astroцитos son las células más abundantes del cerebro; son células de sostén. Tienen gran actividad metabólica y su función principal es la de regular el microambiente cerebral mediante un control estricto de la concentración de sustancias del compartimento intersticial. Asimismo, determinan el funcionamiento neuronal regulando la cantidad de iones extracelulares y de neurotransmisores en las sinapsis<sup>46</sup>. Se ha descrito que en los casos de EH los astroцитos presentan cambios morfológicos caracterizados por un núcleo pálido, grande, edematoso, lobulado, con la cromatina dispuesta en la periferia y con un nucleolo prominente. En los casos de EH crónica pueden tener inclusiones de nítrógeno. Todos estos hallazgos neuropatológicos son propios de células de Alzheimer tipo II<sup>47,48</sup>. Estos cambios en las células gliales sólo se evidencian en la materia gris como neocórtex, ganglios de la base, tálamo y el cerebelo, siendo mucho menos frecuente en el tronco cerebral y en la médula espinal y, muy raramente, se hallan en el hipocampo. No se han encontrado en la materia blanca.



Los estudios realizados en cultivos de células astrocíticas han objetivado que la presencia de dosis altas de amonio inducen la formación de células de Alzheimer tipo II<sup>49</sup>. Asimismo, la hiperamoniemia no sólo altera morfológicamente la célula, sino que también puede alterar su funcionalidad, disminuyendo la actividad de la monoaminaoxidasa (MAO), que es el principal enzima implicado en el metabolismo de algunos de los neurotransmisores (catecolaminas, serotonina)<sup>47</sup>. Dosis 10mM de cloruro amónico reducen la capacidad de los agonistas  $\beta$ -adrenérgicos para incrementar los valores intracelulares de AMP-cíclico, alterando la fosforilación de proteínas e induciendo una franca disminución en el contenido de la proteína ácida glial que es crucial para el mantenimiento de la forma celular. Todos estos cambios podrían contribuir al desarrollo de edema cerebral<sup>47,49</sup>. Se ha propuesto que el edema astrocitario, no sólo es consecuencia del efecto osmótico del metabolismo del amonio, sino también del incremento de la osmolaridad intracelular, que se produce tras la síntesis de glutamina en el astrocito. Otros factores que podrían intervenir en el desarrollo de edema astrocitario son el efecto de las citoquinas y la acción de las benzodiacepinas<sup>50</sup>. El astrocito dispone de un sistema para contrarrestar el incremento de osmolaridad, que incluye la disminución de mioinositol intracelular<sup>51</sup>. Este mecanismo explicaría el hallazgo, mediante resonancia espectroscópica, de un incremento de glutamina y una disminución del mioinositol cerebral en la EH<sup>52</sup>.

Por tanto, parece que la disfunción astrocitaria, secundaria al edema de estas células, podría ocasionar alteraciones neuronales, que causarían las manifestaciones neurológicas de la EH<sup>50</sup>. Estudios de neuroimagen han confirmado la presencia de signos de edema cerebral leve en pacientes con cirrosis hepática<sup>53</sup>. Asimismo, por lo que se ha observado en la resonancia magnética se podría establecer una asociación entre la función neuronal de la vía corticoespinal y el desarrollo de signos de edema en esta vía<sup>54,55</sup>, que apoyarían la hipótesis de que el edema astrocitario causaría una disfunción neuronal.

### **1.2.3 Sistemas de neurotransmisión**

Los sistemas de neurotransmisión afectados en la EH son los mediados por glutamato y GABA, sistema excitador e inhibitor respectivamente. Pero probablemente, haya más alteraciones implicadas, que aún no están bien establecidas.

#### **· Glutamato**

El glutamato y el aspartato son aminoácidos dicarboxílicos presentes en concentraciones elevadas en el cerebro y que poseen efectos excitadores sobre las neuronas de cualquier región del SNC<sup>56</sup>.

El L- glutamato cerebral que se sintetiza en la terminación nerviosa procede, a través del ciclo de Krebs, de la glucosa y posterior transaminación de  $\alpha$ -oxoglutarato. Otra fuente de glutamato es la glutamina sintetizada en la glía, que es transportada hasta la terminación nerviosa donde, gracias al enzima glutaminasa, se produce glutamato. El mensajero formado es después captado y se almacena en vesículas sinápticas. Cuando es liberado actúa como neurotransmisor sobre los receptores específicos de la neurona postsináptica. Existe también un proceso de recaptación sináptica de glutamato de alta afinidad que desempeña un papel muy importante en la membrana plasmática al mantener los niveles extracelulares de glutamato por debajo de las concentraciones que pueden producir excitotoxicidad.

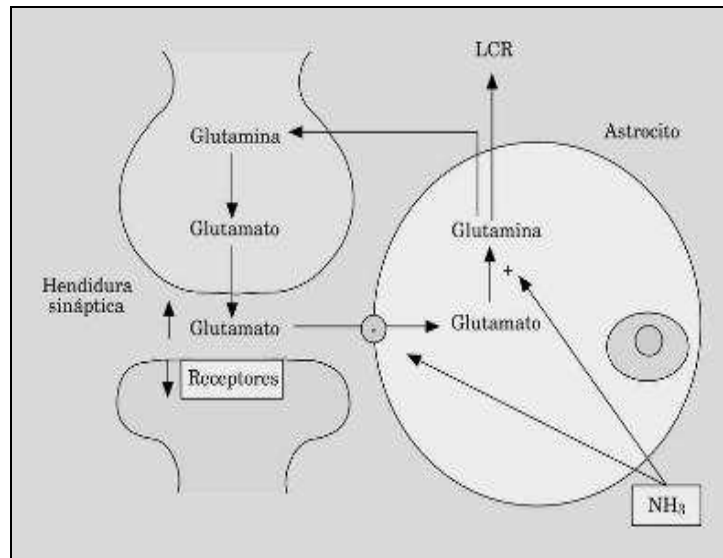
Los receptores del glutamato son cuatro tipos:

- NMDA (ácido-N-metil-D-aspartato): Es un receptor excitador que posee varios centros de modulación alostérica que son: a) un lugar de fijación del L- glutamato que promueve la apertura de un canal de alta conductividad que permite la entrada de iones sodio y calcio generando numerosos procesos de señalización intracelular; b) un lugar de fijación de la glicina (transmisor inhibitor más importante en la médula espinal) que tiene una acción facilitadora sobre el receptor NMDA de glutamina y el glutamato sea efectivo; c) Un lugar de fijación de la fenciclidina y otros antagonistas no

competitivos relacionados como la dizolcipina (de eficacia controvertida en el tratamiento de las enfermedades cerebro-vasculares) y la ketamina ubicados dentro del canal (bloqueo con canal abierto); d) Un lugar de fijación del ión magnesio que es el responsable que sea un canal dependiente de voltaje; e) un lugar de inhibición de fijación de otros iones divalentes, situado cerca de la entrada del canal y fija el cinc para producir un bloqueo independiente de voltaje y; f) un lugar regulador que fija poliaminas (espermina y espermidina) facilita la transmisión mediada por el receptor NMDA<sup>56</sup>.

- AMPA:  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-metilixosazol-4-propiónico.
- Kainato: Tanto este receptor como el AMPA median acciones sinápticas excitadoras rápidas que están asociadas a canales de apertura independiente de voltaje, canales que conducen corrientes despolarizantes, primordialmente debidas a la entrada de sodio. Algunos receptores de kainato se localizan en terminaciones presinápticas GABA-érgicas mediando así una disminución de la liberación de este neurotransmisor inhibitorio.
- Receptor metabotrópico formado por una familia de ocho subtipos que media la variación de los niveles intracelulares de inositoltrifosfato y  $Ca^{2+}$  libre. Están mediados principalmente por proteínas G y, por lo tanto, son generadores de respuestas sinápticas lentas. La amplia distribución de estos receptores y la prevalencia del glutamato como neurotransmisor son hechos indicativos de su importancia como moduladores del SNC<sup>56</sup>.

Se cree que el glutamato está implicado en el proceso de detoxificación de amonio produciendo glutamina. En diferentes estudios, tanto en animales de experimentación como en tejidos obtenidos de pacientes fallecidos en coma hepático<sup>57</sup>, se ha objetivado una disminución de los niveles de glutamato intracerebral, así como alteraciones en los transportadores y receptores de glutamato (Figura 2).



**Figura 2:** Los principales elementos de la neurotransmisión excitadora glutamatergica incluyen: a) el ciclo glutamato-glutamina entre astrocito y neurona. En el astrocito se sintetiza glutamina a partir del glutamato recaptado por los transportadores GLT-1 y GLAST. La glutamina llega a la neurona, donde se transforma en glutamato, que se almacena en vesículas junto al glutamato que proviene de la recaptación neuronal mediada por el transportador EAAC (excitatory amino-acid carrier) produciéndose un aumento de los niveles de glutamina en el líquido cefalorraquídeo (LCR) b) Para detoxificar el amonio plasmático se produce una estimulación de la metabolización de glutamato a glutamina en los astrocitos, que se elimina por el líquido cefalorraquídeo (LCR) y por la sangre venosa, y c) la acción del glutamato extracelular sobre diferentes tipos de receptores se altera con la presencia de amonio inhibiéndose su recaptación por el astrocito, lo que provoca un aumento del glutamato en la hendidura sináptica<sup>58</sup>.

## • Ácido-γ-aminobutírico (GABA)

Fue identificado por primera vez como constituyente químico del SNC en 1950 y alcanza concentraciones muy elevadas de orden milimolar mucho mayores que las detectadas en el caso de las aminas neurotransmisoras por ejemplo las catecolaminas, de orden nanomolar. Se considera el principal neurotransmisor inhibitorio del sistema nervioso central, pues se encuentra en aproximadamente un 30 % de las sinapsis del cerebro y de la médula espinal<sup>56</sup>.

Se sintetiza a partir del glutamato, en las neuronas presinápticas, catalizado por la descarboxilasa de L-glutamato. No obstante, buena parte del GABA y del glutamato utilizados como neurotransmisores derivan del *pool* de glutamina existente en las células gliales. La principal vía de inactivación de GABA es mediante un sistema específico de transporte activo dependiente de sodio cuya proteína responsable se halla tanto en la neurona como en la glía. El GABA tiene una función dual como neurotransmisor y como intermediario metabólico, por lo que es captado por la glía y por las neuronas. Se han descubierto cuatro formas distintas del transportador de GABA, tres de ellas ubicadas tanto en la glía como en la neurona. Este aminoácido neurotransmisor es inactivado también por la acción secuencial de los enzimas GABA-transaminasa (GABA-T) y semialdehído succínico-deshidrogenasa, dando lugar a metabolitos intermedios que pueden ser empleados para la síntesis de glutamato. La GABA-T es una proteína mitocondrial de localización tanto neuronal como glial y es inhibida por el fármaco anti-epiléptico vigabatrina<sup>56</sup>.

El GABA actúa como neurotransmisor de numerosas interneuronas locales de trayecto corto como, por ejemplo, las células en cesto del cerebelo y el hipocampo, las células de Purkinje del cerebelo, las células granulares del bulbo olfatorio y las células amacrinas de la retina. Además, en algunos casos es el transmisor de ciertos tractos de mayor longitud, como las vías eferentes que parten del estriado que se proyectan al globo pálido y a la zona reticular de la sustancia negra.

Los receptores del GABA están ubicados tanto en el astrocito como en las neuronas centrales. Se conocen tres subtipos:

- GABA<sub>A</sub> de localización postsináptica. Es el más abundante, interviene en los procesos rápidos de neurotransmisión de tipo inhibitor que conduce a la reducción de la excitabilidad de la membrana celular. Éste puede ser modulado alostéricamente por tres grupos de fármacos, las benzodiazepinas, los barbitúricos y los alcoholes. Se han descrito siete clases de subunidades polipeptídicas ( $\alpha, \beta, \gamma, \delta, \epsilon, \theta$  y  $\rho$ ) y múltiples isoformas para cada clase, actualmente hay identificadas 18 unidades.

- GABA<sub>B</sub> de localización pre y postsináptica pertenece al grupo de los receptores metabotrópicos acoplados a proteína G. Su acción consiste en mediar la inhibición presináptica sobre terminales nerviosos y la inhibición postsináptica en pericarios y dendritas.
- GABA<sub>C</sub> se sabe que existe un tercer receptor activado por los análogos del GABA del que aún se desconocen muchos aspectos.

La proteína integral de membrana que interactúa con el GABA es el receptor GABA-benzodiacepínico. Cuando interactúan se produce un aumento de la conductancia del ión cloro en la membrana postsináptica de las células nerviosas, inhibiendo las descargas neuronales<sup>59</sup>.

Un descenso en la concentración de glutamato podría conllevar una disminución de la síntesis del neurotransmisor. Asimismo, se ha sugerido que el fallo hepático se asocia a una degeneración de los terminales GABAérgicos y, por tanto, a un descenso de la síntesis de GABA<sup>60</sup>.

En el paciente con EH existe un aumento del tono GABAérgico. Posiblemente este incremento del tono GABAérgico podría ser el resultado de un aumento en la disponibilidad de GABA extracelular o ligandos de receptores a benzodiacepinas. En el SNC el amonio se combina con  $\alpha$ -cetoglutarato para formar glutamato, el cual a su vez sufre un proceso de amidación y produce GABA y las alteraciones mencionadas podrían resultar en una rotura de los mecanismos homeostáticos finos de este neurotransmisor inhibitorio por un aumento en su biodisponibilidad<sup>47</sup>.

## • **Serotonina**

La serotonina o 5-hidroxitriptamina (5-HT) se identificó en 1948 y se demostró que se origina en las plaquetas. Posteriormente, se detectó en el aparato digestivo y en el SNC donde actúa como neurotransmisor. Actualmente se considera que es un mediador que interviene de forma complementaria en muchas funciones pero no es responsable de ninguna de ellas, por lo que se considera que sería una especie de “mediador sin cartera”<sup>61</sup>.

El precursor de la serotonina es el triptófano, un aminoácido derivado de la dieta, que es captado por las neuronas y se convierte en 5-HT tras la intervención de la triptófano hidroxilasa y una descarboxilasa<sup>62</sup>. Actúa sobre siete tipos de receptores (numerados del 1 al 7) con varios subtipos en el caso de los receptores 5-HT<sub>1</sub> y 5-HT<sub>2</sub>. Todos son receptores acoplados a proteínas G, excepto 5-HT<sub>3</sub> que es un canal catiónico. Los receptores 5-HT<sub>1</sub> se encuentran principalmente en el SNC y sus principales efectos consisten en inhibición neuronal y vasoconstricción<sup>61</sup>.

Las funciones en las que interviene la serotonina son la regulación del ciclo sueño-vigilia, el estado de ánimo y el aumento del apetito. Por otra parte se sabe que un déficit de serotonina produce respuestas exageradas como respuestas de evitación a estímulos que normalmente no producirían este efecto. Parece que podría intervenir también en la regulación de la temperatura corporal, la tensión arterial y la función sexual<sup>62</sup>.

En pacientes con EH, se ha objetivado una elevación de los niveles de serotonina probablemente debido a un aumento de la captación de triptófano (precursor de la serotonina) a través de la barrera hematoencefálica. Las alteraciones en el ciclo sueño-vigilia podrían ser explicadas por el exceso de serotonina<sup>47</sup>.

### **- Catecolaminas**

Se conocen como catecolaminas a la dopamina, noradrenalina y adrenalina. Se caracterizan por contener en su estructura química un grupo aromático catecol unido a una cadena lateral etilamino. La noradrenalina es el neurotransmisor primordial en el sistema nervioso simpático periférico, mientras que la adrenalina se libera fundamentalmente en la médula suprarrenal. La dopamina es un importante neurotransmisor en los ganglios basales del SNC aunque también posee acciones periféricas fundamentalmente acciones cardiovasculares y renales.

Para sintetizar las catecolaminas se requiere la actividad de cuatro enzimas. El primer paso consiste en la hidroxilación del anillo fenólico del aminoácido L-

tirosina mediante el enzima tirosina-hidroxilasa, dando lugar a L-dihidroxifenilalanina (L-dopa). Posteriormente intervienen los enzimas dopa-descarboxilasa (se forma dopamina), dopamina- $\beta$ -hidroxilasa (se sintetiza L-noradrenalina) y finalmente, gracias a la acción del enzima feniletanolamina-N-metiltransferasa se obtiene la L-adrenalina.

La actividad de la tirosina-hidroxilasa se relaciona con los niveles tisulares de catecolaminas: este enzima aumenta su actividad cuando se estimula el simpático y se inhibe cuando los niveles tisulares de catecolaminas aumentan.

En relación con la EH se han postulado varias hipótesis sobre la posibilidad que en estos pacientes exista una alteración del enzima tirosina-hidroxilasa y se pudieran sintetizar aminas con menor actividad intrínseca que competirían con las catecolaminas por sus receptores, dando lugar a una disminución del tono simpático.

#### **1.2.4 Otras teorías**

##### **- Muerte celular de las neuronas**

Se ha asumido que la muerte celular de las neuronas es mínima en los casos de fallo hepático y es insuficiente para dar síntomas neuropsiquiátricos característicos de la EH. Sin embargo y contrariamente a lo que se piensa, se han descrito varias enfermedades donde el daño celular e incluso la muerte neuronal están presentes en pacientes con fallo hepático como la degeneración hepatocerebral, parkinsonismo relacionado con la cirrosis, mielopatía post-shunt y la degeneración cerebelar. Asimismo, se piensa que existen mecanismos compensatorios que incluyen la hipotermia, una menor regulación (down-regulation) de los receptores NMDA, la presencia de esteroides neuroprotectores como la allopregnanolona y la movilización de citoquinas antiinflamatorias como la IL-10. Estos hallazgos sugieren que las “secuelas” como la pérdida de memoria, la marcha atáxica, la confusión en los pacientes post-trasplantados podrían deberse patología neuronal previa<sup>63</sup>.



## · **EH en la hepatitis crónica C**

Muchos de los pacientes infectados por el virus de la hepatitis C (VHC) se quejan de fatiga crónica y de alteraciones cognitivas. A pesar de que algunos expertos lo atribuyen a los efectos psicológicos de saber que se sufre esta enfermedad, algunos autores han podido demostrar la presencia de estos síntomas en pacientes que desconocían que estuvieran infectados por el VHC. En los últimos años, varios grupos de investigadores han publicado distintos trabajos donde se evidencian diferentes déficits de atención y de memoria en la hepatitis crónica C<sup>64,65</sup>. Asimismo, se han observado por resonancia magnética multimodal alteraciones a nivel cerebral. Se trata de una reducción significativa de volumen así como alteraciones microestructurales en el córtex prefrontal dorsolateral, la ínsula, el cerebelo y el estriado. También se han realizado resonancias magnéticas espectroscópicas que muestran una disminución en la intensidad de la señal del N-acetil-aspartato/creatina y/o un incremento en la señal de colina/creatina<sup>66</sup>. Recientemente, se han evidenciado alteraciones en la capacidad del transportador de dopamina y serotonina en este tipo de pacientes.

Aunque las teorías sobre estos déficits varían de unos autores que piensan que es debido a la infección crónica por el virus de la hepatitis C<sup>64, 66</sup>, mientras que otros opinan que las alteraciones neuropsicológicas detectadas en las pruebas realizadas en los pacientes con hepatopatía crónica, independientemente de su etiología, están en relación con el grado de fibrosis, es decir, a mayor grado de fibrosis peores resultados en las pruebas realizadas y, por tanto, una menor calidad de vida. Asimismo, los resultados obtenidos sugieren que estas alteraciones pueden ser previas a la presencia de cirrosis<sup>67</sup>.

## · **Posible predisposición genética a padecer encefalopatía hepática**

Es bien conocido que el amonio es una de las causas principales de EH. Como se ha descrito anteriormente la fuente principal de amonio proviene de la absorción de éste por el intestino y su drenaje por el sistema portal. La

actividad de la PAG duodenal está incrementada en casi cuatro veces en los pacientes con cirrosis, si bien, no todos ellos desarrollan EH tras una sobrecarga de glutamina<sup>16</sup>. Para estudiar estas diferencias inter-individuales, se realizó un estudio para demostrar la asociación entre los polimorfismos genéticos y el riesgo de desarrollar EH. Recientemente, (datos sin publicar) Romero-Gomez en el Internacional Symposium on Hyperammonemia and Hepatic Encephalopathy (Valencia, septiembre 2007) presentó los resultados de un trabajo donde se seleccionaron 5 haplotipos (TGTC, TGTG, TGCG, TACG, CACG) en función del riesgo de los pacientes de presentar EH tras una sobrecarga de glutamina oral y evidenciaron una correlación entre el haplotipo TACG y una mejor función hepática con menor producción de amonio y un menor riesgo de EH.

- **Mecanismos a nivel molecular**

- Papel de las citoquinas: El edema cerebral puede ser debido a muchas causas tales como traumatismos, isquemia o trastornos metabólicos entre otros. Un hallazgo frecuente en estas situaciones es que se desencadene una respuesta inflamatoria que puede favorecer la formación de edema cerebral. Uno de los eventos críticos para desarrollar edema cerebral es la rotura de la barrera hemato-encefálica que puede ser generada y mediada por varios mediadores proinflamatorios como citoquinas, quimioquinas, mediadores oxidativos...Estos mediadores no tan sólo regulan la cantidad de leucocitos extravasados en el parénquima cerebral sino que también actúan sobre las células endoteliales en los complejos de unión de las células endoteliales incrementándose así la permeabilidad de la barrera endotelial que favorece el edema vasogénico. Respecto a las quimioquinas, una de las más frecuentemente observada es la MCP-1 ( monocyte chemoattractant protein-1 ) que puede causar remodelación del complejo de unión interendotelial y reordenamiento de la actina del citoesqueleto endotelial que se considera un proceso subyacente en la vía de formación de edema paracelular entre las células endoteliales del cerebro<sup>68</sup>.

- Papel del estrés oxidativo: *In vitro* se ha evidenciado que el edema astrocitario es inducido por la hiposmolaridad, el amonio, las benzodiazepinas y las citoquinas inflamatorias que se acompaña de la inducción de una respuesta de estrés nitrosativo/oxidativo involucrando las isoenzimas de NADPH oxidasa y nNos<sup>69</sup>. Se ha observado que, tanto *in vivo* como en cultivos de astrocitos, el amonio induce un aumento de los radicales libres que conlleva una disminución de los niveles de glutatión así como de los enzimas antioxidantes (glutatión peroxidasa, superóxido dismutasa y catalasa), además se da un incremento en la producción del radical superóxido. Como consecuencia de este estrés oxidativo se produciría edema cerebral, parece que los antioxidantes bloquean el edema astrocitario inducido por amonio. Aunque se desconoce con exactitud como actúa el estrés oxidativo/nitrosativo en el edema astrocitario, se ha descrito que el estrés nitrosativo también tiene un papel en la neurotoxicidad inducida por el amonio, pues se ha evidenciado una mejoría con los inhibidores de la óxido nítrico sintetasa<sup>273</sup>.
- Papel de los enzimas colinérgicos a nivel cerebral: Se ha postulado que podría haber una relación entre la disfunción del sistema colinérgico a nivel cerebral y la EH en animales cirróticos<sup>70</sup>. Se realizó un estudio en ratas cirróticas con ligadura del conducto biliar y se estudió la actividad de la acetilcolinesterasa y la acetiltransferasa (enzimas colinérgicos presentes en el córtex cerebral) evidenciándose un incremento en la actividad catalítica del enzima acetilcolinesterasa mientras que la acetiltransferasa se mantenía estable. Este incremento de la actividad de la acetilcolinesterasa conlleva un descenso de los niveles del neurotransmisor acetilcolina. Estos hallazgos concuerdan con los observados en el córtex frontal de los pacientes con EH donde también se ha evidenciado un desequilibrio entre los enzimas colinérgicos con mayor actividad de la acetilcolinesterasa (incremento de aproximadamente un 30 %) sin acompañarse de cambios de la acetiltransferasa<sup>70</sup>.
- Papel de los neurotransmisores glutamatérgicos. Se ha demostrado que la neurotransmisión glutamatergica está alterada a diferentes niveles en los

pacientes con fallo hepático e hiperamonemia. Se han descrito alteraciones a nivel ionotrópico del receptor NMDA, así como en las vías de transducción asociadas a este receptor<sup>71</sup>. Las alteraciones a nivel ionotrópico en los receptores de glutamato producen un incremento a nivel del calcio intracelular que se une con la calmodulina y activa la síntesis del óxido nítrico que produce una activación de la guanilato ciclasa y a su vez genera un incremento del guanosin-monofosfato cíclico (cyclic Guanosine monophosphate –cGMP-). Esta vía modula importantes procesos cerebrales tales como el ritmo circadiano (ritmo de sueño-vigilia) y algunas formas de aprendizaje y memorización<sup>72</sup>. Parece que estas alteraciones ocurren selectivamente en las neuronas sin afectar a los astrocitos<sup>73</sup>.

### **1.3. Alteraciones asociadas a la cirrosis que influyen en la EH**

La EH es una de las complicaciones de la cirrosis en fase evolucionada, pero no es la única. Otras manifestaciones de la cirrosis son debidas a la hipertensión portal que genera: descompensación ascítico-edematosa, desarrollo de circulación colateral como varices esófago-gástricas y la rotura de éstas produciendo hemorragia digestiva. Asimismo la cirrosis produce alteraciones en el sistema inmunitario, complicaciones hematológicas como anemia, alteraciones de la coagulación, alteraciones endocrinas (feminización, hipogonadismo, diabetes...), así como complicaciones cardiológicas y pulmonares como el síndrome hepatopulmonar o el porto-pulmonar.

De todas las complicaciones que pueden presentarse en la cirrosis, destacaremos las alteraciones del sistema inmunitario con el consiguiente aumento de la tasa de infecciones y la mayor probabilidad de bacteriemias, lo que puede desencadenar un episodio de EH.

### **1.3.1 Alteración del Sistema Inmunitario de los Pacientes con Cirrosis**

#### **· Inmunidad local**

Los pacientes cirróticos presentan un déficit en la secreción local (intraluminal) y biliar de IgA, lo que favorece la adhesión bacteriana a la superficie intestinal<sup>74</sup>, por lo que las bacterias adheridas a la superficie enterocitaria son fagocitadas por los macrófagos del sistema GALT y transportados a los GLM. Si a este nivel fracasa la lisis intracelular, las bacterias quedan indemnes para la migración sistémica<sup>75</sup>. Asimismo, dadas las múltiples alteraciones inmunitarias sistémicas que presentan estos pacientes (alteración del funcionalismo de los neutrófilos, de la inmunidad humoral y celular)<sup>16, 68-72</sup>, la barrera inmunitaria intestinal está probablemente poco preservada.

#### **· Inmunidad sistémica**

La llegada del germen a la circulación general pone en marcha una serie de mecanismos inmunológicos para eliminarlo. El sistema retículo-endotelial hepático constituye el principal mecanismo de defensa contra las bacteriemias y las infecciones con diseminación hematógona, como la peritonitis bacteriana espontánea (PBE)<sup>76, 77</sup>. La activación del sistema del complemento producido por la bacteriemia provoca la lisis directa del microorganismo (capacidad bactericida) o bien su recubrimiento por los componentes del complemento, la fibronectina y las globulinas. Las sustancias mediadoras de esta cascada inmunológica, y en concreto la fracción C<sub>5</sub>a del complemento, actúan como quimiotácticos de los neutrófilos que en último término destruirán la bacteria. Todos estos mecanismos están alterados en los pacientes cirróticos que presentan infecciones bacterianas<sup>78</sup>.

- 1) Alteración del sistema retículo-endotelial hepático. Este sistema está formado por una serie de macrófagos (células de Kupffer en el caso del hígado) situadas en las paredes endoteliales que tienen como misión principal destruir bacterias y otras partículas ajenas al organismo. El 90 %

de la capacidad fagocítica del sistema retículo-endotelial del organismo se concentra en el hígado.

Se ha demostrado que los pacientes con depresión de la actividad fagocítica del sistema retículo-endotelial desarrollan más bacteriemias y/o peritonitis bacterianas espontáneas en comparación con los que tienen la capacidad de este sistema conservada<sup>79</sup>. Asimismo, en un modelo experimental en ratas cirróticas la administración endovenosa de *E.Coli* provoca una bacteriemia significativamente más prolongada que en los controles sanos, lo que sugiere indirectamente una alteración en el sistema retículo-endotelial<sup>80</sup>.

La patogenia de la depresión de este sistema es multifactorial. Por una parte, la capilarización de los sinusoides hepáticos y la presencia de derivaciones tanto intrahepáticas como extrahepáticas, anatómicas o funcionales, hacen que una parte del flujo sanguíneo hepático no esté en contacto directo con las células de Kupffer, por lo que impide que puedan realizar su función<sup>77,81,82</sup>. La correlación directa evidenciada entre la actividad del sistema retículo-endotelial y los niveles de gammaglobulinas<sup>79,83</sup> favorecen esta teoría, si bien existen controversias sobre la relación entre la actividad del sistema retículo-endotelial y el grado de insuficiencia hepatocelular<sup>79,83,84</sup>. Por otra parte, la disminución de la actividad opsonica sérica que presentan los cirróticos (mediada por el complemento, la fibronectina y los anticuerpos específicos) repercute en la actividad del sistema retículo-endotelial haciendo inviable la fagocitosis bacteriana. Además, existen otros cofactores como el shock hipovolémico y la malnutrición que también deprimen la actividad de este sistema. Por último, se ha sugerido que los pacientes con insuficiencia hepática avanzada presentan una disfunción de los receptores Fc-gamma de los macrófagos, impidiendo así su función fagocítica y lo que condiciona una mayor susceptibilidad a las infecciones sistémicas graves<sup>85</sup>.

Por todo ello, la actividad de este sistema está alterado en los pacientes con cirrosis lo que conlleva una elevada incidencia de bacteriemias.

- 2) Alteración de la inmunidad humoral y celular. Los pacientes cirróticos presentan una inmunidad humoral específica conservada, con títulos elevados de anticuerpos contra microorganismos y productos de la dieta<sup>86,87</sup>. En cambio, presentan una depresión de la inmunidad inespecífica (capacidad opsonica y bactericida del suero). Concretamente, la capacidad sérica contra *E. Coli* está especialmente disminuida en pacientes con cirrosis avanzada<sup>88</sup>. Lo mismo sucede con la capacidad opsonica, dado que presentan déficits de las principales opsoninas, como el complemento y la fibronectina<sup>89,90</sup>. Pese a la importancia de estas alteraciones, que contribuyen a prolongar la bacteriemia, el papel de la depresión de la capacidad opsonizante y bactericida del suero parece ser menos determinante en la patogenia de la PBE que la alteración observada en el líquido ascítico. La alteración de la inmunidad celular descrita en los pacientes cirróticos (disminución de la activación y proliferación de los linfocitos T)<sup>91</sup> parecen tener poca relevancia en la patogenia de la peritonitis bacteriana espontánea.
- 3) Alteración de los neutrófilos. Los neutrófilos constituyen el mecanismo fundamental de eliminación de los gérmenes de los tejidos. Una elevada proporción de cirróticos presentan una disminución de la quimiotaxis de los neutrófilos, como inhibidores plasmáticos de la migración granulocítica. Las alteraciones observadas en la capacidad fagocítica se pueden explicar por agotamiento de la degranulación de los neutrófilos ante múltiples estímulos antigénicos circulantes<sup>76, 87</sup>, la falta de producción de metabolitos oxidativos por parte de los polimorfonucleares<sup>92</sup> y por déficit de opsoninas sistémicas. Además, algunos factores que alteran el funcionalismo de los neutrófilos como el enolismo, la malnutrición y la diabetes se asocian con frecuencia a la cirrosis<sup>93,94</sup>.
- 4) Alteración de la inmunidad del líquido ascítico. La presencia de ascitis es una condición imprescindible para la aparición de PBE<sup>77, 95, 96</sup>. La capacidad antimicrobiana del líquido, pese a ser de 5 a 10 veces inferior a la del suero, puede conseguir eliminar gérmenes, evitando la progresión de la infección. Pese a la importancia del paso de gérmenes intestinales a la circulación

general y de los factores que condicionan la bacteriemia prolongada, si la integridad inmunitaria del líquido está conservada probablemente no aparece la infección<sup>97,98</sup>. Por tanto, las características inmunitarias del líquido ascítico han demostrado ser un factor determinante en la aparición de PBE.

En los pacientes cirróticos, la capacidad opsónica y bactericida está disminuida en comparación con la ascitis de origen no cirrótico y con el exudado peritoneal normal<sup>90</sup>. Evidentemente, no todos los cirróticos tienen la misma actividad antimicrobiana, sino que depende directamente de la concentración de proteínas<sup>90</sup>, de los niveles de C<sub>3</sub><sup>99, 100</sup> y la fibronectina en el líquido ascítico. El parámetro más sencillo y útil para determinar el riesgo de infección de la ascitis es la concentración de proteínas, que se correlaciona bien con los niveles de C<sub>3</sub>, fibronectina y con la actividad opsónica. La capacidad antimicrobiana es mínima cuando los niveles de proteínas son inferiores a 10 g/L. Varios estudios han enfatizado la importancia de la concentración de proteínas en la ascitis como factor predisponente de la aparición del primer episodio de PBE<sup>101,102</sup> y de la recidiva de la infección<sup>103</sup>. El complemento y la fibronectina actúan al igual que en el suero, como opsoninas de forma que el déficit de ambos condicionará una dificultad en la fagocitosis de las bacterias por los neutrófilos y los macrófagos. Se ha evidenciado que las citoquinas como Il-6 y el TNF están característicamente elevadas durante la PBE y se cree que pueden favorecer el desarrollo de insuficiencia renal asociada a la PBE<sup>104-106</sup>.

Las concentraciones bajas de proteínas, C<sub>3</sub> y fibronectina observadas en pacientes cirróticos es de causa multifactorial; un déficit en la síntesis hepática<sup>76</sup>, un efecto de la dilución y un efecto de consumo del complemento por el paso constante de gérmenes o sus productos de degradación al líquido ascítico<sup>99</sup>. En este sentido, se ha observado que la eliminación de la flora aeróbica mediante descontaminación intestinal selectiva, al disminuir el paso de enterobacterias a la circulación sistémica y al líquido ascítico, disminuye el consumo de factores del complemento y aumenta los niveles de C<sub>3</sub> en ambos líquidos<sup>107</sup>.



## **- Translocación bacteriana**

El tracto digestivo de los humanos y los animales está colonizado por bacterias, tanto endógenas como exógenas, que pueden atravesar la barrera mucosa intestinal y alcanzar lugares extraintestinales como ganglios linfáticos, hígado, bazo, riñones, cavidad peritoneal y sangre.

La translocación bacteriana (TB) se define como el paso de bacterias viables desde la luz intestinal hasta los ganglios linfáticos mesentéricos (GLM) u otras vísceras del organismo<sup>108</sup>. El término fue inicialmente empleado por Keller y Engley en 1958 para describir el paso de bacteriófagos administrados por vía oral desde la luz intestinal hacia la sangre o los GLM<sup>109</sup>. La existencia de este fenómeno se ha demostrado de múltiples maneras que, directa o indirectamente, confirman la evidencia de este paso. Estas son:

A- Cultivo de gérmenes viables en los GLM o en la vena porta. Numerosos estudios han demostrado repetidamente que el cultivo de los GLM es la técnica más adecuada para identificar la TB. Los GLM en humanos y en animales de experimentación son estériles en situaciones normales<sup>109,110-112</sup>. El cultivo de sangre portal, sangre periférica o bazo son alternativas menos sensibles para evidenciar la TB.

B- Visualización por microscopía del paso de gérmenes a través del epitelio intestinal o de las placas de Peyer. La microscopía óptica con tinciones de hematoxilina-eosina y Gram permite visualizar los microorganismos en las vellosidades o en el interior de las criptas, pero la correcta visualización de los gérmenes a nivel intracelular sólo se consigue con técnicas de microscopía electrónica de scanning<sup>113,114</sup>.

Asimismo, las técnicas de inmunofluorescencia con antisueros son útiles para localizar gérmenes específicos en la mucosa y en la submucosa intestinal<sup>114</sup>. La TB se produce sobretodo a nivel de los enterocitos del íleon terminal y ciego<sup>75,116</sup> tanto a través de un epitelio intestinal intacto como lesionado<sup>115</sup>.

C- Cultivo del mismo germen en sangre y en heces. La constatación de una cepa del mismo germen en sangre y en heces confirma de manera ineludible la existencia de translocación bacteriana. Ello se puede demostrar mediante técnicas fenotípicas (antibiotipaje y biotipaje para enterobacterias, y serotipaje para pseudomona aeruginosa<sup>116</sup>) así como por técnicas de hibridación de material genético.

### - **Mecanismo de translocación bacteriana**

La hipótesis más ampliamente aceptada sobre el mecanismo de TB postula la existencia de dos procesos diferenciados: uno lento, por endocitosis de las bacterias, y otro rápido a través de soluciones de continuidad de la mucosa intestinal<sup>75</sup>.

- En el proceso lento las bacterias se adhieren a la mucosa intestinal mediante, probablemente, el contacto entre el glicocálix de la bacteria y el de las microvellosidades del enterocito. Esta unión está inhibida por la inmuglobulina tipo A (IgA) cuyo mecanismo de acción es el bloqueo de la adherencia bacteriana a los receptores del enterocito<sup>117,118</sup>. Cuando las bacterias alcanzan la lámina propia, en condiciones normales, son destruidas por los macrófagos o por los linfocitos del sistema GALT (gut associated lymphoid tissue –tejido linfoide del tubo digestivo)<sup>117,119</sup> o bien transportados a los GLM locorregionales, siendo en este lugar donde se produce la presentación antigénica<sup>75</sup>. En los casos en que se produce una alteración inmunitaria, un exceso de gérmenes, u otras causas, los macrófagos se limitan al transporte de las bacterias hacia los ganglios mesentéricos sin proceder a su destrucción.
- En el proceso rápido la TB sucede cuando hay una lesión evidente de la mucosa con paso masivo de gérmenes a la lámina propia<sup>120,121</sup>. Únicamente en esta situación se ha descrito la translocación de gérmenes anaerobios intestinales, lo que es infrecuente en otras circunstancias<sup>75,120</sup>.

Es posible que ambos procesos de TB puedan coincidir en un mismo individuo. La ruta del germen translocado puede ser linfática o sanguínea a través del

sistema portal dependiendo de múltiples factores, pero parece que la vía lenta de translocación es principalmente linfática, mientras que en la translocación rápida es predominantemente portal<sup>109,119,122</sup>.

### • **Causas de Translocación bacteriana**

La TB se produce cuando se produce una alteración importante, ya sea de la barrera mecánica o inmunitaria, de la mucosa intestinal. Los mecanismos principales de defensa son la integridad de la barrera intestinal e inmunitaria, así como, la presencia de la microflora que impide el sobrecrecimiento bacteriano. En varios estudios<sup>75,77, 109,120,121,123-125</sup> se han demostrado varias causas de translocación de las bacterias de la luz intestinal como el shock hemorrágico, sobrecrecimiento bacteriano, malnutrición, depresión de la inmunidad local, etc.

Existen descritas varias causas de sobrecrecimiento bacteriano intestinal en pacientes con una cirrosis; la alteración de la motilidad gastrointestinal (tránsito enlentecido debido a la cirrosis sea la causa que sea, al consumo de alcohol, la aclorhidria gástrica), alteración de la barrera epitelial (mayor adhesión bacteriana, lesión de la mucosa gástrica, disminución del flujo sanguíneo intestinal) o la alteración de la inmunidad local y sistémica.

Respecto a la inmunidad local, varios estudios experimentales demuestran que las células plasmáticas secretoras de IgA interfieren en el control del primer paso de los microorganismos a través de la mucosa intestinal. La IgA inhibe específicamente la adherencia de las bacterias intestinales a la mucosa por lo que se evita la colonización de la superficie<sup>118</sup>. La secreción de IgA reduce la penetración en la lámina propia de patógenos no endógenos como el *Vibrio cholerae*<sup>126</sup> y *salmonella enteritidis*<sup>127</sup> e impide la unión de la flora endógena a los enterocitos, evitando así su translocación. De hecho, se ha evidenciado en varios estudios experimentales la correlación inversa que existe entre el número de células plasmáticas y la incidencia de translocación bacteriana<sup>75,117</sup>.

Los macrófagos se localizan a nivel de los GLM para evitar la translocación bacteriana desde el tubo digestivo hasta los vasos linfáticos. Asimismo, las

células T también juegan un papel importante en la defensa inmunológica frente a la translocación bacteriana tal y como demostró Owens et al<sup>128</sup> en un estudio experimental con ratones sometidos a timentomía donde se evidenció mayor TB de la flora endógena del tracto digestivo hacia los GLM, el bazo, el hígado y los riñones frente a controles sanos (28 frente al 3 %). Asimismo, se ha probado la inactivación específica de distintas poblaciones de linfocitos T, mediante la administración intraperitoneal de anticuerpos monoclonales anti-CD4 y anti-CD8 en ratones, demostrándose su depleción mediante citometría en el epitelio intestinal, lámina propia, ganglios linfáticos mesentéricos y bazo, comprobando el aumento de la translocación de *E.Coli* a los GLM<sup>129</sup>.

En resumen, los linfocitos T son mediadores en la inmunidad frente a la TB, y los macrófagos y/o polimorfonucleares son las células efectoras que destruyen a dichas bacterias.

El papel de las inmunoglobulinas en el suero es el de actuar como opsoninas aumentando la eficacia de la fagocitosis y la destrucción subsiguiente de las bacterias por los macrófagos. Tal y como se evidenció, tras la administración endovenosa de IgG anti-*E.coli* en ratones no se reduce el número de *E.coli* translocadas hacia los GLM, pero sí se reduce la diseminación desde los GLM hacia el bazo, riñón, hígado y sangre<sup>129, 130</sup>. Por tanto, su función principal es la de reducir la diseminación de aquellas bacterias que ya hayan penetrado la barrera intestinal más que inhibir el paso a través de la misma.

Las bacterias son fagocitadas por los macrófagos del sistema GALT y transportadas a los ganglios linfáticos. Si a este nivel fracasa la lisis intracelular, las bacterias quedan indemnes para la migración sistémica<sup>75</sup>. Así pues, todos los componentes del sistema inmunológico: inmunidad local (IgA secretada), inmunidad mediada por células (macrófagos y linfocitos T) e inmunidad humoral (inmunoglobulinas séricas) están implicados en la defensa frente a la translocación bacteriana.

## · **Endotoxemia**

Las endotoxinas son lipopolisacáridos (LPS) constituyentes de la pared bacteriana de los gérmenes gram negativos que están presentes en la luz intestinal como consecuencia de la lisis bacteriana. El paso de endotoxinas a sangre en condiciones normales no es habitual pero es frecuente tras un traumatismo mecánico o térmico y en casos de sepsis<sup>131</sup>.

La translocación de las endotoxinas (el paso de bacterias de la luz intestinal al torrente sanguíneo) se produce a través del enterocito, apareciendo en la lámina propia o en el interior de los macrófagos, difundiendo desde aquí a la submucosa y entre los espacios intercelulares de la pared muscular hasta la serosa<sup>114,119</sup>. El drenaje de las endotoxinas se puede vehicular tanto por la circulación portal como por la linfática<sup>131</sup>, aunque es improbable la presencia de endotoxinas en sangre portal en los humanos salvo si presentan patología hepática o gastrointestinal<sup>131,132</sup>. En este caso, las células de Kupffer son las responsables de eliminarlos y evitar el paso a la circulación sistémica, aunque esta función se encuentra alterada en los pacientes con sepsis por gérmenes gram negativos o con cirrosis<sup>79, 132</sup>.

El mecanismo por el cual la endotoxemia promueve la TB no está bien establecido, pero se cree que están implicados numerosos procesos patogénicos:

- 1) Alteración de la flora intestinal favoreciendo el sobrecrecimiento de gérmenes gram negativos cecales (debido a hipoperfusión o por alteración de la motilidad).
- 2) Alteración de la inmunidad del huésped (activación de los linfocitos T) y depresión del sistema retículo endotelial hepático.
- 3) Aumento de la permeabilidad intestinal, probablemente secundaria a mediadores que liberen los macrófagos, Il-1, Pg 2 o por activación del complemento<sup>133</sup>.

En 1997, se objetivó que la endotoxemia está directamente relacionada con la alteración de la adherencia bacteriana. Se ha observado que la administración de endotoxinas por vía sistémica provoca un aumento de la adherencia de enterobacterias a la mucosa intestinal, que se traduce en un aumento de TB de estas bacterias asociándose, por tanto, la acción de la endotoxina a una pérdida de funcionalidad de la barrera mucosa<sup>134</sup>.

En los pacientes cirróticos se han observado anomalías en la mucosa intestinal caracterizadas por congestión vascular y edema<sup>119, 135</sup> que son atribuidas a la hipertensión portal. Se ha utilizado un modelo experimental de hipertensión portal prehepática<sup>136</sup> evidenciándose que la translocación a los GLM está significativamente aumentada al poco tiempo de inducir la hipertensión portal pero no a largo plazo. El mecanismo por el que la hipertensión portal aguda aumenta la TB se debe a un daño en la mucosa intestinal por la congestión venosa aguda, el edema y la isquemia, que histológicamente se traducen en edema de la submucosa del ciego y linfangiectasias ileales, que se derivan de la estenosis aguda de la vena porta. Las diferencias con los modelos de hipertensión portal crónica que podrían explicar esta diferente tasa de TB serían la presencia de shunts porto-sistémicos y el grado de hipertensión portal. Se ha visto que en los estadios iniciales de la estenosis de la vena porta la presión es mayor que en estadios posteriores, ya que los shunts descomprimen parcialmente el sistema portal<sup>137</sup>. En los modelos de hipertensión portal crónica, los cambios en la mucosa intestinal no son tan evidentes y en los pacientes cirróticos son aún menos frecuentes<sup>138</sup> lo que sugiere que existen otros mecanismos, además de la alteración de la mucosa intestinal, probablemente más importantes para promover la TB en los pacientes cirróticos. Estos mecanismos podrían ser el deterioro del sistema inmune de defensa y la evidencia del sobrecrecimiento bacteriano<sup>135, 139</sup>.

## **1.4 Hipótesis Patogénica Global**

La cirrosis hepática es la causa principal de la EH, si bien no todos los cirróticos la presentan. Por lo que, la cirrosis *per sé* es el factor predisponente pero no es el desencadenante.

Tal y como se ha mencionado previamente, la fisiopatogenia de la EH es multifactorial, siendo el amonio la causa principal y la más conocida. De hecho, las causas de hiperamoniemia son muchas pero básicamente se pueden subclasificar en dos tipos por déficit de excreción del mismo (básicamente insuficiencia hepática y la derivación porto-sistémica que impide el paso hepático) o por exceso de aporte, es decir, una mayor absorción del amonio de la dieta, una mayor concentración de amonio intestinal debido al trastorno de la motilidad intestinal con sobrecrecimiento bacteriano que genera una mayor endotoxemia e infecciones que conlleva un aumento de las citoquinas proinflamatorias.

La hiperamoniemia a nivel cerebral genera cambios morfológicos en los astrocitos, lo que conlleva su disfunción y, además, podría asociarse con la muerte neuronal. Además de las alteraciones a nivel de la barrera hematoencefálica, el exceso de amonio también produce alteraciones a nivel molecular ya sea en los receptores o en las moléculas transportadoras que conlleva una disfunción de los sistemas de neurotransmisión neuronal, con el consecuente desarrollo de trastornos neurológicos clínicamente detectables que producen un deterioro de la calidad de vida del paciente.

En los últimos años, se ha señalado que podría existir cierta predisposición genética así como se ha evidenciado una alteración del enzima de la PAG en los pacientes cirróticos que favorece la hiperamoniemia.

Como se puede ver en la figura 3 todas las teorías propuestas anteriormente interaccionan entre sí, a pesar de ello, el peso de cada una de ellas es difícil de establecer.

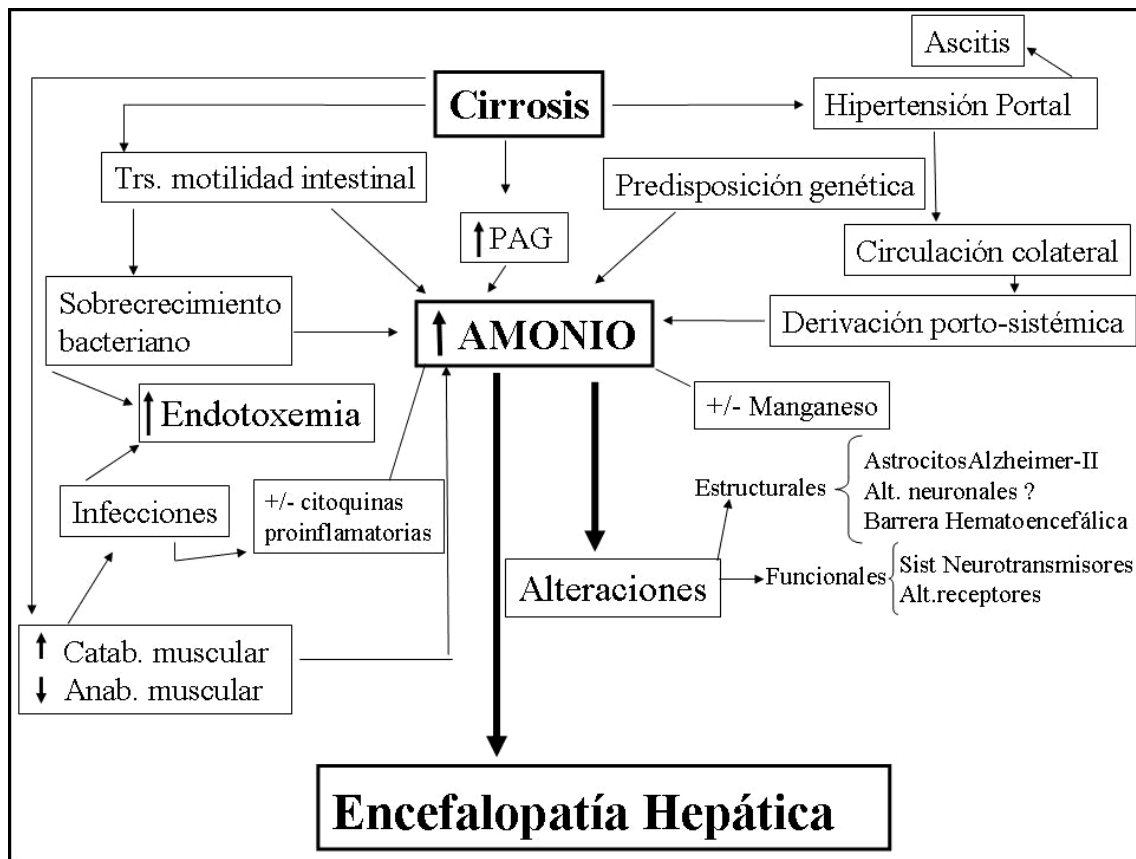


Figura 3: Esquema-resumen de los principales mecanismos fisiopatológicos de la EH.

## 1.5 Diagnóstico de la EH

El diagnóstico de la EH es de exclusión. Es decir, se han de descartar previamente todas las posibles causas de alteración de la conducta o del nivel de conciencia. Entre las posibles causas de alteración de las funciones superiores hay que descartar todos los posibles trastornos metabólicos, procesos infecciosos, lesiones ocupantes de espacio o lesiones vasculares intracraneales<sup>9</sup>.

El factor precipitante más frecuente es un incremento brusco de los niveles de amonio. La determinación de dicho incremento puede ser útil en los pacientes



con fallo hepático agudo, dado que se ha observado una correlación entre los niveles de amonio y la gravedad de la EH, así como el riesgo de edema y de herniación cerebral<sup>140</sup>. Se pueden determinar los niveles de amonio plasmático tanto a nivel arterial como venoso siendo la amoniemia venosa ligeramente más baja por la metabolización del mismo en el músculo<sup>141</sup>. Sin embargo, en los pacientes cirróticos se ha evidenciado que no hay una correlación entre el grado de EH y la amoniemia plasmática, pero sí con la concentración de amonio cerebral. Al parecer, la barrera hematoencefálica impide el paso de los iones, por lo que, el grado de EH depende de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica y de la cantidad de amonio que alcanza el cerebro. Se ha observado que los pacientes con insuficiencia hepatocelular más avanzada presentan mayor permeabilidad de la barrera hematoencefálica<sup>141</sup>. Además del incremento de la amoniemia, existen otros factores desencadenantes que pueden provocar EH (Tabla 3).

**A. Incremento de la amoniemia:**

- Exceso de ingesta proteica
- Azoemia
- Hemorragia gastrointestinal
- Estreñimiento
- Infecciones
- Transfusiones de sangre

**B. Diselectrolitemia y trastornos metabólicos:**

- Hipopotasemia
- Hiponatremia
- Alcalosis

**C. Disminución del aclaramiento de toxinas:**

- Deshidratación
- Restricción de líquidos
- Diuresis excesiva
- Paracentesis
- Diarrea
- Hipotensión (2<sup>aria</sup> a hemorragia, vasodilatación sistémica,...)
- Derivación portosistémica (espontánea o yatrogénica)

**D. Deterioro de la función hepática:**

- Progresivo deterioro de la enfermedad hepática:
  - abuso continuado de alcohol
  - progresión de la lesión hepática de origen vírico
- Desarrollo de un carcinoma hepatocelular
- Fallo hepático agudo

**E. Fármacos:**

- Diuréticos
- Alteran los sistemas neurotransmisores: benzodiazepinas, drogas psicoactivas

Tabla 3: Factores precipitantes de EH.

Aunque el diagnóstico de EH suele ser clínico y habitualmente no se utiliza en la práctica clínica, se ha evidenciado que la EH puede mostrar alteraciones en el registro electroencefalográfico (EEG) que aunque no son específicas pueden ser de ayuda para el diagnóstico. Los cambios EEG observados presentan una cierta correlación con la gravedad de la EH, y consisten en una lentificación difusa del trazado, que del ritmo alfa normal a 8-13 ciclos/segundo pasa a ritmos theta (5-7 ciclos/segundo) y en fases más avanzadas a ondas de mayor amplitud y frecuencia llamadas ondas delta. Las ondas "trifásicas" suelen aparecer en esta última fase y, aunque no son patognomónicas, sí son altamente sugerentes de EH por lo que son útiles para evaluar la respuesta al tratamiento y para excluir otras patologías<sup>58</sup>.

Entre un 30-60 % de los pacientes cirróticos presentan EH mínima sin signos clínicos<sup>9</sup>. La importancia del diagnóstico precoz de EH se ha puesto de manifiesto en los últimos años ya que aún en estadios iniciales de la EH se produce un claro deterioro de la calidad de vida del paciente cirrótico pese a que aún no se han presentado episodios clínicos<sup>142,143</sup>. Así mismo, se ha evidenciado<sup>144</sup> que en este tipo de pacientes un resultado alterado en la prueba de sobrecarga oral de glutamina se ha asociado con una menor supervivencia.

Actualmente, el método diagnóstico más utilizado por su accesibilidad, reproducibilidad, sensibilidad y especificidad son las pruebas psicométricas<sup>143</sup>. A pesar de que existen muchos tests y por ello muchas combinaciones de estos mismos para poder explorar los principales defectos neuropsicológicos, desde una alteración en la habilidad motora fina hasta un déficit de atención, que se observan en cirróticos con EH mínima, el conjunto de test más utilizados habitualmente en la práctica clínica son los descritos por Weissenborn y colaboradores que son conocidos globalmente como "Psychometric Hepatic Encephalopathy Score"(PHES)<sup>145</sup>.

El PHES está compuesto por un total de cinco tests que incluyen dos pruebas de conexión numérica (tipo A y tipo B), un test de símbolos y números, test del marcado seriado y uno de la línea quebrada.

- El test de conexión numérico tipo A. En una hoja se exponen 25 números desordenadamente y el paciente los ha de unir por orden ascendente (del uno al 25) en el menor tiempo posible y sin cometer errores. En caso de error, el paciente tiene que corregirlo antes de continuar. Se valora el tiempo utilizado en realizar el ejercicio.
- El test de conexión numérico tipo B. En este ejercicio se combinan los números (del uno al trece) con 12 letras (de la A a la L). Hay que conectar los números alternándolos con las letras en el menor tiempo posible y corrigiendo los posibles errores. Se valora el tiempo utilizado en realizar el ejercicio.
- El test de símbolos y números. Cada cuadrado muestra un número en la parte superior y un símbolo en la parte inferior. Cada símbolo conecta con un número. La prueba consiste en rellenar con símbolos los cuadrados vacíos completando tantos cuadrados como se pueda en 90 segundos, sin saltarse ningún cuadro ni cometer errores.
- Test del marcado seriado. En una hoja hay 10 filas de círculos. La prueba consiste en puntear el centro de cada círculo y completar la hoja en el menor tiempo posible. Se valora el tiempo requerido en realizar el ejercicio.
- Test de la línea quebrada. El paciente tiene que dibujar una línea continua entre las 2 líneas dadas. Al hacerlo, no deberá tocar ni cruzar las líneas pintadas. Se valora el número de errores y el tiempo que ha precisado para completar la prueba.

El rendimiento en los tests se ve influido por la edad y el nivel de estudios, por lo que es necesario comparar los resultados obtenidos con los datos de un grupo control sano, ajustado por la edad y el nivel de estudios. Actualmente, están disponibles en la Red Temática de Investigación de Encefalopatía Hepática las tablas de normalidad de la población española<sup>143</sup>.

Aunque el PHES es una buena herramienta, se requiere unos 15 minutos de tiempo para que el paciente lo realice por lo que es poco manejable en la consulta clínica habitual.

A pesar de que la EH mínima conlleva síntomas muy sutiles causa un importante deterioro en la habilidad funcional impidiendo la realización de tareas como conducir, así como una menor habilidad laboral que es causa de incapacidad o de jubilación anticipada y de un detrimento en la calidad de vida<sup>9,146</sup>

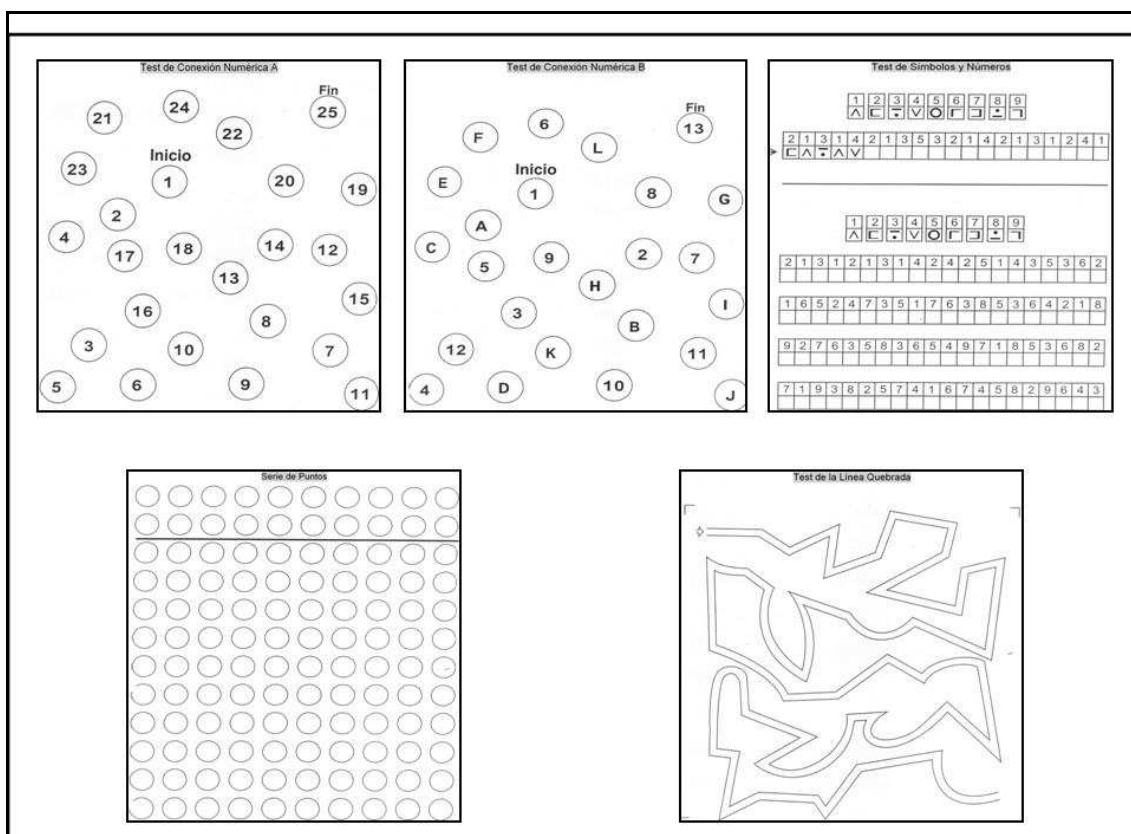


Figura 4: Conjunto de tests para detectar la EH mínima.

## 1.6 Tratamiento de la EH

El tratamiento debería ser integrado, intentando no sólo realizar un tratamiento sintomático y de soporte, sino corregir la causa desencadenante de la EH. Como se ha mencionado anteriormente, la EH se presenta en pacientes con insuficiencia hepática por lo que el tratamiento etiológico ideal sería el trasplante hepático. A partir de esta premisa, relacionaremos las posibilidades

terapéuticas utilizadas para solventar los distintos factores desencadenantes de EH.

A. Incremento de la amoniemia De todas las causas de hiperamoniemia previamente mencionadas, las más frecuentes son: aumento de urea que se produce como consecuencia de una hemorragia gastrointestinal y la escasa eliminación de amonio en caso de estreñimiento. En este segundo caso, es importante evitar la síntesis y la absorción de sustancias neurotóxicas por lo que está indicada la administración de laxantes. Son preferibles los laxantes que contienen disacáridos no absorbibles ya que no son metabolizados por las disacaridasas intestinales y llegan al colon donde la flora bacteriana los convierte en ácido acético y en ácido láctico. Además del efecto catártico la acidificación del medio produce un ambiente hostil para las bacterias productoras de ureasa (implicadas en la producción de amonio intestinal) y suprime la adherencia bacteriana<sup>147</sup> a la pared intestinal, por lo que se reduce la incidencia de translocación bacteriana. Asimismo, la acidificación también inhibe la absorción de amonio al tiempo que facilita el paso de esta sustancia desde la sangre hacia la luz intestinal<sup>9</sup>. A pesar de ello un metaanálisis reciente ha concluido que los disacáridos no absorbibles no han demostrado su efectividad de acuerdo con los criterios de la medicina basada en la evidencia<sup>148,149</sup>.

Otra posibilidad terapéutica para evitar la absorción de amonio a nivel intestinal consiste en eliminar las bacterias del colon productoras de ureasa mediante la administración de antibióticos que, habitualmente, son de escasa absorción intestinal. En clínica los antibióticos más utilizados son rifaximina, neomicina y metronidazol. El primero de ellos es actualmente el más utilizado porque produce menos efectos secundarios y de menor gravedad.

La **RIFAXIMINA** es un antibiótico semisintético derivado de la rifamicina de escasa absorción intestinal cuya acción es bacteriostática (al unirse a la RNA-polimerasa bacteriana impide la síntesis del DNA). En los últimos años, este fármaco ha ido adquiriendo mayor relevancia para el tratamiento

de la EH como lo demuestra el mayor número de publicaciones aparecidas entorno a él<sup>150,151</sup>.

Tanto el ácido aspártico que es un aminoácido esencial (no sintetizado por el organismo) como la ornitina que es un aminoácido dibásico no proteico (tiene estructura de aminoácido aunque no está presente en las proteínas), participan como intermediarios en el ciclo de la urea y están implicados en el metabolismo del amonio a nivel hepático y muscular. Ambos sustratos son básicos en la conversión metabólica del amonio en urea y glutamina, pues potencian ambas vías de detoxificación<sup>152</sup>. Hay algún estudio en pacientes cirróticos con EH leve, en el que se ha administrado ornitina-aspartato, tanto por vía oral como parenteral, evidenciándose un descenso significativo de los niveles de amonio acompañado de una mejoría del estado mental y de las funciones cognitivas<sup>153,154</sup>. Aunque estudios adicionales deberán aclarar su utilidad en pacientes con EH moderada-grave<sup>152</sup>.

Otras sustancias que se han utilizado en el tratamiento de la EH como el benzoato sódico<sup>155,156</sup> o el fenilacetato, se conjugan respectivamente con la glicina para formar hipurato y con la glutamina para formar fenilglutamina, excretándose posteriormente por la orina, lo que constituye una opción terapéutica de probada utilidad en el tratamiento de la EH. Sin embargo, la eficacia clínica de estos fármacos puede verse limitada en pacientes con insuficiencia hepática avanzada por su incapacidad para llevar a cabo procesos de conjugación<sup>152</sup>. Asimismo el sulfato de zinc<sup>9,157-160</sup> potencia el metabolismo del amonio pues es cofactor de dos de los cinco enzimas que intervienen en el ciclo de la urea. La relevancia patogénica de la deficiencia de zinc en la EH no está claramente establecida. Su carencia es común en pacientes cirróticos como resultado de déficits en la nutrición y fundamentalmente como consecuencia de una excreción urinaria aumentada. Así, se ha sugerido que la administración oral de 600 mg/día de zinc podría ser útil de para reducir los niveles de amonio en sangre y tratar la EH<sup>152</sup>.

Las infecciones pueden inducir una EH de gravedad variable que puede oscilar desde un estado muy incipiente hasta un grado IV (coma). Si se trata el proceso infeccioso el paciente mejora progresivamente su estado de conciencia. En la práctica clínica habitual a los pacientes con una EH grado 3 o 4 se les insta un tratamiento antibiótico empírico aún en ausencia de foco infeccioso evidente.

Otras causas de hiperamonemia como la dieta hiperproteica y la azoemia son poco frecuentes pues los pacientes con cirrosis no suelen realizar ingestas proteicas importantes. No parece muy aconsejable limitar la cantidad de proteínas en este tipo de pacientes que ya sufren un cierto grado de desnutrición.

B. Diselectrolitemia y trastornos metabólicos. La corrección de los parámetros hidroelectrolíticos ya sea mediante aporte de potasio o limitando la ingesta hídrica (medida de corrección de la hiponatremia por dilución) mejoran la evolución clínica de la EH.

C. Disminución del aclaramiento de toxinas. La disminución del volumen corporal por deshidratación cualquiera que sea su causa (sd. diarreico, falta de ingesta de líquidos, hipovolemia por hemorragia...) genera una disminución del aclaramiento de toxinas pues hay un menor filtrado glomerular y por tanto una menor excreción renal de sustancias tóxicas. Por tanto, siempre se ha de intentar mantener una volemia adecuada y no forzar excesivamente la diuresis.

Asimismo otra causa de EH en pacientes con cirrosis sin una enfermedad hepática muy evolucionada es la presencia de grandes colaterales (gastrorenales, esplenorenales) que generan un importante by-pass de la circulación portal hacia la circulación sistémica obviando el paso por el hígado. Se puede intentar un tratamiento etiológico ocluyendo este tipo de colaterales por vía angiográfica<sup>161</sup>.

D. Deterioro de la función hepática. Otra causa de EH es la gravedad de la enfermedad hepática. Cuando está muy evolucionada se evidencia un



progresivo deterioro de las funciones hepáticas, por lo que la detoxificación no se realiza adecuadamente y genera EH. El progresivo deterioro de la función hepática puede ser debido a un abuso continuado de la ingesta de alcohol en los pacientes con cirrosis alcohólica o por progresivo daño celular en los pacientes con una cirrosis de origen vírico. En el primer caso, la abstinencia estricta puede mejorar la reserva hepática y, por tanto, el estado clínico del paciente. Asimismo, los pacientes que tienen una hepatitis vírica si se pueden beneficiar del tratamiento antivírico puede conseguirse una disminución de la replicación viral y, por tanto, del grado de inflamación e insuficiencia hepática.

Otra causa de deterioro hepático es la presencia de carcinoma hepatocelular que si no es tratable aumentará progresivamente el grado de insuficiencia hepática ya existente.

E. Fármacos. Las benzodiacepinas y otros ansiolíticos o sedantes pueden agravar un estado de EH, debido a que el metabolismo hepático de estos fármacos se ve dificultado en casos de insuficiencia hepatocelular avanzada, por lo que, el efecto hipnótico tiene mayor intensidad y duración que en una persona sana. Se ha demostrado que los pacientes con EH grado III o IV presentaban mejoría de la función neurológica y electroencefalográfica tras la administración de flumazenilo por vía endovenosa independientemente de la presencia o no de benzodiacepinas en sangre<sup>162</sup>.

## **1.7 Nueva Posibilidad Terapéutica: Factor de crecimiento semejante a insulina tipo I: IGF-I (Insulin-like Growth Factor-I)**

Los IGFs o somatomedinas forman parte de una familia de hormonas polipeptídicas que incluyen los péptidos IGF-I, IGF-II y sus variantes incluyendo la pro-insulina y la insulina.

Estructuralmente el IGF-I es un polipéptido monocatenario de unos 7,6 kDa formada por 70 aminoácidos y con tres puentes disulfuro. Se sintetiza de un solo gen localizado en el brazo largo del cromosoma 12 expresándose en la mayoría de tejidos del organismo aunque principalmente en el hígado. La secuencia primaria consta de cuatro dominios: dos de ellos (A y B) son similares a la insulina, el tercero (C) se parece a la pro-insulina y el último (D), formado a su vez por dos dominios, que no está presente en la insulina. Se ha de destacar la homología de la secuencia aminoacídica del IGF-I en los mamíferos. Si se compara la secuencia de aminoácidos de los roedores respecto a la humana, el dominio A es idéntico y sólo difieren de tres aminoácidos en los dominios restantes.

Por ello, muchas de sus funciones biológicas son similares a la insulina como los efectos endocrinos, paracrinos y autocrinos<sup>163-165</sup>. El IGF-I se sintetiza en muchos tejidos gracias a la estimulación por la hormona de crecimiento, aunque el hígado es la mayor fuente de hormona circulante<sup>165</sup>. En los hepatocitos existen receptores para la hormona de crecimiento que aumentan la transcripción del gen de IGF-I, que tras ser sintetizada, es liberada al plasma<sup>163</sup>. Ésta actúa sobre múltiples órganos diana como músculo, hueso e intestino, entre otros<sup>163</sup>. El receptor situado en la membrana de las células, es muy parecido al receptor de la insulina, por lo que también puede fijar, aunque menos específicamente, IGF-II e insulina<sup>163</sup>. Asimismo, IGF-I también puede interactuar con otros receptores como el de la insulina o el IGF-II, aunque lógicamente con menor afinidad.

Las principales funciones del IGF-I son:

- Acción anabolizante o de crecimiento. En líneas generales reduce la proteólisis y estimula la síntesis proteica, a nivel muscular actúa sinérgicamente con la hormona de crecimiento produciendo un aumento de masa muscular y disminuyendo la metabolización de las proteínas. A nivel testicular, aumenta los niveles de testosterona que asimismo contribuyen a aumentar la masa ósea y muscular<sup>163</sup>.

En modelos experimentales en rata, el IGF-I disminuye la degradación de proteínas y aumenta su síntesis disminuyendo la concentración plasmática

de aminoácidos en un 30-40%<sup>166</sup>. Asimismo, en modelos de cirrosis experimental en rata<sup>167</sup> se ha demostrado una alteración del transporte de galactosa por las vesículas del borde en cepillo y de las uniones de los enterocitos del yeyuno, evidenciándose que este defecto funcional se acompaña de cambios estructurales en la mucosa intestinal, siendo el más importante el alargamiento de las microvellosidades. El IGF-I estimula el ADN y la síntesis proteica en las líneas celulares epiteliales<sup>168</sup> y tiene importantes efectos tróficos en el intestino<sup>169-171</sup>. La administración de dosis bajas de IGF-I (2µg/100 g peso/día) en ratas cirróticas aumenta la absorción de galactosa y revierte los cambios estructurales observados en la mucosa intestinal<sup>172</sup>. Asimismo, se ha demostrado que la administración de dosis bajas de IGF-I a ratas cirróticas mejora la eficiencia de la comida y la incorporación del nitrógeno de la dieta al músculo<sup>173</sup>.

- Efecto hipoglucemiante. Tiene un efecto parecido a la insulina, estimula la captación periférica de glucosa. Este efecto, es debido a la presencia de IGF-I libre, ya que con la administración exógena de IGF-I subcutánea se amortigua el efecto hipoglucemiante pues su absorción es más lenta y también su paso al torrente circulatorio, lo que permite una unión progresiva a sus proteínas transportadoras<sup>174,175</sup>. El IGF-I estimula la captación de glucosa de manera más efectiva que la insulina, principalmente al aumentar la tasa de síntesis de glucógeno muscular más que por estimular la oxidación de la glucosa<sup>176</sup>. En humanos sanos la aparición de hipoglucemia es rápida debido a una inhibición de la producción de glucosa y a la captación de glucosa periférica<sup>174,175,177</sup>. A nivel experimental, en la rata también se produce una captación de la glucosa periférica pero tiene poco efecto sobre la producción de glucosa<sup>174</sup>.

La fisiopatogenia de la resistencia a la insulina en la cirrosis probablemente sea multifactorial incluyendo concentraciones plasmáticas bajas de IGF-1 y aumento de la concentración de ácidos grasos libres, hormona de crecimiento, catecolaminas y glucagón, posiblemente por la alteración de la captación por parte de la membrana lipídica<sup>178</sup>. De hecho, se ha observado

que las concentraciones plasmáticas de glucagón fueron un 70 % más altas en las ratas cirróticas que en los controles<sup>176</sup>.

- Efecto sobre los lípidos. El IGF-I, tanto en ratas como en humanos sanos tiene pocos efectos sobre los ácidos grasos libres. La insulina, por el contrario, tiene un gran efecto antilipolítico<sup>166,175,177,179</sup>, probablemente debido a la alta concentración de receptores para la insulina en el tejido adiposo<sup>180</sup>.
- Mineralización ósea. Los pacientes con cirrosis presentan una mayor prevalencia de osteopenia, por lo que tienen mayor riesgo de padecer fracturas óseas<sup>178</sup>. Se ha descrito en una población de 104 pacientes en lista de espera de trasplante hepático una prevalencia de osteopenia del 35 % y de osteoporosis del 11%<sup>181</sup>. Esta frecuencia es mayor en los pacientes con mayor grado de insuficiencia hepática y especialmente en mujeres. La fisiopatología de la osteoporosis no está bien establecida, aunque se cree que la malnutrición, la malabsorción intestinal, el déficit de vitamina D, los bajos niveles de hormonas sexuales y la toxicidad por alcohol<sup>182,183</sup> son factores que pueden jugar un papel en el establecimiento de la osteoporosis. Se ha observado que un tratamiento con IGF-I a dosis bajas y en un período corto de tiempo aumenta la densidad ósea al inhibir la degradación proteica del hueso e inducir la formación ósea gracias a los cambios tróficos que se producen al aumentar la síntesis de colágeno facilitando el transporte y la incorporación de L-prolina<sup>184,185</sup>. Al parecer, el grado de osteopenia se relaciona con la gravedad de la hepatopatía y los niveles de IGF-I, siendo el hueso trabecular el más claramente afectado<sup>186</sup>.
- Inmunoregulación. El IGF-I y la GH afectan el sistema inmune a distintos niveles. Estas hormonas aumentan la producción de TNF $\alpha$  por los monocitos y macrófagos<sup>187</sup>, al tiempo que regulan la actividad celular de las células tipo natural killer<sup>188</sup>. La interleuquina-6 (IL-6) parece disminuir la síntesis de IGF-I<sup>189</sup>, ya que ha demostrado que en las hepatopatías los niveles de IL-6 están frecuentemente elevados, especialmente en los episodios de PBE<sup>190</sup>, pudiendo contribuir a la deficiencia de IGF-I y a la

malnutrición que se observan con frecuencia en los pacientes con PBE recurrente.

- A nivel experimental. En ratones transgénicos se ha evidenciado un efecto trófico en el intestino delgado y un aumento del crecimiento neuronal<sup>163</sup>. Se ha descrito que el IGF-I aumenta el crecimiento de la mucosa intestinal tras una resección intestinal o en caso de grandes quemados y estimula la proliferación de diferentes líneas celulares derivadas del epitelio intestinal<sup>165</sup>.

En los pacientes con cirrosis los niveles de IGF-I están claramente disminuidos. El déficit se debe a una disminución de receptores de GH a nivel hepático, así como a la disminución de la capacidad de síntesis hepática según el grado de insuficiencia hepatocelular<sup>163</sup>. Datos experimentales en rata de la cepa Sprague-Dawley han demostrado que la fibrosis hepática mejora con el tratamiento con IGF-I, al tiempo que se produce un incremento de la absorción intestinal de los nutrientes, mejora la osteopenia y el hipogonadismo<sup>165</sup>.

Por otra parte, los pacientes con cirrosis presentan una alteración de la permeabilidad de la barrera intestinal lo que conlleva un mayor riesgo de translocación bacteriana y de endotoxemia. Se ha demostrado en un estudio experimental con ratas cirróticas (cepa Sprague-Dawley) que tras la administración de IGF-I se produjo una mejoría en la permeabilidad de la barrera intestinal y un menor grado de translocación bacteriana y de endotoxemia<sup>165</sup>.

- Efectos potenciales de IGF-I en cirrosis. Se ha descrito que los niveles de IGF-I plasmáticos no se correlacionaban con la presencia de malnutrición energética ni tampoco con la gravedad de la misma<sup>191</sup>. Sin embargo, si se ha demostrado que hay una relación con el grado de insuficiencia hepática, pues el IGF-I se correlaciona directamente con los niveles de albúmina sérica y con otras proteínas como la transferrina, la protrombina y la transtiretina (proteína transportadora del retinol) e inversamente con el grado de Child-Pugh, por lo que el IGF-I es un buen predictor de

supervivencia<sup>191</sup>. Se ha evidenciado que en pacientes con cirrosis alcohólica, el IGF-I y el IGF-BP3 eran factores predictivos independientes de supervivencia<sup>192</sup>. Después de un trasplante hepático satisfactorio, se objetiva un ascenso de los niveles de IGF-I lo que parece demostrar que este parámetro podría ser un marcador de disfunción hepática e incluso podría ser útil como marcador pronóstico<sup>193</sup>.

Dado que el IGF-I es un importante regulador del metabolismo intermediario y que los niveles de IGF-I están reducidos en la cirrosis, la administración de IGF-I podría tener beneficios terapéuticos. En ratas con cirrosis avanzada las manifestaciones de malnutrición podrían revertirse con dosis bajas de IGF-I recombinante<sup>172</sup> al mejorar la función hepática aumentando la síntesis de albúmina y de factores de coagulación y reduciendo la fibrogénesis. Asimismo, la atrofia de las vellosidades intestinales presente en la cirrosis podría restaurarse y, respecto a la malnutrición energético-proteica asociada a la cirrosis podría mejorar tal y como ocurre en los modelos de rata cirrótica que tras la administración de dosis bajas de IGF-I mejora el transporte intestinal de aminoácidos y D-galactosa<sup>194,195</sup>.

El hipogonadismo presente en la cirrosis mejora tal y como se ha comprobado en modelos experimentales de rata cirrótica a las que se les administró dosis bajas de IGF-I y presentaron una normalización de las alteraciones histológicas y del tamaño testicular, así como de los niveles de testosterona en sangre<sup>196</sup>.

Respecto a los cambios histológicos presentes en el hígado debidos a la cirrosis como la necrosis celular, la regeneración hepatocelular y la fibrogénesis, la administración de IGF-I en ratas cirróticas inducida por administración oral de tetracloruro de carbono (CCl<sub>4</sub>) produjo un efecto citoprotector por parte del IGF-I al reducir el daño peroxidativo celular por medio de su actividad antioxidante. También, normalizó la actividad de las enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa (SOD), la glutatión peroxidasa (GSHPx) y la catalasa. La potenciación de la actividad de la GSHPx es fisiopatológicamente muy importante pues es el enzima principal responsable de la defensa enzimática frente a la destrucción oxidativa de

las biomembranas en las mitocondrias y en las organelas<sup>197</sup>. De hecho, se ha observado una correlación inversa entre la actividad de dicha enzima (GSHPx) y de los productos de peroxidación lipídica a nivel hepático. Asimismo, la peroxidación lipídica se ha propuesto como una vía común para la fibrogenesis<sup>198</sup> pero la administración de IGF-1 reduce esta vía fibrogénica mejorando la función hepatocelular y disminuyendo los depósitos de colágeno<sup>167</sup>.

En la figura 5 se esquematizan los mecanismos de acción de rifaximina y de IGF-1 en el tratamiento de la EH.

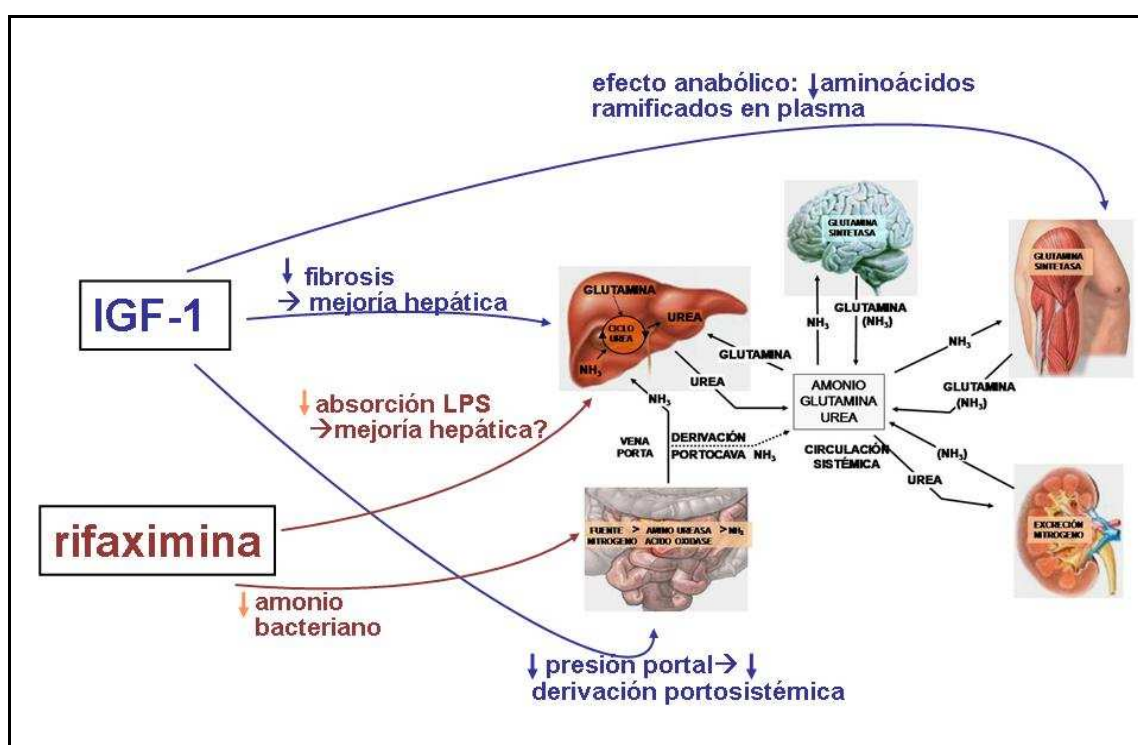


Figura 5: Hipótesis de los posibles mecanismos de acción de la rifaximina (tratamiento establecido) y del IGF-1.

## **2. MODELOS EXPERIMENTALES**

En los últimos años, los modelos experimentales para el estudio de las enfermedades hepáticas y de las complicaciones derivadas de las mismas han aumentado muy considerablemente. A pesar de que los modelos animales constituyen herramientas importantes para estudiar la fisiopatología de las enfermedades, no hay que olvidar que son aproximaciones a la realidad clínica, con limitaciones bien conocidas: diferencias en la clínica de la enfermedad, condiciones experimentales, técnicas utilizadas y la propia biología del animal, entre otras. Por tanto, hay que ser muy prudente al extrapolar los resultados obtenidos con los modelos experimentales a la especie humana.

### **2.1 Modelos experimentales de encefalopatía hepática**

En 1989, ya se definieron las características ideales que debía tener un buen modelo experimental de EH en presencia de cirrosis<sup>199</sup>. En este trabajo se proponían los criterios que definen tanto la cirrosis como la EH.

Los parámetros que definen la cirrosis son: evidencia histológica, pérdida de función o de masa hepática, hipertensión portal, derivación porto-sistémica, ausencia de complicaciones extrahepáticas, metabolismo anormal del nitrógeno, aumento de la ratio de los niveles insulina-glucagón, alteración de la biología hepática.

Asimismo, las características que definen la EH son: distintos grados de intensidad (desde formas subclínicas hasta el coma), reversibilidad, ha de estar presente en enfermedades hepáticas crónicas, ausencia de complicaciones extrahepáticas significativas, se desencadena tras una sobrecarga de nitrógeno gastrointestinal, mejora con tratamiento ya sea mediante lactulosa, antibiótico o dieta hipoproteica, que se asocia con un metabolismo del nitrógeno anormal y presencia de cambios morfológicos de los astrocitos con células tipo-II de Alzheimer.

En la actualidad, se han implementado diversos modelos experimentales en animales para establecer un modelo lo más parecido posible a lo que ocurre en



la especie humana, por tanto que cumpla los requisitos anteriores. Los modelos que se describen a continuación son los que más frecuentemente se han utilizado para estudiar la EH. Se basan principalmente en tres mecanismos: derivación de la circulación del sistema venoso portal, fallo hepático y trastornos metabólicos.

### **2.1.1 Derivación de la circulación del sistema venoso portal**

La derivación de la circulación del sistema venoso portal evita la llegada de sangre procedente del intestino y, por tanto, impide que el hígado realice, entre otras funciones, la de eliminar las sustancias tóxicas. Estas sustancias si no son eliminadas a nivel hepático pasan a la circulación sistémica pudiendo llegar al SNC generando toxicidad cerebral (encefalopatía hepática). Se han descrito varios modelos:

- Anastomosis porto-cava término-lateral. Se trata de derivar la circulación portal hacia la vena cava inferior, alcanzando así la circulación general. De esta manera, se excluye la sangre venosa procedente de estómago e intestino delgado que sería detoxificada en el hígado, por lo que las toxinas procedentes del intestino llegan a la circulación sistémica y al SNC incrementándose la neurotoxicidad. Algunos autores<sup>200, 201</sup> han descrito dicha técnica pero la realizada por Arias y cols. en 1977, ocluyen la vena cava lo que permite una simplificación de la técnica<sup>202</sup>.

- Derivación porto-cava asociado a ligadura de la arteria hepática. Otra manera de obtener encefalopatía aguda en rata, es mediante la realización de una derivación porto-cava asociada a ligadura de la arteria hepática produciéndose un fallo hepático agudo y consecuentemente un edema cerebral y posterior EH<sup>203</sup>.

### 2.1.2 Fallo hepático agudo

Otro mecanismo para generar EH se basa en la instauración de un fallo hepático agudo que se logra por administración de sustancias hepatotóxicas o bien por ligadura del colédoco.

- Administración de sustancias hepatotóxicas. El fallo hepático puede ser agudo<sup>204</sup> y se logra con la administración de **azoximetano** (metabolito activo de la cicasina que se obtiene de las semillas de *Cycas resoluta* y *C. circinalis* de la isla de Guam) a ratones lo que genera un fallo hepático fulminante a las pocas horas de su administración intraperitoneal (100 µg/g de peso). Se han descrito algunos casos de fallo hepático fulminante en humanos tras la ingesta de dicha sustancia<sup>204</sup>.

Otro modelo de EH por fallo hepático fulminante se consigue en ratas Sprague-Dawley mediante la inyección intraperitoneal de **tioacetamida** (350 mg/kg) durante tres días consecutivos objetivándose una alteración en el comportamiento de las ratas tratadas con tioacetamida respecto al placebo. Estos animales presentan una menor puntuación en el neurocomportamiento junto con una disminución de la actividad motora en comparación con un grupo control ( $p < 0.001$ )<sup>205</sup>. El grupo de Viena<sup>60</sup> también describe un modelo parecido, pero en este caso la inducción del fallo hepático agudo es por la administración de 300 mg/Kg de tioacetamida por vía gástrica durante dos días consecutivos.

La D-galactosamina y la dimetilnitrosamina son dos sustancias que también pueden producir hepatitis aguda. A las 48 horas de la administración intraperitoneal de **D-galactosamina** (1,5 g/kg) se evidencian cambios histopatológicos a nivel hepático con remarcable parecido a los producidos en humanos tras sufrir una hepatitis vírica aguda<sup>206</sup>. Estos cambios desaparecen a las cuatro semanas de la administración de d-galactosamina; en ese momento ya no se observan cambios histológicos respecto a las ratas control<sup>206</sup>. Por tanto, se trata de un modelo que genera fallo hepático agudo reversible sin apreciarse secuelas tras superar el episodio. La **dimetilnitrosamina** es un agente hepatotóxico utilizado en muchos estudios experimentales para inducir

fibrosis hepática, así como por su poder carcinogénico. En los años 70 se utilizó en perros, en la actualidad principalmente se utiliza en ratas<sup>207</sup> y en ratones<sup>208</sup>. La inducción de cirrosis se realiza por administración orogástrica, aunque no hay una pauta de administración ni metodología estandarizada, pues es variable de unos autores a otros. Se ha de tener presente que dosis altas de dimetilnitrosamina provocan una elevada mortalidad por insuficiencia hepática aguda pero dosis bajas durante un período de tiempo largo no provocan cirrosis. Las alteraciones histológicas y hemodinámicas se observan a partir de la segunda semana, y unos seis meses después los animales desarrollan cirrosis evidenciándose un aumento marcado de la presión portal con aparición de shunts porto-cava y ascitis franca y el deterioro consiguiente de la función hepática.

• Ligadura del colédoco. La ligadura del colédoco es un modelo quirúrgico que genera una cirrosis biliar secundaria por colostasis crónica. Este modelo se ha utilizado en animales de experimentación de distintas especies desde ratas hasta perros, pasando por conejos.

La ligadura del colédoco se realiza mediante incisión y disección del conducto, se realiza una doble ligadura y se corta entre éstas. La cirrosis aparece en el 80-90 % de los casos, al cabo de unas 4-5 semanas de la intervención y raramente se acompaña de ascitis.

Los cambios histológicos son una reducción del espacio sinusoidal produciendo un aumento de la resistencia portal, dilatación luminal de los conductos biliares, edema y fibrosis<sup>209</sup>. Estos cambios son similares a los observados en los pacientes con cirrosis biliar secundaria.

### **2.1.3 Modelos de origen metabólico**

Finalmente existe un tercer mecanismo de producción de EH conocido como modelo metabólico que es menos utilizado. Consiste en la administración de una dieta hiperamonemiaca.

Habitualmente, este modelo se utiliza en combinación con otro modelo de uno de los dos grupos descritos previamente. Jover et al<sup>70</sup> realizaron una ligadura del conducto biliar común con la administración de una dieta rica en amonio consiguiéndose cambios estructurales de los astrocitos a células de Alzheimer tipo II.

Se han publicado también algunos modelos que combinan una técnica quirúrgica, como la descrita anteriormente con la administración de alguna sustancia hepatotóxica como sería el caso del modelo en el que se realiza una hipertensión portal prehepática junto con la administración de paracetamol<sup>210</sup>.

## **2.2 Limitaciones de los modelos descritos**

Todos estos modelos, describen diferentes maneras de obtener clínica de EH ya sea mediante técnicas derivativas o técnicas que generan insuficiencia hepática aguda o crónica en animales de experimentación, pero en ninguno de estos modelos se consigue sobre un hígado cirrótico, salvo el de ligadura del conducto biliar común que genera una hepatopatía crónica pero que en muchas ocasiones precisa ser suplementado con una dieta hiperamonémica. En ningún caso, presentan ascitis por lo que no son ratas cirróticas descompensadas y, por tanto, no reflejan la clínica de la mayoría de pacientes que suelen tener EH sobre cirrosis evolucionada, por lo que se obvian posibles mecanismos fisiopatológicos que pueden desencadenar un episodio de EH tales como PBE, hemorragia digestiva por hipertensión portal, etc.

## **2.3 Necesidad de un nuevo modelo**

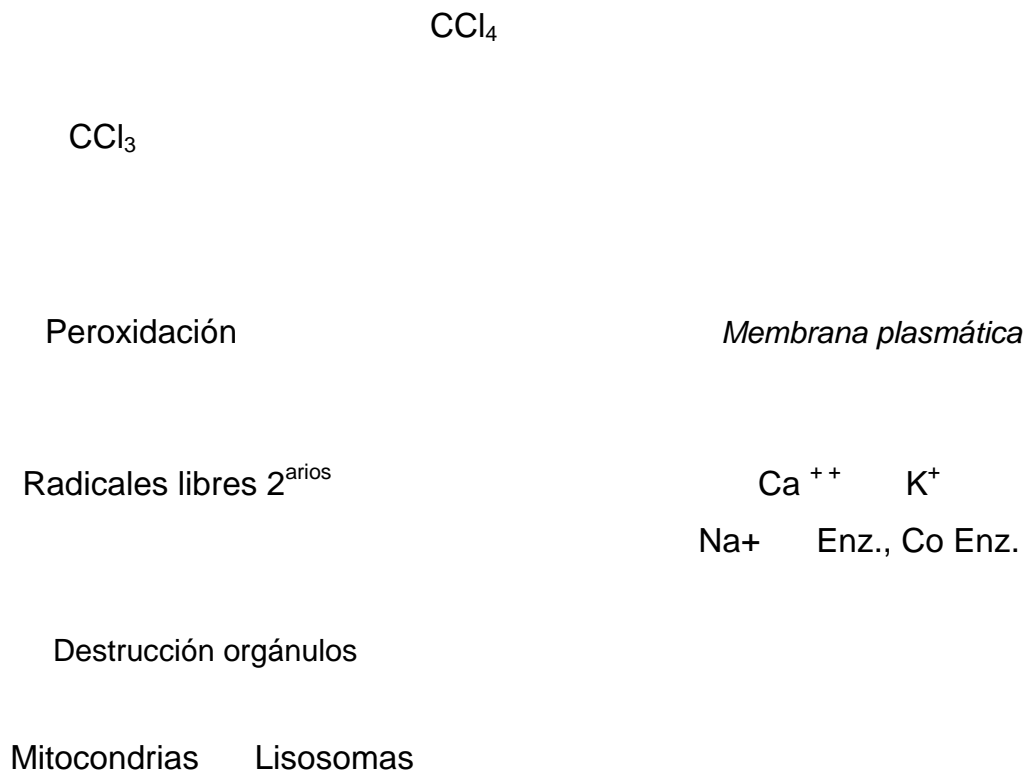
Por todo lo citado anteriormente, se ha planteado la necesidad de desarrollar un modelo de EH en el contexto de cirrosis evolucionada. Para ello, se ha propuesto la combinación de dos modelos que *a priori* se han utilizado separadamente para estudiar en uno de ellos las características de la cirrosis y

en el otro las complicaciones derivadas de la hipertensión portal. Estos modelos son la cirrosis descompensada inducida por tetracloruro de carbono y la hipertensión portal debido a ligadura total de la vena porta. A continuación se exponen las características de cada uno de los modelos (técnica, desarrollo, utilidad y limitaciones de los mismos).

### **2.3.1 Cirrosis hepática inducida por tetracloruro de carbono (CCl<sub>4</sub>)**

En este apartado se hace una revisión extensa del uso de este tóxico hepático en ratas: técnicas de administración, desarrollo cronológico de la enfermedad, efectos sobre otros órganos y el uso de este modelo en la investigación de las alteraciones hemodinámicas, los trastornos hormonales y de la función renal que acompañan la ascitis, así como el estudio de los mecanismos de las infecciones más comunes del cirrótico, como la PBE.

El CCl<sub>4</sub> es una sustancia de elevada hepatotoxicidad. La acción del tóxico sobre el hepatocito se produce a dos niveles: una acción inicial y directa dañando la membrana y una segunda fase debida a la toxicidad inducida por los metabolitos del tetracloruro de carbono generados por el citocromo P<sub>450</sub> (figura 6).



## NECROSIS

Figura 6: mecanismo de acción del CCl<sub>4</sub> sobre el hepatocito.

La primera acción del CCl<sub>4</sub> se produce a los pocos minutos de estar en contacto con el hepatocito y es debida a la destrucción de las membranas de éste y la afectación de las mitocondrias y lisosomas alterándose la funcionalidad<sup>211</sup>. Así pues, las membranas se vuelven altamente permeables provocando la pérdida de potasio y otros enzimas. Se produce una acumulación intracelular del calcio, sodio y agua. El daño provocado sobre la mitocondria interrumpe la fosforilación oxidativa agravando la necrosis celular. Así mismo, la salida de los enzimas lisosomales acelera aún más este proceso necrótico.

La necrosis producida en este momento es aún parcialmente reversible, dependiendo de su extensión. Se trata, por tanto, de una necrosis dosis-dependiente provocada exclusivamente por la acción del  $\text{CCl}_4$ .

La segunda fase del proceso, ya aparente a las pocas horas, es debida a los metabolitos producidos por el citocromo  $\text{P}_{450}$ . Los radicales libres que se generan interactúan con los ácidos grasos insaturados (AGPI) de las membranas.

Se produce una peroxidación lipídica y un entrecruzamiento de estos AGPI. Además, los radicales libres se unen a toda una serie de otras sustancias proteicas, lipídicas y nucleares. El hecho que se haya observado en animales de experimentación que la eficiencia para metabolizar el  $\text{CCl}_4$  este directamente relacionada con la gravedad de la lesión, hace pensar que efectivamente son estos radicales libres generados, los principales responsables de la necrosis del hepatocito.

El proceso de metabolización del  $\text{CCl}_4$  por el sistema enzimático del citocromo  $\text{P}_{450}$  es el siguiente: El primer producto es el radical libre  $\text{CCl}_3$ , sustancia que interactúa con los lípidos, proteínas y ADN provocándose la peroxidación. La reacción del  $\text{CCl}_3$  con lípidos insaturados genera radicales libres secundarios que provocan más destrucción celular y subcelular (mitocondrias y lisosomas).

#### • Métodos

En el año 1936, se utilizó  $\text{CCl}_4$  para inducir cirrosis hepática en un modelo experimental en perros, desde entonces se ha usado ampliamente en ratas y, más raramente, en ratones, cerdos, cobayas, primates y perros<sup>212</sup>. Se han descrito diferentes métodos según la vía de administración del tóxico: inyección subcutánea<sup>213</sup>, intramuscular<sup>214</sup> o intraperitoneal<sup>215</sup>, administración orogástrica<sup>216-220</sup> o por inhalación<sup>221</sup>. La dosis de  $\text{CCl}_4$  y el intervalo de tiempo entre cada administración varía según la vía de administración. Generalmente la cirrosis aparece más rápidamente cuando el tóxico se administra en dosis

más altas y en un intervalo de tiempo más corto. Como contrapartida la mortalidad es más elevada.

La mayoría de estos modelos utilizan, simultáneamente con la administración de  $\text{CCl}_4$ , un inductor enzimático del citocromo  $\text{P}_{450}$  como es el fenobarbital. Este fármaco provoca en la rata un incremento en el tamaño del hígado que puede llegar a ser máximo (un 43% más grande de lo normal) a las 6 semanas de vida, cuando el animal pesa unos 150 g. Aumenta también el retículo endoplasmático liso. Este aumento en el tamaño del hígado provoca también un aumento en la actividad del citocromo  $\text{P}_{450}$ <sup>217</sup>. De esta manera la acción del  $\text{CCl}_4$  es más efectiva, tal y como hemos visto en el mecanismo de acción.

En la administración del  $\text{CCl}_4$  por vía parenteral, en ratas, se utilizan dosis de 0,5-1 mL/Kg. El tóxico se acostumbra a administrar emulsionado con aceites minerales y normalmente se añade fenobarbital al agua de bebida. La vía subcutánea presenta una mortalidad muy baja, alrededor del 5%, aunque la cirrosis no aparece hasta las 20 semanas de tratamiento. La inyección intramuscular e intraperitoneal del tóxico acorta el tiempo de aparición de la cirrosis, aunque incrementa espectacularmente la mortalidad, que puede llegar hasta el 50%.

La administración de  $\text{CCl}_4$  por vía inhalatoria es otro de los métodos empleados extensamente<sup>217,222,223</sup>. Este modelo desarrollado en ratas, consiste de forma resumida en utilizar ratas macho de unos 170 g a las que se administra fenobarbital en el agua de bebida (0,3g/L) se estabulan en grupos de cinco a siete en una cámara donde son gaseadas con una mezcla rica con  $\text{CCl}_4$ . Los animales son expuestos al tóxico dos veces por semana. El tiempo de exposición al  $\text{CCl}_4$  va aumentando en cada sesión, desde 30 segundos en la primera sesión, aumentando un minuto cada 3 sesiones, hasta 5 minutos. Con este protocolo algunos animales desarrollan cirrosis a las 6 semanas, aunque la mayoría lo hacen hacia las 10 semanas, que es cuando aparecen los primeros episodios de ascitis que acostumbran a ser transitorios. Para mantener la ascitis es necesario mantener la inhalación del  $\text{CCl}_4$ . La mortalidad



del método es de menos del 25% en las ratas cirróticas, mortalidad que se incrementa hasta el 30-40% cuando los animales se mantienen con ascitis.

La administración orogástrica de  $\text{CCl}_4$  es posiblemente el método que en los últimos años se ha generalizado más, sobretodo en el estudio de las infecciones asociadas a la cirrosis hepática, particularmente la PBE y la bacteriemia. A pesar de la gran aceptación del modelo, uno de los inconvenientes más importantes que presenta es la gran variabilidad en la respuesta de los animales al tóxico. Se puede dar el caso que mientras unos animales presentan una cirrosis bien establecida, otros presentan lesiones mínimas. Parece pues que es bastante importante adecuar la dosis a cada animal. En este sentido, en el año 1981 se describió un modelo en ratas *Wistar* en el cual se administra fenobarbital en el agua de bebida y  $\text{CCl}_4$  orogástrico simultáneamente, variando la dosis del tóxico de acuerdo con el peso del animal a lo largo del tratamiento<sup>219</sup>. De forma resumida, el método consiste en: A ratas de 150 g se les administra fenobarbital (35 mg/dL) en el agua de bebida. A los 10-14 días, cuando los animales pesen 250 g se comienza el tratamiento con  $\text{CCl}_4$  por vía orogástrica, con sonda de metal, una vez a la semana con una dosis inicial de 40  $\mu\text{L}/250$  g. Las dosis posteriores se ajustan de acuerdo con el aumento/disminución del peso del animal.

El año 1991, se modificó el modelo previamente descrito optimizando las dosis a administrar del tóxico al tener en cuenta la variación del peso del animal, consiguiéndose así una alta tasa de ascitis y, por primera vez, se describió la aparición de PBE en un modelo experimental de cirrosis hepática<sup>220</sup>. Este es el modelo que escogimos para realizar nuestros estudios. Con esta individualización de la dosis se consigue que entre el 62-100% de los animales desarrollen cirrosis con ascitis entre las semanas 7-26. De todas maneras, la mortalidad sigue siendo bastante elevada (50-55%) y se concentra prácticamente durante las primeras 4 - 5 semanas como consecuencia de una toxicidad aguda del  $\text{CCl}_4$ <sup>116, 135, 218, 220, 224, 225</sup>.

## ▪ Resultados histológicos y fisiopatológicos

Las alteraciones histológicas y fisiopatológicas del modelo son las siguientes:

- Cirrosis micronodular irreversible. La enfermedad, derivada de la administración crónica de CCl<sub>4</sub>, evoluciona en tres fases bien diferenciadas. En la primera fase aparece una lesión inicial aguda con zonas de necrosis celular con degeneración acidófila y esteatosis. Una segunda fase de precirrosis que se caracteriza por una marcada fibrosis centrolobulillar y sinusoidal y formación de septos fibrosos hasta que inician la disección de los lóbulos hepáticos, pero sin formar nódulos de regeneración. La tercera fase se caracteriza por la presencia de una cirrosis bien establecida. Aparece una afectación nodular difusa con pequeños nódulos (2-4 mm) con una cápsula engrosada. Microscópicamente se caracteriza por unos septos fibrosos que atraviesan los lóbulos hepáticos y por una regeneración hiperplásica nodular.

Estos nódulos de regeneración presentan una fibrosis irregular y los tractos portales aparecen interconectados por bandas de tejido fibroso. Las áreas portales presentan bandas de tejido conectivo que comprimen los vasos sanguíneos. Hay un aumento de los conductos biliares. Las células de Kupffer, prominentes, aparecen extensamente distribuidas por la zona periportal. Así mismo, se observa un ligero infiltrado inflamatorio alrededor de los septos conectivos.

Macroscópicamente, el hígado tiene una consistencia dura con una superficie granular, aunque en los casos más evolucionados la masa hepática se reduce apareciendo en la superficie un aspecto nodular. Las lesiones que aparecen en las dos primeras fases son reversibles al dejar de administrar el tóxico, mientras que la tercera fase es ya irreversible. En estos casos se puede producir una reabsorción de algunas fibras de colágeno<sup>216</sup>.

Por otra parte, los parámetros analíticos séricos muestran una disminución significativa de los niveles de albúmina y de las proteínas totales, así como un

aumento significativo del recuento de leucocitos y de los niveles de bilirrubina, comparado con los animales control.

- Hipertensión portal. A las 4 o 6 semanas, es decir, en la fase de fibrosis precirrótica, aparecen las primeras manifestaciones de hipertensión portal. A pesar de esto, los trastornos hemodinámicos no son del todo evidentes hasta la tercera fase, cuando el animal tiene la cirrosis bien establecida<sup>226</sup>. En este sentido, los animales padecen importantes cambios en la circulación intrahepática y esplácnica que conllevan el desarrollo de hipertensión portal, esplenomegalia (3-5 veces del peso de las controles) y ascitis, así como en la aparición de importantes alteraciones en la hemodinámica sistémica y la reactividad vascular. Los cambios más importantes observados en la circulación intrahepática son el incremento en la resistencia vascular hepática, que es el que da lugar a la hipertensión portal, y la disminución en la capacidad de intercambio sinusoidal. Esta alteración es consecuencia de la capilarización de los sinusoides hepáticos y de la apertura de derivaciones en la circulación intrahepática<sup>221</sup>.

Los aspectos fisiopatológicos referentes a la aparición de ascitis en estos animales han estado extensamente estudiados. Se ha observado que previamente a la aparición de ascitis hay una retención importante de sodio. Los animales no presentan disminución en el filtrado glomerular, por lo que se considera que la retención de sodio es debida a una reabsorción tubular renal. Existe una relación directa y cronológica entre estos dos hechos y la activación del sistema renina-aldosterona<sup>78</sup>, hipersecreción no osmótica de hormona antidiurética (ADH) y aumento de los niveles plasmáticos del factor natriurético atrial<sup>86</sup>.

Por otro lado, estos animales tratados con CCl<sub>4</sub> desarrollan, al igual que los humanos cirróticos, diferentes grados de derivaciones portocolaterales como consecuencia de la hipertensión portal<sup>226</sup>. El porcentaje de circulación portocolateral se correlaciona directamente con la gravedad de la enfermedad y la duración de la hipertensión portal. Estos animales desarrollan una hipotensión arterial asociada a valores normales o aumentados de gasto

cardíaco acompañado de un aumento del volumen sanguíneo que parece estar relacionada con la hipertensión portal, vasodilatación arteriolar esplácnica y colateralización portosistémica<sup>88</sup> y que se correlaciona directamente con la presencia de niveles elevados de diferentes sustancias vasodilatadoras como el glucagón, la bradicinina, la sustancia P, ácidos biliares, el factor de relajación y la prostaciclina que, juntamente con mecanismos neurogénicos, así como una resistencia en la acción de los vasoconstrictores observada en ratas con cirrosis inducida por CCl<sub>4</sub>, podrían ser la causa de estas alteraciones hemodinámicas<sup>227-229</sup>.

Los cambios histológicos intestinales se concretan en la aparición de edema submucoso cecal extenso, linfangiectasia ileal e infiltrado inflamatorio crónico<sup>218</sup>.

#### ▪ Aplicabilidad y limitaciones del modelo

Este modelo animal de inducción de cirrosis mediante la administración orogástrica de CCl<sub>4</sub> es el modelo con la tasa más alta de obtención de cirrosis y ascitis, así como de infecciones, y concretamente de PBE.

La principal limitación de este modelo es que no se ha evidenciado ninguno de los criterios de encefalopatía hepática (edema cerebral, alteración de los osmolitos cerebrales...), por lo que no se utiliza para estudiar esta patología.

### **2.3.2 Ligadura parcial y total de la vena porta**

Es el más común de los modelos animales de hipertensión portal prehepática, y posiblemente, el más antiguo. Ya en 1913 Neuhof estudió las posibilidades de este método para el estudio de la *pylephlebitis supurativa* en perros<sup>230</sup>. Posteriormente, en 1952 se utilizó este método en ratas para estudiar algunos de los efectos inmediatos derivados del aumento de la presión portal como la aparición de las colaterales y el efecto sobre el bazo<sup>231</sup>. Una variante de la técnica es la denominada oclusión de la vena porta. Aunque una ligadura total provoca la muerte de los animales<sup>230</sup>, ésta es posible si se realiza después de

48 h de una ligadura parcial, puesto que ya ha habido tiempo para que aparezcan colaterales portosistémicas y portoportales.

Este modelo se ha implementado también en primates, cobayas, conejos y ratones. No obstante, la mayoría de estudios experimentales, se han hecho en ratas. Las razones de esta preferencia son varias: son animales pequeños, fáciles de mantener, relativamente baratos, pueden ser manipulados en condiciones no estériles y no necesitan un cuidado postoperatorio especial<sup>215</sup>.

En los primeros estudios, la mortalidad era muy elevada, próxima al 50%<sup>231</sup>. Estudios posteriores llegaron a la conclusión que el diámetro de la estenosis y la edad del animal eran parámetros críticos para la supervivencia. Actualmente la supervivencia está por encima del 90% siempre que la medida de la estenosis no sea por debajo de los 0,9-1 mm de diámetro<sup>232</sup>.

Cualquiera de las cepas más comunes de ratas (Sprague-Dawley, Wistar y Lewis) es adecuada para obtener una hipertensión portal que sea reproducible y comparable a la patología de la hipertensión portal en humanos.

#### • Método

Uno de los métodos<sup>215</sup> utiliza ratas Sprague-Dawley machos de un peso comprendido entre 160-180 g. Bajo anestesia y mediante laparotomía se disecciona la vena porta. Ligeramente por debajo de la bifurcación de la vena porta se coloca un catéter de polietileno de 0,96 mm de diámetro en paralelo a la vena y se liga con hilo de sutura "000". Se retira el catéter quedando de esta manera la vena estenosada. Se sutura el abdomen. A las 48 horas se reabre el abdomen del animal y se procede a la oclusión total de la vena porta.

Otros autores en lugar de ligar un catéter utilizan una placa de plástico elástica de unos 3 mm de largo enrollada alrededor de la vena porta comprimiéndola hasta llegar a un diámetro de 0,9 mm<sup>232</sup>.

▪ Aplicabilidad y limitaciones del modelo

En este modelo el hígado es prácticamente normal; sólo a nivel capilar se observa una cierta dilatación. Hay una ligera, pero significativa reducción de peso y el bazo aumenta de tamaño y de peso<sup>231</sup>.

La presión portal es más elevada que en los controles. En el momento de producirse la estenosis la presión portal asciende hasta los 20 mmHg, valor que baja posteriormente y se estabiliza sobre los 11-17 mmHg a los 2-4 días, (en los controles sanos el valor es de 7-9 mmHg)<sup>215,233</sup>.

A consecuencia del incremento del flujo arterial hepático y del flujo tributario de la porta se produce una circulación hiperdinámica en el territorio esplácnico.

En estos animales se producen *shunts* esplenosistémicos extensos. En cambio los *shunts* mesentéricos parecen estar mucho menos desarrollados. Se observa una estrecha correlación entre el grado de derivación porto-sistémica y la gravedad de la hipertensión portal<sup>234</sup>.

El modelo de hipertensión portal extrahepática no se acompaña del desarrollo de cirrosis hepática ni de ascitis. Por tanto, los estudios están limitados a algunas de las alteraciones hemodinámicas que acompañan a esta patología.

Así pues en este sentido el modelo es útil tanto para estudiar estas alteraciones hemodinámicas y comprender los mecanismos que las desencadenan, como sobre todo, el papel del amonio intestinal en relación con el grado de derivación porto-sistémica.

---

## **OBJETIVOS**

Una de las complicaciones más frecuentes de la cirrosis con insuficiencia hepatocelular avanzada es la encefalopatía hepática (EH). Son muchos los avances que se han conseguido en los últimos años en relación con esta patología, tanto desde el punto de vista clínico (diagnóstico precoz de la EH mínima, manifestaciones extrapiramidales relacionadas con este cuadro), como patogénico (alteraciones moleculares, depósitos de manganeso en los ganglios basales, cambios morfológicos y estructurales de los astrocitos) que explican, al menos parcialmente, la fisiopatología de este cuadro.

Hasta la fecha, la mayoría de estudios en animales de experimentación sobre esta patología se han llevado a cabo en modelos basados en la inducción de fallo hepático agudo por distintas causas o por derivación portosistémica. Aunque se trata de modelos útiles, no se dispone de un modelo experimental de EH que se asemeje a las características fisiopatológicas habituales en los pacientes y que facilite su estudio.

Por ello nos hemos planteado, en la primera parte de la Tesis, los siguientes

**OBJETIVOS:**

1. Establecer un modelo de EH en ratas con cirrosis descompensada.
2. Determinar en este modelo el grado de derivación portosistémica mediante un método no radiactivo
3. Valorar en este modelo la concentración de osmolitos cerebrales, los cambios histopatológicos astrocitarios y los niveles de amonio plasmático y cerebral tras una sobrecarga oral de glutamina.
4. Establecer la posible relación entre el grado de cirrosis, la derivación portosistémica y el nivel de amoniemia.

En el segunda parte de la tesis, una vez ya establecido el modelo experimental, los objetivos han sido:

5. Validar el modelo.
6. Comparar la acción terapéutica del IGF-I frente a rifaximina.



La rifaximina es un tratamiento antibiótico de amplio espectro no absorbible ya establecido en la práctica clínica habitual que mejora la sintomatología clínica de la EH. Probablemente, esta mejoría clínica este en relación con la disminución del sobrecrecimiento con la consiguiente disminución de los lipopolisacáridos y una menor producción de amonio.

Se ha seleccionado el IGF-1 por ser una hormona anabólica con efectos pleotróficos, y a nivel de experimental se ha evidenciado en la cirrosis reducción de la translocación bacteriana, presión portal, mejoría de la permeabilidad de la mucosa y anabolismo muscular (Ver figura 5).

---

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

# ESTUDIO 1

## 1. ESTABLECER MODELO

Se utilizaron un total de 79 ratas macho, de la cepa Sprague-Dawley, con un peso inicial de  $115 \pm 10$  gramos, para obtener las 40 que fueron objeto de estudio.

### 1.1 Estabulación de los animales

Las ratas fueron estabuladas en jaulas de metacrilato en grupos de 3-4 animales por jaula. Se mantuvieron a una temperatura constante de 20-22 ° C y un ciclo de luz/oscuridad de 17/7 horas. Se alimentaron con dieta de mantenimiento para ratas (A04, Harlan-ibérica S.A., Barcelona), y agua *ad libitum*, a la que se añadió fenobarbital (Química Farmacéutica Bayer, Barcelona) a una concentración de 1,5 mmol/L. El estudio se llevó a cabo de acuerdo con la “Guia per la cura i ús dels animals de laboratori” y fue aprobado por el Comitè de Recerca i Ètica del Hospital Germans Trias i Pujol.

### 1.2 Grupos de estudio

Los 40 animales incluidos se dividieron en 4 grupos de 10 ratas cada uno. Los animales fueron distribuidos al azar.

**Grupo A: Animales control con laparotomía media:** Ratas sometidas a laparotomía media. La intervención quirúrgica se efectuó el mismo día que las intervenciones de los animales de los grupos B y D, a fin de que todas ellas tuvieran el mismo peso en el momento de la operación.

**Grupo B: Animales con ligadura total de la vena porta (LTP):** Animales sometidos a ligadura de la vena porta, inicialmente parcial y a las 48 horas total.

**Grupo C: Animales con cirrosis y ascitis:** Se indujo la cirrosis con tetracloruro de carbono. Se consideraron ratas cirróticas cuando se diagnosticó la presencia de ascitis mediante paracentesis exploradora.

**Grupo D: Animales con cirrosis, ascitis y ligadura total de la vena porta (cirrosis + LTP):** Animales a los que durante la inducción de cirrosis se sometieron a ligadura parcial y a las 48 horas total de la vena porta, continuando la inducción de cirrosis hasta la aparición de ascitis clínica. La LTP se realizó a las seis semanas de tratamiento con tetracloruro de carbono (CCl<sub>4</sub>).

Previo al sacrificio de los animales de los distintos grupos se realizó una sobrecarga oral de glutamina, se cuantificó el grado de derivación portosistémica mediante microsferas fluorescentes y se determinó el amonio cerebral y plasmático, así como la endotoxemia plasmática (Figura 7).

Figura 7: Esquema de trabajo del estudio 1

### **1.3 Laparotomía media**

Cuando los animales del grupo A alcanzaron un peso de 300-350 gramos (unas seis semanas de estabulación) se procedió a realizar una laparotomía media bajo anestesia general por vía intraperitoneal con una mezcla de ketamina (100mg/Kg), diazepam (1 mg/Kg) y atropina (0,5 mg/Kg), sin exceder un volumen total de 1,5 mL/300 gramos. La intervención quirúrgica se realizó bajo medidas de asepsia estrictas; tras haber rasurado y desinfectado con solución yodada la piel del abdomen del animal se practicó una incisión de 2 cm en la línea media subdiafragmática. A continuación, se suturó la incisión quirúrgica con hilo de seda de grosor "00" y se administró como analgésico buprenorfina (0,1 mg/Kg) por vía subcutánea cada 24 horas durante 48 horas.

### **1.4 Ligadura de la vena porta**

Esta se realizó a las seis semanas de iniciar la inducción de la cirrosis en el grupo D, y seis semanas después de alcanzar los 200 gramos en el grupo B<sup>215</sup>.

Este método consiste, en resumen, en realizar una laparotomía media bajo anestesia general tal y como se ha descrito en el apartado 1.3. Tras la incisión quirúrgica, se localizó y disecó la vena porta y a unos 3-4 mm antes de su bifurcación, se colocó un catéter de polietileno de 20 G de diámetro encima de la vena y se ligó con hilo de seda "00". Posteriormente se retiró el catéter quedando de esta manera, una estenosis parcial de la vena que limitó el diámetro intravenoso a 0,9 mm. Se suturó la incisión con hilo de seda "00". Posteriormente, se administró una dosis de buprenorfina (0,1 mg/Kg) por vía subcutánea cada 24 horas durante 48 horas.

A las 48 horas, se reabrió la laparotomía bajo anestesia general y se procedió a la ligadura total de la vena porta, lo más cercana posible al hígado. Se cerró la incisión nuevamente, y se prosiguió con la administración de buprenorfina durante tres días.

## 1.5 Inducción de la cirrosis

La inducción de cirrosis hepática se inició cuando los animales de los grupos C y D alcanzaron un peso de  $200 \pm 15$  gramos. En este momento, se administró tetracloruro de carbono ( $\text{CCl}_4$ ) a una concentración del 99,9 % (Sigma Aldrich, Madrid), una vez a la semana, por vía intragástrica, mediante una sonda de metal (Popper and Sons, New Hyde Park, NY) en un volumen inicial de  $20\mu\text{L}$ . Los volúmenes siguientes se ajustaron a los cambios de peso del animal hasta el momento de la aparición de ascitis<sup>220</sup> (tabla 4).

Variación de peso 48h después de la última dosis	<6 semanas de tratamiento variación dosis de $\text{CCl}_4$	>6 semanas de tratamiento variación dosis de $\text{CCl}_4$
Estable o aumento	Incremento en $60\mu\text{L}$	Incremento en $80\mu\text{L}$
Descenso 2% - 5,9%	Incremento en $40\mu\text{L}$	Incremento en $60\mu\text{L}$
Descenso 6% - 10%	Incremento en $20\mu\text{L}$	Incremento en $40\mu\text{L}$
Descenso 10,1% - 15%	Mantener dosis	Mantener dosis
Descenso > 15%	Disminución en $40\mu\text{L}$	Disminución en $40\mu\text{L}$

Tabla 4: Dosis a administrar de tetracloruro de carbono en función de la variación del peso del animal.

Además de la administración del  $\text{CCl}_4$  se administró fenobarbital en el agua para producir inducción enzimática y acelerar el proceso de cirrosis.

En el grupo D, dado que a la sexta semana se realizó la ligadura parcial y posteriormente total de la vena porta, no se administró la dosis de dicha semana para evitar fallo hepático sobreañadido. Se reinició la administración a la séptima semana.

## **1.6 Paracentesis exploradora**

Ante la sospecha clínica de ascitis (grupos C y D), ésta se confirmó mediante la realización de una paracentesis exploradora. Se rasuró el abdomen del animal, tras la desinfección con solución yodada y se procedió a una punción aspiradora mediante una aguja de 25 G y jeringa de insulina en la fosa iliaca izquierda.

## **1.7 Test de sobrecarga de glutamina**

Tras confirmarse por paracentesis la descompensación ascítica se procedió al test de sobrecarga de glutamina. En primer lugar, se anestesiaron las ratas con uretano (1g/Kg) por vía intraperitoneal. Cuando los animales empezaban a presentar cierto nivel de sedación se administró mediante sonda orogástrica una dosis de 100 mg/Kg de L-glutamina disuelta en agua, no superando en ningún caso un volumen máximo de 1,5 mL.

Posteriormente, y en un período de tiempo no superior a 5 minutos, se procedió a la canulación de la vena femoral externa con un abbocath de 22G y se realizaron extracciones de 200 µL de sangre en tubos con anticoagulante (EDTA pediátricos) cada 25 minutos con reposición de volemia con suero fisiológico 0,9 %.

En todo momento se monitorizó la temperatura corporal del animal mediante determinaciones rectales a intervalos de 30 minutos ajustando la fuente de calor (lámpara de infrarrojos) para mantener la temperatura corporal entre 36-38°C.

Las muestras obtenidas se centrifugaron inmediatamente durante 10 minutos a 3.500 rpm. El plasma obtenido fue congelado a -80 °C, hasta la posterior cuantificación de amonio.



## **1.8 Valoración del grado de derivación porto-sistémica**

Tras la determinación seriada de amonio, y permaneciendo aún bajo los efectos del anestésico, se procedió a canular con un abbocath de 22G la vena mesentérica superior a través de una laparotomía media. Se inyectaron 100.000 microesferas fluorescentes (fluoSpheres<sup>®</sup> polystyrene microspheres, 15 µm, red fluorescent, Molecular Probes Europe BV, Netherlands) en un volumen de 100 µL de solución salina isotónica, seguido de otros 200 µL de la misma solución en bolus. A los 30 segundos, se realizó una toracotomía, provocando la muerte del animal por colapso pulmonar.

## **1.9 Recogida de muestras**

Una vez realizada la cuantificación del grado de derivación porto-sistémica se procedió al sacrificio del animal y a la extracción de muestras.

- Muestras de sangre portal. Antes del sacrificio se obtuvieron 0,5 mL de sangre portal para cuantificación del nivel de endotoxinas.
- Muestras de sangre de vena cava. Asimismo, antes del sacrificio, se extrajeron 3 mL para estudio de los parámetros bioquímicos de la función hepática.
- Extracción de los pulmones. Se depositaron en un tubo de polipropileno para estudio de derivación portosistémica.
- Muestras de hígado. Se extrajo una pieza de 2 gramos del lóbulo lateral izquierdo que se depositó en un tubo de polipropileno para estudio de derivación portosistémica. A continuación se extrajo una segunda muestra del mismo lóbulo que se conservó en formol para su estudio histológico.

- Muestras de cerebro. Mediante craneotomía se realizó la extracción de cerebro y cerebelo, así como de tronco cerebral. El cerebro se dividió en tres partes:
  - Hemisferio cerebral, hemitronco cerebral y cerebelo izquierdos: Se depositaron en un criotubo y se congelaron a  $-80^{\circ}$  C de forma inmediata, hasta su posterior procesamiento, para cuantificar amonio y osmolitos cerebrales.
  - Lóbulo frontal derecho. Tras determinar el peso de la pieza en fresco, se depositó en un criotubo y se congeló a  $-80^{\circ}$  C hasta su posterior procesamiento para cuantificación del edema de bajo grado.
  - Lóbulo parietal, temporal y occipital, hemitronco cerebral y cerebelo derechos se fijaron en formol al 4% y posteriormente se incluyeron en parafina para estudio histológico.

### **1.10 Cuantificación de los niveles plasmáticos de endotoxina**

Se recogieron 0,5 mL de sangre en un tubo de cristal apirógeno centrifugándose (centrífuga Sigma 203, B. Braun, Barcelona) a 3500 rpm durante 10 minutos y el plasma resultante se recogió mediante un abocath apirógeno y se guardó en una jeringa tipo insulina apirógena con anticoagulante (30 unidades de heparina sódica) y se congeló a  $-80^{\circ}$ C para su posterior análisis.

- La determinación se realizó mediante el test “Limulus Amebocyte Lysate Test”, de Crifa (Jacksonville, USA) utilizando cartuchos de sensibilidad 1-0,01 Unidades de Endotoxina (Test de lymulus Endosafe PTS cartridges). Se añadieron 50  $\mu$ L de plasma en 450  $\mu$ L de agua apirógena hasta conseguir una dilución 1/10. Se puso en un baño en agitación a  $75^{\circ}$ C durante 5 minutos. Posteriormente, se añadió 1,5 mL de agua apirógena para obtener una dilución final de 1/30. Esta dilución fue la aconsejada por el proveedor, tras estudio de inhibición/potenciación de las muestras de plasma, a fin de eliminar las posibles inhibiciones producidas por el anticoagulante ya que el test se basa, precisamente, en el efecto

coagulante del reactivo ante la presencia de endotoxina. Se colocaron 25  $\mu$ L de la solución por cuadruplicado en el cartucho insertado en el lector (lector de endotoxinas Endosafe PTS Charles River Lab. Charleston).

### **1.11 Parámetros analíticos de función hepática**

La sangre total extraída se centrifugó de la misma manera que en el caso de la determinación de la endotoxina. El plasma obtenido se congeló a  $-80^{\circ}$  C hasta su procesamiento. Éste consistió en la determinación de los siguientes parámetros: aspartatoaminotransferasa (AST), alaninoaminotransferasa (ALT), bilirrubina, glucosa, triglicéridos, colesterol, urea, creatinina, albúmina y sodio.

La determinación se realizó mediante un procesador de análisis clínicos automatizado (Dimension Clinical Chemistry System. Dade Behring).

### **1.12 Cuantificación del grado de derivación portosistémico**

Las muestras de pulmón y tejido hepático obtenidas para tal fin se dejaron a temperatura ambiente durante 2 semanas para conseguir autólisis del tejido. Pasado este tiempo se procedió de la siguiente manera:

- Se añadió a cada tubo 8 mL de hidróxido potásico 2,3 M en solución alcohólica con tween-80 al 0.5 % (detergente que lisa las membranas celulares).
- Se agitaron en un agitador tipo Vortex durante 20 segundos.
- Las muestras se introdujeron en un baño agitador a  $50^{\circ}$ C durante 24 horas.
- Se reagitaron en el Vortex durante 20 segundos más.
- Se colocaron en el baño agitador otras 24 horas a  $50^{\circ}$  C.
- Pasado este tiempo, se agitaron en el Vortex y se centrifugaron durante 20 minutos a 2000 g.

- Se eliminó el sobrenadante, dejando el pellet y 1,5 mL de sobrenadante.
- Se añadieron 8 mL de tritón X-100 (surfactante no iónico) al 1 % y se agitaron durante 30 segundos.
- Se centrifugaron otra vez durante 20 minutos a 2000 g.
- Tras eliminar el sobrenadante, se dejó el pellet y 0,5-1 mL de sobrenadante.
- Se añadieron 7 mL de tampón PBS (Phosphate Buffered Saline, pH 7,2) y se agitaron durante 30 segundos. Se centrifugó durante 20 minutos a 2.000 g.
- Se eliminó el sobrenadante, dejándose el pellet y un máximo de 150 µL de sobrenadante.
- Se añadieron 3 mL de 2-etoxietil acetato a una concentración del 99,9 % y se agitó hasta conseguir la disolución del látex de las microesferas y liberar así el colorante.
- Se dejaron las muestras al abrigo de la luz y a temperatura ambiente durante 2 días.
- Pasado este tiempo, se agitaron vigorosamente durante 20 segundos hasta romper el pellet y se mantuvieron durante 3 días más en la oscuridad.
- Se agitaron intensamente durante 30 segundos hasta resuspender el pellet.
- Finalmente, se centrifugaron 20 minutos a 2.000g y se recuperó el sobrenadante en el que se procedió a la cuantificación por fluorimetría de la concentración de colorante en cada muestra.

La lectura se realizó en un fluorímetro (Varioscan Flash, Thermofisher Electron corporation, USA). La longitud de onda de excitación fue de 580 nm y la longitud de onda de emisión fue de 605 nm. La mayoría de las muestras tuvieron que ser diluidas a 1/10 o 1/20 para obtener intensidades de fluorescencia postexcitación que no sobrepasaran el límite superior de lectura

del fluorímetro. El cálculo del grado de derivación portosistémica se realizó mediante la fórmula detallada a continuación:

### 1.13 Histología hepática y cerebral

Las muestras hepática y cerebral del mismo animal se incluyeron conjuntamente en un mismo bloque de parafina. Se cortaron secciones de 5 µm de espesor y se realizó una tinción con hematoxilina-eosina. El estudio histológico fue llevado a cabo por un anatomopatólogo que desconocía la asignación de grupos de cada muestra (análisis a ciegas).

Respecto a las muestras hepáticas, se utilizó la puntuación de Scheuer para clasificar las muestras (tabla 5).

GRADO	ACTIVIDAD PORTAL/PERIportal	ACTIVIDAD LOBULAR
0	Ninguna, mínima	Ninguna
1	Inflamación portal	Inflamación pero sin necrosis
2	Necrosis parcelar periférica leve	Necrosis focal con cuerpos acidófilos
3	Necrosis parcelar periférica moderada	Lesión focal grave
4	Necrosis parcelar periférica grave	Daño difuso incluyendo necrosis con puentes

ESTADO	CRITERIOS DE FIBROSIS
0	Ninguno
1	Tractos fibrosos del espacio porta engrosados (fibrosis portal)
2	Septos periportales o porto-portales con arquitectura intacta
3	Fibrosis con distorsión de la arquitectura pero sin evidencia de cirrosis
4	Probable o definitiva cirrosis

Tabla 5: Clasificación de Scheuer: La parte superior de la tabla valora el grado de actividad necroinflamatoria de la hepatitis crónica. La parte inferior evalúa el grado de fibrosis y de cirrosis.

El estudio de las muestras cerebrales fue realizado por el mismo anatomopatólogo y se buscó la presencia de astrocitos con cambios estructurales y morfológicos característicos de las células tipo II de Alzheimer.

#### **1.14 Técnica de cuantificación de amonio plasmático y cerebral**

##### Cuantificación de amonio en plasma:

La cuantificación de amonio se realizó mediante un preparado comercial (Ammonia Assay Kit, Sigma-Aldrich, Madrid). Se añadieron 50  $\mu\text{L}$  de plasma a 500  $\mu\text{L}$  de solución para la valoración de amonio, se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente y se midió la absorbancia basal a 340 nm, se añadieron 5  $\mu\text{L}$  del enzima L-glutamato deshidrogenasa (GDH) y se incubó durante 5 minutos. Se midió la absorbancia final nuevamente a 340 nm. Asimismo, se realizó una lectura con agua destilada para obtener el valor de referencia basal (blanco) y otra lectura con un estándar de amonio de 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . La determinación del amonio plasmático se calculó mediante la fórmula:

$$A_{340} = A_{\text{Inicial}} - A_{\text{Final}}$$

$$\Delta \text{ Muestra} = A_{340} \text{ Muestra} - A_{340} \text{ Blanco}$$

$$\text{mg NH}_3/\text{mL} = \frac{\Delta \text{ Muestra} \times \text{Volumen Total} \times \text{Factor Dilución} \times 0.00273}{\text{Volumen muestra en mL}}$$

$$\mu\text{g NH}_3/\text{mL} = \frac{\Delta \text{ Muestra} \times \text{Volumen Total} \times 1 \times 2.73}{\text{Volumen muestra}}$$

$$\mu\text{g NH}_3/\text{mL} = \Delta \text{ Muestra} \times 30.303$$

#### Cuantificación de amonio en cerebro:

La cuantificación de amonio intracerebral requirió de una preparación de la muestra que consistió en la disgregación y homogenización del tejido y la posterior precipitación de las proteínas. Para ello, pesamos la muestra seleccionada y se colocó en un tubo Eppendorf con cinco volúmenes de una solución de ácido perclórico (HClO<sub>4</sub>) frío al 6 % v/v (volumen de soluto/volumen de solución), disgregándose mecánicamente. Después se agitó en un agitador tipo Vortex durante 30 segundos y se colocaron en un baño de ultrasonidos (JP Selecta, Barcelona) durante 5 minutos hasta su completa disgregación. Posteriormente, se centrifugó a 12.000g durante 10 minutos y a 4° C. Se recuperaron 500 µL de sobrenadante y para conseguir un pH entre 7 y 8 se añadieron lentamente 400 µL de carbonato potásico (KCO<sub>3</sub>) 2M, que nuevamente fueron centrifugados a 12.000g durante 4 minutos a 4° C. Se recuperaron 700 µL de sobrenadante y se comprobó su pH con tiras reactivas añadiéndose KCO<sub>3</sub> si era necesario. A partir de este momento, el sobrenadante se dividió en dos muestras; una de ellas para la cuantificación de amonio que se realizó igual que en el plasma, y la otra se utilizó para la determinación de los osmolitos cerebrales.

### **1.15 Determinación de mioinositol y otros osmolitos cerebrales**

El mioinositol y los osmolitos cerebrales (glutamina, glutamato, taurina, creatina, alanina, lactato y N-acetil-aspartato) fue analizado en los grupos control y cirrosis con ligadura. Las muestras cerebrales fueron congeladas a -80°C inmediatamente después de su extracción hasta su posterior análisis.

Para poder realizar la determinación de estos parámetros las muestras fueron pesadas y homogenizadas. Para poder desproteinizar, se añadieron 5 volúmenes de ácido perclórico frío al 6 % y se centrifugaron a 12000g durante 20 minutos con posterior neutralización del ácido con hidróxido de potasio (KHCO<sub>3</sub>, 25% wt/vol) y posteriormente fueron liofilizadas.

La cuantificación de la concentración de mioinositol cerebral y de los otros osmolitos se determinó mediante resonancia-espectroscópica magnética nuclear<sup>52,235, 236</sup>.

Para realizar dicha cuantificación, se tomaron los extractos liofilizados del cerebro que se resuspendieron en 600 µL de agua deuterada (que permite realizar las determinaciones mediante resonancia magnética). Los desplazamientos químicos se determinaron y cuantificaron utilizando una referencia interna el trimetilsililpropanato sódico (TSP) a una concentración final de 1mM.

Los espectros de resonancia magnética nuclear se adquirieron en un imán vertical Bruker Avance 400 de 4.9 Teslas equipado con una sonda de líquidos de 5 mm de diámetro. Durante el proceso de adquisición, la muestra se mantuvo a una temperatura constante de 30°C. Los espectros <sup>1</sup>H monodimensional completamente relajados (NS 32, D1 25 TR 30 s) se adquirieron con una secuencia watergate 3-9-19WG para la supresión de la señal residual del agua.

Con estos espectros se determinó la concentración de metabolitos. Para ayudar a determinar cada pico se llevaron a cabo espectros bidimensionales 2D-COSY. Para poder cuantificar el área de cada metabolito



se realizó una separación de señales mediante un procesamiento matemático (deconvolución) que permitió obtener una imagen más nítida y con más detalle de cada pico, esto permitió compararlo con la del TSP para calcular la concentración.

Los metabolitos que se cuantificaron presentan los siguientes desplazamientos químicos (tabla 6):

Metabolito	H <sup>+</sup>	δ (ppm)
Mioinositol	2	3.61
Taurina(Tau)	2	3.25
Creatina (Cr)	3	3.04
Glutamina (Gln)	2	2.46
Glutamato (Glu)	2	2.34
N-acetilaspártato (NAA)	3	2.02
Alanina (Ala)	3	1.48
Lactato (Lac)	3	1.33
Trimetilsililpropionato sódico (TSP)	9	0

Tabla 6: Cuantificación de los metabolitos cerebrales.

La determinación de los osmolitos cerebrales ha sido realizado en el Institut de Reserca Vall d'Hebron, en la unitat plataforma metabonòmica (RECAVA) del Servei de Cardiologia.

### **1.16 Determinación del grado de edema cerebral**

La determinación del edema cerebral se realizó de manera indirecta a través de la cuantificación de la diferencia ponderal entre el tejido cerebral fresco y seco. Para ello, se resecó del lóbulo cerebral la misma cantidad de muestra cerebral, tras pesarla (peso en fresco) se congeló de forma inmediata a -80 °C hasta su posterior procesamiento.

Para procesar las muestras reservadas para este fin se retiraron del congelador y directamente se colocaron directamente en el horno a 90° C durante 48 horas. Transcurrido este tiempo, se pesaron nuevamente. El contenido hídrico cerebral fue la diferencia entre el peso en fresco (muestra pesada antes de congelar) y el peso seco. El porcentaje se obtuvo con la siguiente fórmula:

$$\text{Contenido hídrico cerebral \%} = \frac{(\text{peso total fresco}) - (\text{peso total seco}) \times 100}{(\text{peso total fresco})}$$

## ESTUDIO 2

### 2. APLICACIÓN DEL MODELO

Se incluyeron un total de 100 ratas Sprague-Dawley macho con un peso inicial de  $115 \pm 10$  gramos de las que 55 finalmente fueron objeto de estudio. La mortalidad global (inducción de cirrosis y curso evolutivo de la enfermedad) fue del 62 % en las ratas cirróticas y del 15 % en las controles con ligadura.

#### 2.1 Estabulación de los animales

Los animales fueron estabulados en jaulas colectivas de entre 3 y 4 individuos por jaula de metacrilato manteniéndose a una temperatura constante de 22°C y ciclo de luz/oscuridad de 17/7 horas. Los animales fueron alimentados con dieta de mantenimiento para ratas (A04, Harlan-ibérica S.A., Barcelona), y agua *ad libitum*, en la cual se añadía 1,5 mmol/L de fenobarbital (Química Farmacéutica Bayer, Barcelona). El estudio se llevo a cabo de acuerdo con la “Guia per la cura i ús dels animals de laboratori” y fue aprobado por el Comitè de Recerca i Ètica del Hospital Germans Trias i Pujol.

#### 2.2 Grupos de estudio

Los 55 animales incluidos en el estudio se dividieron en 6 grupos (cinco grupos de 9 animales y uno de 10). Los animales fueron distribuidos al azar en el momento de su estabulación en grupos control versus tratamiento con tetracloruro de carbono. Posteriormente, a las cinco semanas se distribuyeron nuevamente todos los animales para recibir placebo, rifaximina o IGF-1.

Se dividieron en los siguientes grupos:

**Grupo A Animales control:** Diez ratas sometidas a la inyección intramuscular de 0,5 mL/Kg de solución salina isotónica (placebo) durante 14 días, para evitar posibles sesgos de estrés.

**Grupo B Animales tratados con rifaximina:** Nueve animales a los que se les administró rifaximina (50 mg/Kg/día) mediante sonda orogástrica durante 14 días, paralelamente con el grupo E.

**Grupo C Animales tratados con IGF-1:** Nueve ratas a las que se les administró IGF-1 (2 µg /100g/ cada 12 horas por vía intramuscular) durante 14 días. La administración se realizó al mismo tiempo que en el grupo F.

**Grupo D Animales con cirrosis, ascitis y ligadura total de la vena porta (LTP):** Nueve Animales en los que se realizó el mismo procedimiento que en el estudio 1. Son los controles del modelo respecto a los tratamientos.

**Grupo E Animales con cirrosis, ascitis con ligadura total de la vena porta tratadas con rifaximina:** Se incluyeron 9 animales, a los que tras realizar la inducción de cirrosis y la ligadura total de la vena porta, se inició tratamiento con rifaximina (50 mg/Kg/vo/día) a las 24 horas del diagnóstico de ascitis por paracentesis exploradora. La duración del tratamiento fue de 14 días, posteriormente, se realizó una curva de amoniemia y se sacrificaron los animales.

**Grupo F Animales con cirrosis, ascitis con ligadura total de la vena porta tratadas con IGF-1:** Se incluyeron 9 animales, a los que tras realizar la inducción de cirrosis y la ligadura total de la vena porta, se inició tratamiento con IGF-1 (2 µg/100 g/12 horas/intramuscular) a las 24 horas del diagnóstico de ascitis por paracentesis exploradora, durante 14 días. A las 12 horas de la última administración, se realizó una curva de amoniemia y se procedió al sacrificio de los animales.

Figura 8: Esquema de trabajo del estudio 2

En todos los grupos, antes del sacrificio se realizó un test de sobrecarga oral de glutamina como se ha descrito en el apartado anterior (1.7). Asimismo, el sacrificio de los animales se llevó a cabo de la misma manera que en el estudio 1, bajo anestesia se realizó una toracotomía bilateral que produjo la muerte del animal por colapso pulmonar.

### **2.3 Recogida de muestras**

Se extrajeron las diferentes muestras bajo campana de flujo laminar:

- Muestras de sangre portal. Se obtuvieron 0,5 ml de sangre portal para cuantificación del nivel de endotoxinas. Al igual que en el estudio previo la muestra fue extraída antes del sacrificio.
- Muestras de sangre de vena cava. Se extrajeron 3 mL para estudio de los parámetros bioquímicos de la función hepática y para la determinación de los niveles de IGF-1 (tanto endógena como exógena). Al igual que en el estudio previo la muestra fue extraída antes del sacrificio.
- Muestras de hígado. Se extrajo una muestra del lóbulo lateral izquierdo que se fijó en formol al 4% para su estudio histológico.
- Muestras de contenido intestinal para estudio del sobrecrecimiento bacteriano. Se tomaron muestras en el fondo cecal mediante punción con aguja de 20G de 0,2 mL. Se depositaron en un criotubo estéril y se congeló a - 80°C hasta su procesamiento.
- Muestras de cerebro. De igual manera que en el estudio anterior se extrajo y se procesó el cerebro para la determinación de los mismos parámetros (osmolitos, amonio, contenido hídrico y estudio histológico).

## **2.4 Procesamiento de las muestras**

Las determinaciones de endotoxina, parámetros biológicos, amonio plasmático basal y post-sobrecarga de glutamina, así como el agua, amonio cerebrales, se realizaron de la misma forma que en el estudio anterior (Apartados 1.10, 1.11, 1.14 y 1.16).

Las muestras destinadas para estudio histológico se procesaron y se analizaron de la misma manera (evaluación a ciegas) que en el estudio 1 (Apartado 1.13).

### **2.4.1 Determinación de IGF-1 plasmático:**

La determinación del IGF-1 murino (endógeno) y el administrado (de origen humano) se cuantificaron paralelamente mediante dos kits de Elisa (Mouse IGF-I and Human IGF-1 Elisa-Kits Quantikine®, R&D Systems, USA).

#### **A. Detección de IGF-1 Murino**

Para la cuantificación de IGF-1 murino, primero se han de preparar los reactivos y las muestras; para la preparación de los reactivos se siguió el siguiente protocolo:

- Se dejaron los reactivos a temperatura ambiente.
- Se reconstituyó el IGF-I estándar en 2 mL de solución de calibración (RD5-38) obteniendo una concentración de *2000 pg/mL*. Dejándolo durante 5 minutos en agitación suave.
- Se diluyeron 25 mL de solución concentrada de tampón de lavado en 600 mL de agua destilada para obtener 625 mL de tampón de lavado.
- Se reconstituyó el Kit control con 1 mL de agua destilada.
- Se rotularon 6 tubos tipo Eppendorf: 1.000; 500; 250; 125; 62,5; 31,25 para la curva de calibración.

- Se llenaron todos los tubos con 200  $\mu$ L de la solución de calibración (RD5-38). Y se realizaron diluciones seriadas añadiendo 200  $\mu$ L de solución estándar en el primer tubo (rotulado: 1.000) y agitando mediante un agitador tipo Vortex®, de este se extrajeron 200  $\mu$ L y se añadieron al siguiente tubo (rotulado: 500) y agitando mediante un agitador tipo Vortex® y así sucesivamente hasta obtener una dilución 1/64 en el tubo rotulado 31,25.

También se tuvieron que preparar las muestras, esto se realizó de la siguiente manera:

- Las muestras se diluyeron 1:1.000 en la solución de calibración (RD5- 38).

Para poder realizar la determinación, se tuvieron que preparar las muestras sobre una placa de 96 pocillos que contenía anticuerpos monoclonales *anti-IGF-I de ratón*. Se preparó la placa de la siguiente forma:

- Se añadieron 50  $\mu$ L de solución de calibración (RD5-38) a cada pocillo.
- Se añadieron 50  $\mu$ L de los estándares y las muestras en cada pocillo por duplicado y se cubrió la placa.
- Se dejó 2 h a temperatura ambiente en un agitador orbital a 500 rpm.
- Se aspiraron y lavaron los pocillos con 400  $\mu$ L de tampón de lavado (por pocillo). Se repitió el lavado hasta un total de cinco lavados.
- Se añadieron 100  $\mu$ L de anticuerpo frente a IGF-I conjugado en cada pocillo.
- Se tapó la placa y se incubó durante dos horas a temperatura ambiente en agitador orbital (500 rpm).



- Se aspiraron y lavaron los pocillos con 400  $\mu$ L de tampón de lavado eliminándose completamente el líquido. Se repitió cuatro veces el proceso de lavado hasta realizar un total de cinco lavados.
- Se añadieron 100  $\mu$ L en cada pocillo de la solución sustrato (reacciona con el anticuerpo coloreando de azul la muestra) que se preparó inmediatamente antes de su uso según instrucciones del proveedor. Y se incubó a temperatura ambiente y protegido de la luz durante de 30 minutos.
- Se añadieron 100  $\mu$ L de ácido clorhídrico 1 N (solución "stop") en cada pocillo y se agitó la placa, observándose un viraje del color de azul a amarillo.
- Se leyó la absorbancia a 450 nm. La concentración de IGF-1 se midió por el incremento de la absorbancia a 450 nm. Se corrigió el ruido de fondo (metacrilato de los pocillos) con la absorbancia a 570 nm.

## **B. Detección de IGF-1 Exógeno**

Para la detección del IGF-1 humano se procedió de la misma manera que para detectar IGF-1 murino salvo por:

- Las muestras de plasma se prepararon mediante una sustancia para separar el IGF-1 unido a las proteínas transportadoras (según indicación del proveedor). Asimismo, la dilución utilizada fue 1/20 en lugar de 1/1000.
- Para preparar la placa que en este caso contenía anticuerpos monoclonales anti-IGF-1 humano, se añadieron 150  $\mu$ L de solución de ensayo (RD1-53) en cada pocillo.
- Se añadieron 50  $\mu$ L de la muestra diluida y de los estándares, en cada pocillo y se tapó la placa para incubarlo durante dos horas a una temperatura entre 2 y 8 ° C.
- Se aspiró y lavó los pozos con 400  $\mu$ L de tampón de lavado en cuatro ocasiones. Se eliminó completamente el líquido tras cada lavado.

- Se añadieron 200  $\mu\text{L}$  de solución de anticuerpo conjugado en cada pocillo incubándose 1 hora más a temperatura de entre 2 y 8 ° C. Se realizaron lavados con tampón de lavado en cuatro ocasiones.
- Posteriormente, se añadieron 200  $\mu\text{L}$  de la solución sustrato en cada pocillo y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente y protegidos de la luz. Los pocillos adquirieron una coloración azul.
- Se añadieron 50  $\mu\text{L}$  de ácido clorhídrico 1 N (solución “stop”) en cada pocillo y se agitó, observándose un cambio de color del azul al amarillo.
- Se leyó la absorbancia a 450 nm y se corrigió a 570 nm.

#### **2.4.2 Contenido bacteriano intestinal**

Tras pesar las muestras de heces se añadió el triple del peso en volumen de agua destilada y se agitaron vigorosamente en un agitador tipo Vortex hasta conseguir su homogeneización. A continuación, se diluyeron 100  $\mu\text{L}$  de la muestra en 900  $\mu\text{L}$  de agua bidestilada (dilución 1/40) homogenizando la muestra nuevamente, se realizó el mismo procedimiento con 50  $\mu\text{L}$  de la muestra diluida y se añadieron 950  $\mu\text{L}$  de agua bidestilada (dilución 1/800) y finalmente una última dilución con 50  $\mu\text{L}$  en 950  $\mu\text{L}$  de agua bidestilada (dilución 1/16.000).

Mediante un asa calibrada de 100  $\mu\text{L}$  se sembraron dos placas agar-sangre quedando una dilución final de 1/8.000 y 1/160.000 UCF/mL incubándose en una estufa (Indelab C1-36L) durante 48 horas a 37°C. En ese momento, se recontaron las unidades formadoras de colonias/mL (UFC/mL). El recuento se llevo a cabo sobre las placas de menor dilución (1/8.000) siempre que fuera posible, en el caso que no se pudieran diferenciar las colonias de la placa se procedía a contar la de mayor dilución (1/160.000). Se consideró sobrecrecimiento bacteriano cuando el recuento era superior a la media + 2 desviaciones estándar de los controles.

### 3. **ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Los datos fueron expresados como media  $\pm$  desviación estándar de la media. La significación estadística fue estimada aplicando los test de Kruskal-Wallis seguidos de comparaciones múltiples a posteriori utilizando los test de U de Mann-Whitney con el ajuste de Bonferroni y la "t de Student". Se consideró significativo un valor de P inferior a 0,05 ( $p < 0,05$ ).

# RESULTADOS

---

## ESTUDIO 1

### 1.1 Mortalidad y desarrollo de ascitis

La mortalidad global del estudio fue del 49,3 % (39 ratas). La mortalidad fue nula en el grupo A (grupo control) como era de esperar, del 37 % (5 ratas) en el grupo B (grupo LTP), del 55 % (12 ratas) en el grupo C (grupo cirrosis) y del 67 % (22 ratas) en el grupo D (grupo cirrosis + LTP).

Respecto al desarrollo de ascitis no se evidenciaron diferencias entre los grupos C y D. En el grupo de cirrosis (grupo C) la ascitis se evidenció entre las semana 8 y 19 siendo la media de 13,4 semanas, mientras que en el grupo D (cirrosis más ligadura de la vena porta) fue de 9,6 semanas (entre 8 y 13 semanas, excepto una rata en la que la ascitis apareció a las 22 semanas) ( $p=0,160$ ). Como era de esperar ningún animal de los otros dos grupos A y B (control y LTP, respectivamente) desarrolló ascitis.

### 1.2 Parámetros bioquímicos y función hepática

En la tabla 7, se relacionan los parámetros bioquímicos y de función hepática en los cuatro grupos de ratas estudiados. Los parámetros analíticos de necroinflamación hepática (AST y ALT) fueron significativamente superiores en los grupos de ratas con cirrosis (C y D) comparado con los grupos sin cirrosis (A y B). Por otro lado, los parámetros como la bilirrubina, la glucosa y el colesterol fueron estadísticamente superiores en el grupo D comparado con los grupos A y B, y con tendencia a ser superior respecto al grupo C. Los niveles de urea estaban significativamente incrementados en el grupo D en comparación con los otros grupos, sin diferencias en los niveles de creatinina (Tabla 7).

	Glucosa (mmol/L)	Triglicéridos (mmol/L)	Urea (mmol/L)	Creatinina (mmol/L)	Colesterol (mmol/L)
<b>Control (Grupo A)</b>	22.0±8.2	0.32±0.1	12.6±1.2	124±39	2.6±0.5
<b>Control + LTP (Grupo B)</b>	19.8±7.0	0.56±0.2	12.1±2.1	95.9±32	2.5±0.7
<b>Cirrosis (Grupo C)</b>	18.6±9.7	0.83±0.4 <sup>a,b</sup>	11.3±1.6	90.7±29	3.6±0.8 <sup>a,b</sup>
<b>Cirrosis + LTP (Grupo D)</b>	10.8±5.4 <sup>a,b</sup>	0.76±0.3 <sup>a</sup>	18.8±2.4 <sup>a,b,c</sup>	63±28 <sup>a</sup>	3.5±0.7 <sup>a,b</sup>

a: p<0.05 vs control, b: p<0.05 vs control + LTP, c: p<0.05 vs cirrosis

	Bilirrubina (μmol/L)	ALT (UI/L)	AST (UI/L)	Albúmina (gr/L)	Na+ (mmol/L)	Endotoxina UE
<b>Control (Grupo A)</b>	0.9±0.5	109±48	259±92	34.6±4.7	130±2.1	0.034±0.004
<b>Control + LTP (Grupo B)</b>	1.3±0.4	100±41	184±71	32.0±1.5	133±1.2	0.035±0.005
<b>Cirrosis (Grupo C)</b>	2.1±1.6	331±473 <sup>a,b</sup>	622±812 <sup>b</sup>	29.8±3.2 <sup>a</sup>	136±1.4	0.09±0.037
<b>Cirrosis + LTP (Grupo D)</b>	4.6±2.3 <sup>a,b</sup>	260±281 <sup>a,b</sup>	427±295 <sup>b</sup>	25.5±3.2 <sup>a,b</sup>	134±2.2	0.14±0.067 <sup>a,b</sup>

a: p<0.05 vs control, b: p<0.05 vs control + LTP, c: p<0.05 vs cirrosis

Tabla 7 Parámetros analíticos de los cuatro grupos del estudio.

### 1.3 Grado de derivación portosistémica

El grado de derivación porto-sistémica fue similar en los grupos de cirrosis (grupos C y D) y en el grupo B, mientras que en el grupo control (grupo A) no se evidenció ningún grado de derivación porto-sistémica (Figura 8). Los valores en el grupo con cirrosis (grupo C) fueron  $33 \pm 11\%$ , en los animales con cirrosis y LTP (grupo D)  $54 \pm 10\%$ , en el grupo de LTP sobre hígado no cirrótico (grupo B)  $52 \pm 14\%$  y en el grupo control (grupo A)  $0,27 \pm 0,06 \%$ . A pesar de no evidenciarse significación estadística entre el grupo C (cirrosis sin ligadura) y los grupos en que los animales fueron sometidos a intervención derivativa (grupos B y D) se observó una tendencia a un mayor grado de derivación en estos dos últimos grupos (Figura 9).

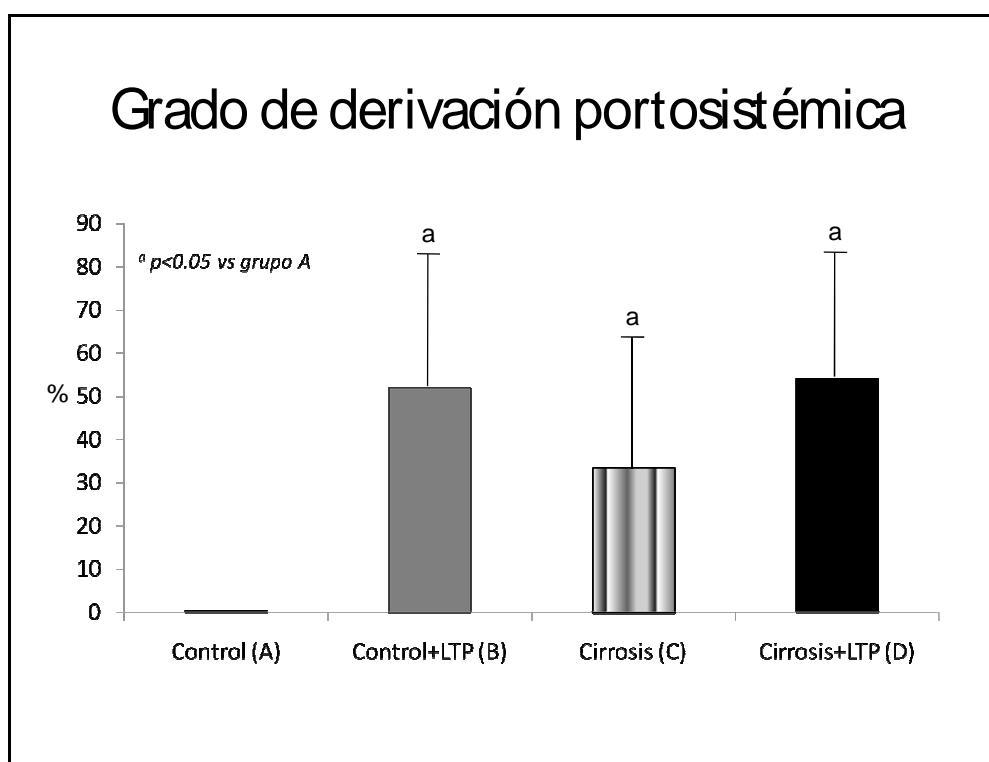


Figura 9: El grado de derivación portosistémica está en relación a la cantidad de vasos colaterales existentes, por lo que, en los grupos con ligadura hay mayor número de vasos colaterales sobretodo si se asocia a cirrosis.

En la figura 10, se puede observar la correlación directa que existió entre el grado de derivación portosistémica y los niveles de amonio plasmático tras una sobrecarga de glutamina.

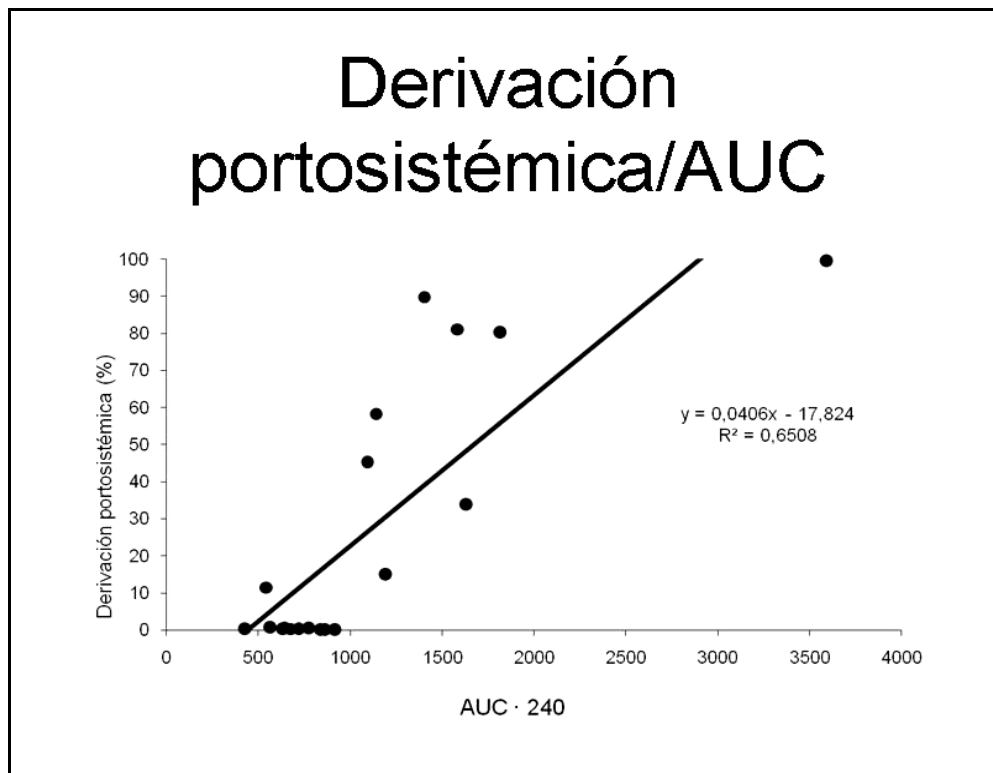


Figura 10: Tras una sobrecarga de glutamina se evidencia que existe una correlación en el 80 % de los casos ( $R = 0,806$ ), entre el grado de derivación portosistémica y la cinética del metabolismo del amonio (absorción y eliminación), representada como el área bajo la curva obtenida durante 240 minutos (AUC-240).



#### 1.4 Endotoxina plasmática

Los niveles plasmáticos de endotoxina se hallaban aumentados en los grupos C ( $0,09\pm 0,037$  UE/mL) y D ( $0,14\pm 0,067$  UE/mL) en comparación con los grupos A ( $0,034\pm 0,004$  UE/mL) y B ( $0,035\pm 0,006$  UE/mL), aunque sólo en el grupo D se objetivaron diferencias significativas frente a los grupos de ratas no cirróticas (grupos A y B) ( $p < 0,04$ ) (Figura 11).

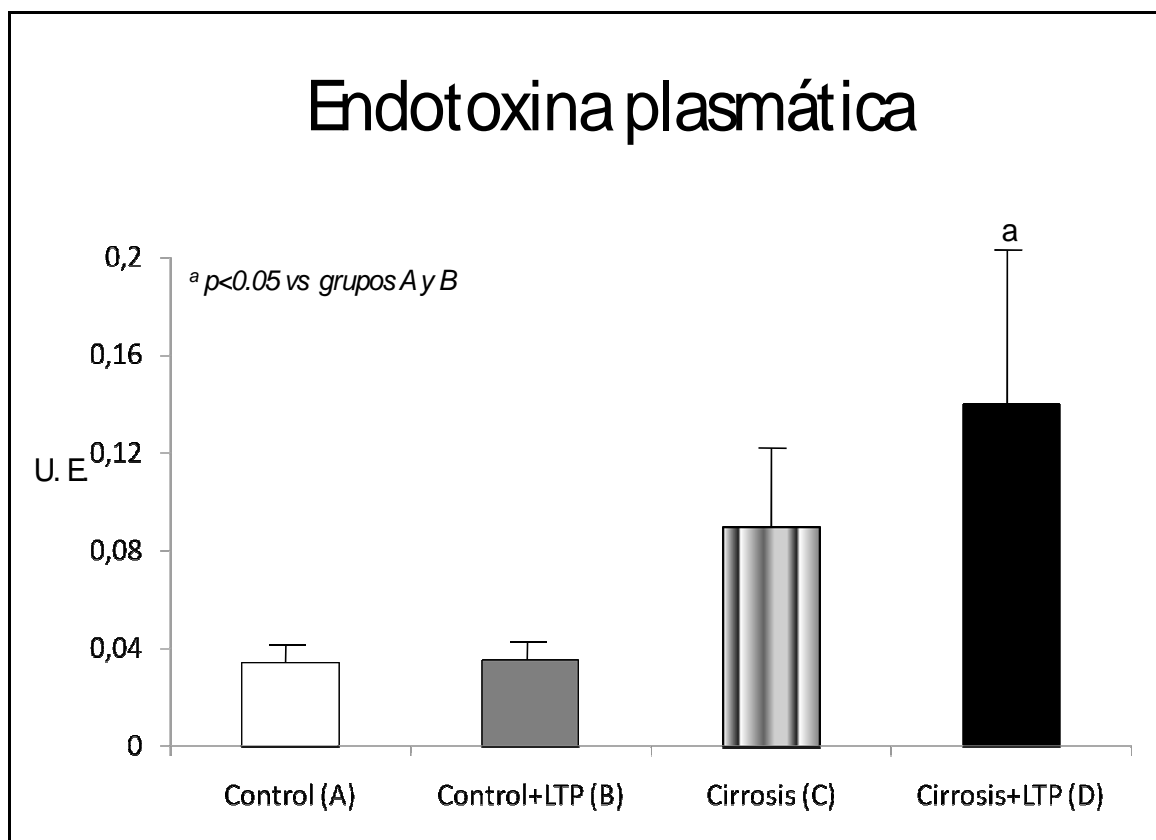
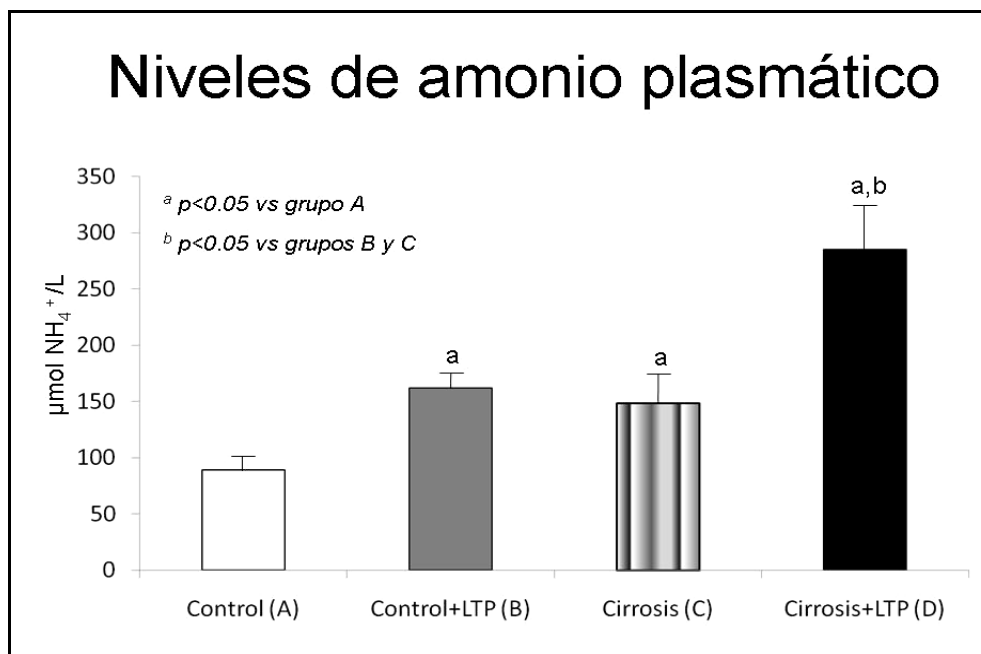


Figura 11: Niveles de endotoxemia de los animales del estudio.

## 1.5 Amonio plasmático basal

Las concentraciones plasmáticas de amonio fueron significativamente superiores en el grupo de ratas cirróticas con ligadura de la vena porta (grupo D) en comparación con las ratas de los grupos B y C. Todos estos grupos presentaron niveles de amonio más altos que los del grupo A (grupo D:  $285 \pm 44$ , C:  $162 \pm 14$ , B:  $149 \pm 27$ , y A:  $89 \pm 11$   $\mu\text{mol/L}$ ,  $p < 0,05$ ) (Figura 12).



**Figura 12:** Niveles amonio plasmático basal, antes de la sobrecarga oral de glutamina. Los niveles de amonio eran más elevados en todos los grupos en comparación con el grupo control.

## 1.6 Test de sobrecarga de glutamina

El área bajo la curva de los niveles plasmáticos de amonio tras realizar la sobrecarga de glutamina fue significativamente mayor en el grupo D respecto al resto de grupos de estudio. Por el contrario, las áreas bajo la curva de los grupos B y C fueron similares entre ellas y superiores a la del grupo A (Figura 13). Por otra parte, los niveles de amonio en todas las determinaciones realizadas en el grupo D (cirrosis + LTP) fueron superiores a las del resto de los grupos.

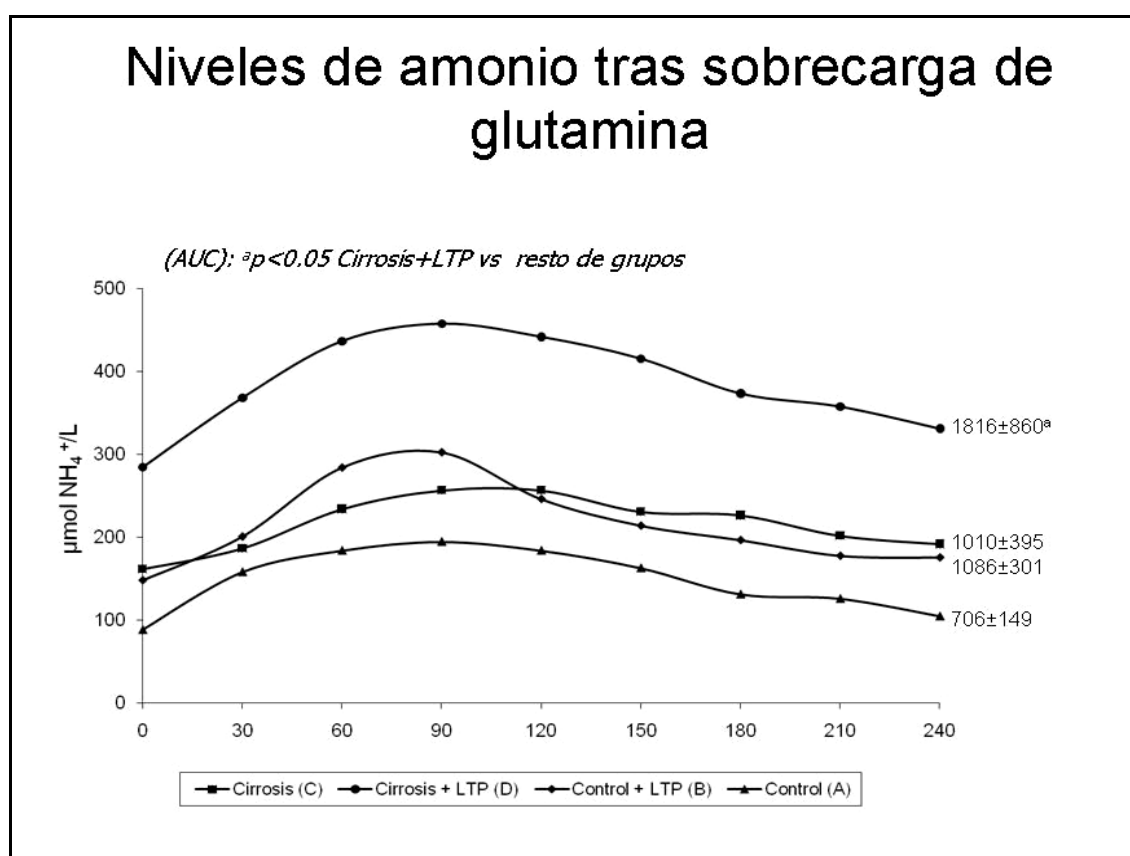


Figura 13: Áreas bajo la curva (AUC) después de 240 minutos de la sobrecarga oral de glutamina de los distintos grupos de estudio.

## 1.7 Amonio cerebral

Los niveles de amonio cerebral, tras una sobrecarga oral de glutamina, fueron significativamente mayores en el grupo D en comparación con los grupos A, B y C ( $0,42 \pm 0,05$  frente a  $0,25 \pm 0,02$ ;  $0,27 \pm 0,03$  y  $0,29 \pm 0,03$  mmol/Kg, respectivamente,  $p < 0,05$ ). No se evidencian diferencias estadísticamente significativas entre los grupos A, B y C (Figura 14).

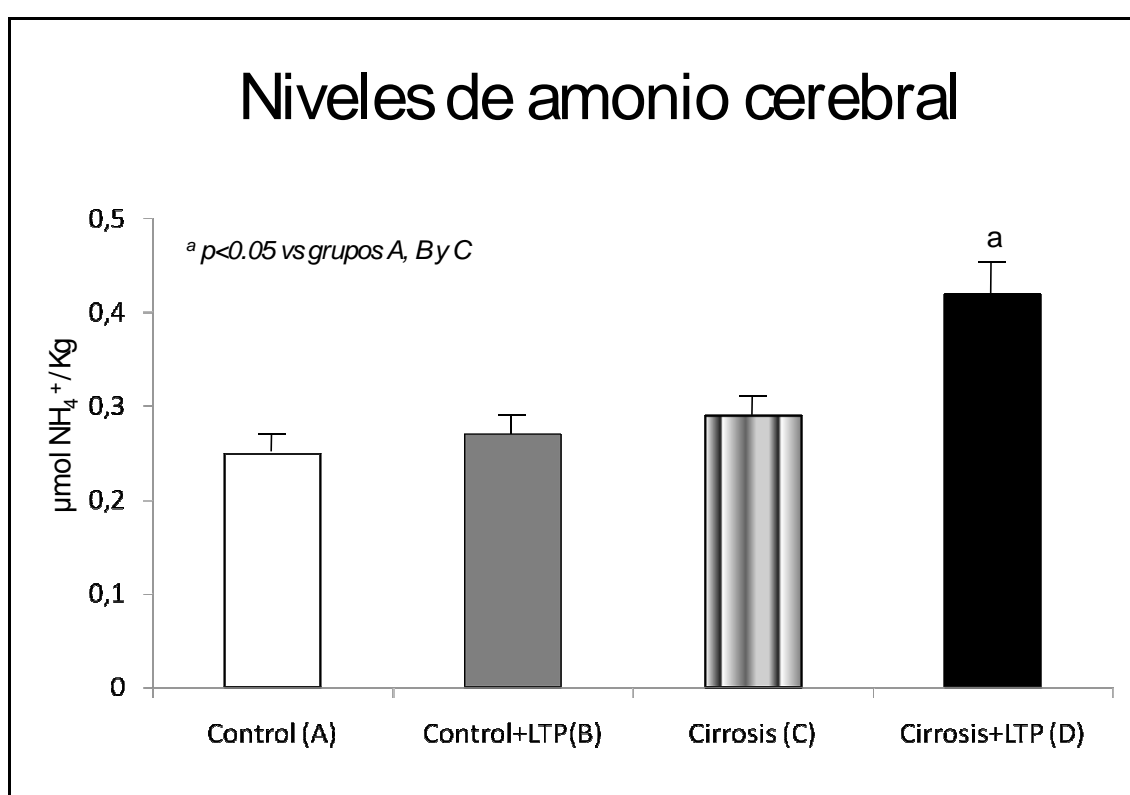


Figura 14: Los niveles de amonio cerebral fueron significativamente más altos en el grupo de ratas cirróticas + LTP respecto al resto de grupos.

## 1.8 Mioinositol y otros osmolitos cerebrales

En el grupo de ratas cirróticas con LTP (grupo D) los niveles de osmolitos cerebrales mioinositol, taurina, creatina y lactato fueron significativamente más bajos que los obtenidos en los grupos de ratas controles (grupo A), mientras que los niveles de glutamina fueron significativamente más altos (Tabla 8).

<b>Osmolitos cerebrales</b>			
<b>Osmolitos (μmol/g)</b>	<b>Control</b>	<b>Cirrosis+ LTP</b>	<b>P</b>
Myo-inositol	3.82±1.28	2.22±0.96*	0.013
Taurina	1.59±0.45	1.08±0.38*	0.029
Glutamato	3.80±1.51	3.27±0.95	0.414
Glutamina	3.50±0.69	4.78±1.99	0.109
Creatina	5.01±1.52	3.44±0.69*	0.018
NAA	3.44±1.07	2.54±0.69	0.066
Alanina	0.287±0.129	0.281±0.171	0.938
Lactato	9.21±2.59	5.97±1.22*	0.007

Tabla 8: Niveles de osmolitos cerebrales de los animales del grupo control (grupo A) y del grupo cirrosis + LTP (grupo D).

En las figuras 15 y 16 se muestran los espectros monodimensional y bidimensional de una muestra cerebral de una rata cirrótica con LTP (muestra 97), en la que se identifican los picos más importantes de los espectros.

**¡Error! No se pueden crear objetos modificando códigos de campo.**

Figura 15: Espectro de los osmolitos cerebrales de una rata del grupo cirrosis + LTP (rata 97).

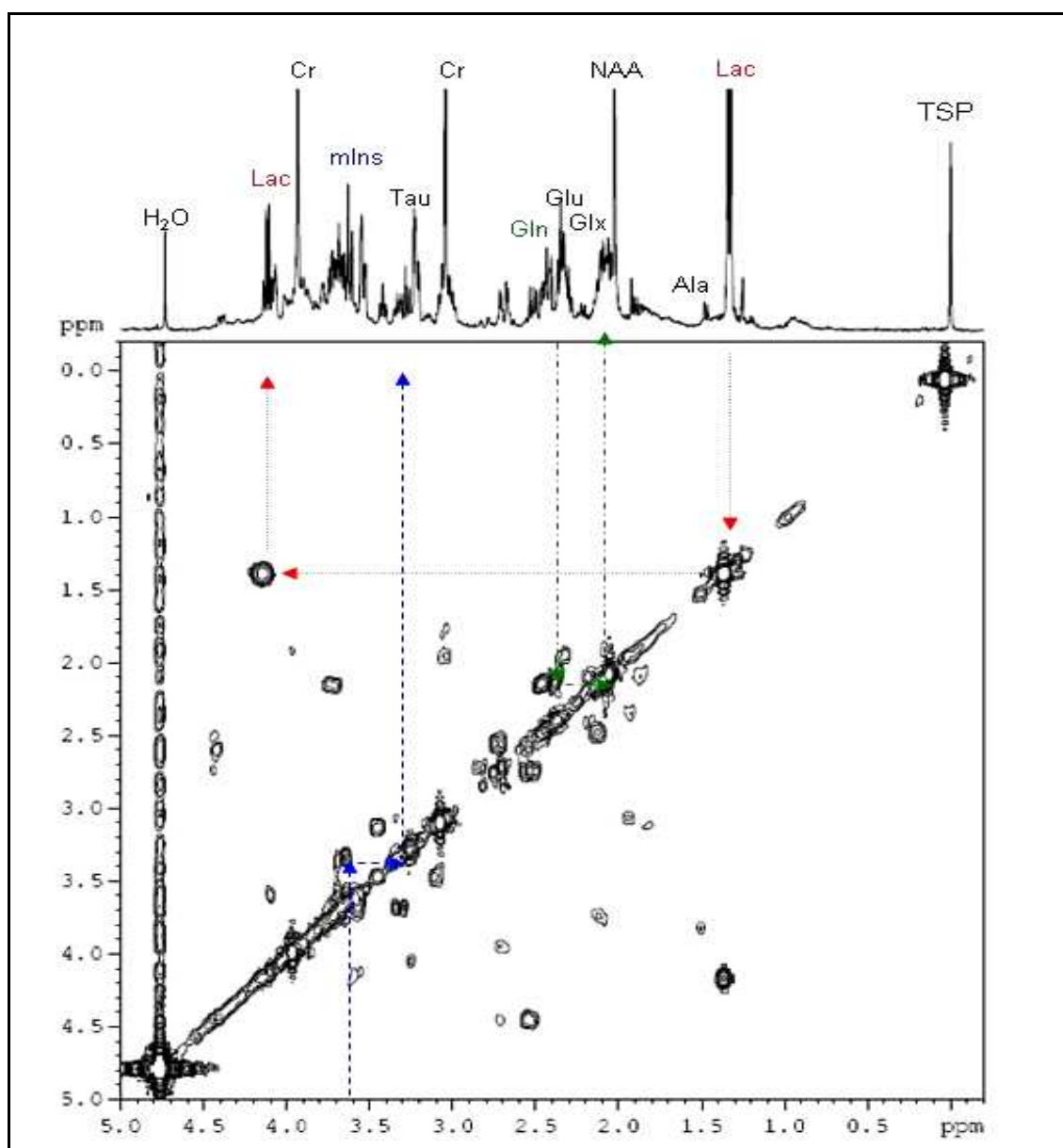


Figura 16: Espectro 2D-COSY de un animal con cirrosis y LTP (muestra 97). Myo-inositol (mlns), Taurina (Tau), Creatina (Cr), Glutamina (Gln), Glutamato (Glu), Glutamato + Glutamina (Glx), n-acetilaspártato (NAA), alanina (Ala), Lactato (Lac), trimetilsililpropionato sódico (TSP).

## 1.9 Edema Cerebral

El contenido hídrico cerebral (edema de bajo grado) fue significativamente mayor en el grupo de ratas cirróticas con LTP (grupo D) ( $79,07 \% \pm 0,66$ ) en comparación tanto con el grupo de cirrosis (grupo C) ( $78,56 \% \pm 0,25$ ) como con el grupo de LTP (grupo B) ( $78,63 \% \pm 0,24$ ) y con las ratas control (grupo A) ( $78,24 \% \pm 0,19$ ,  $p < 0.05$ ).

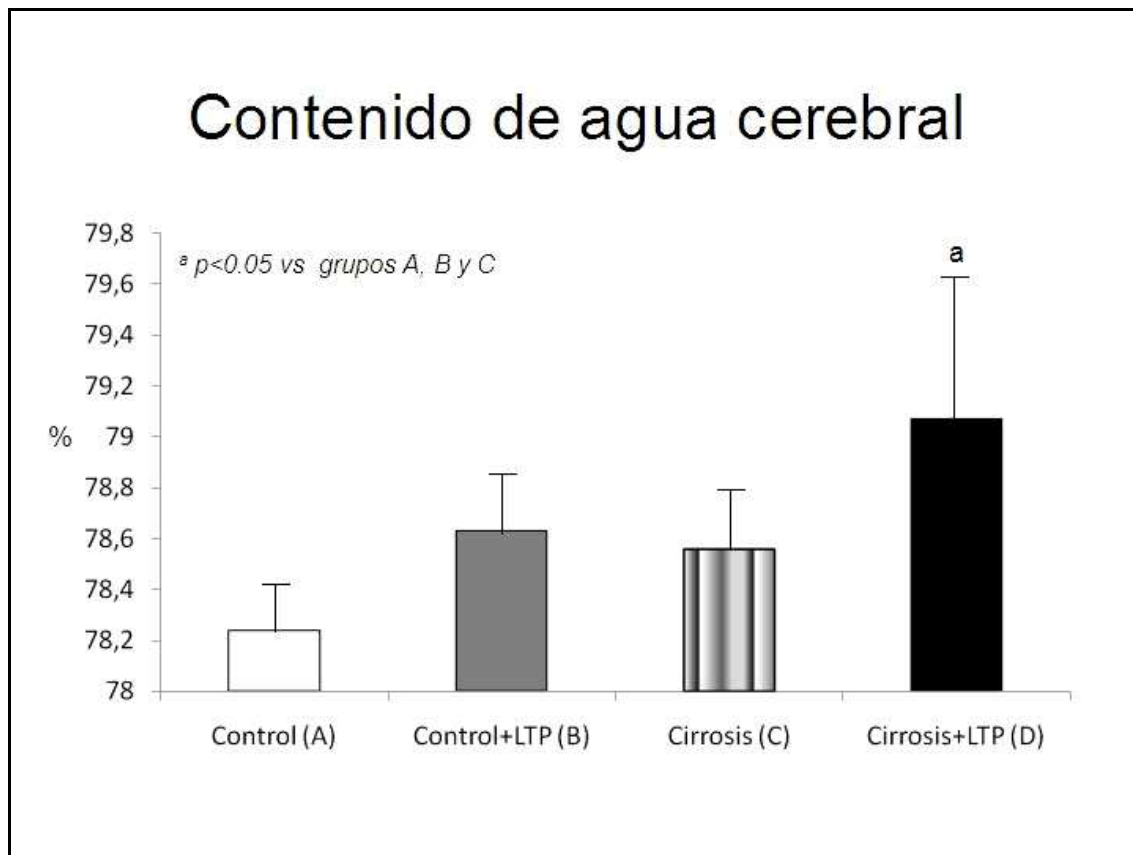


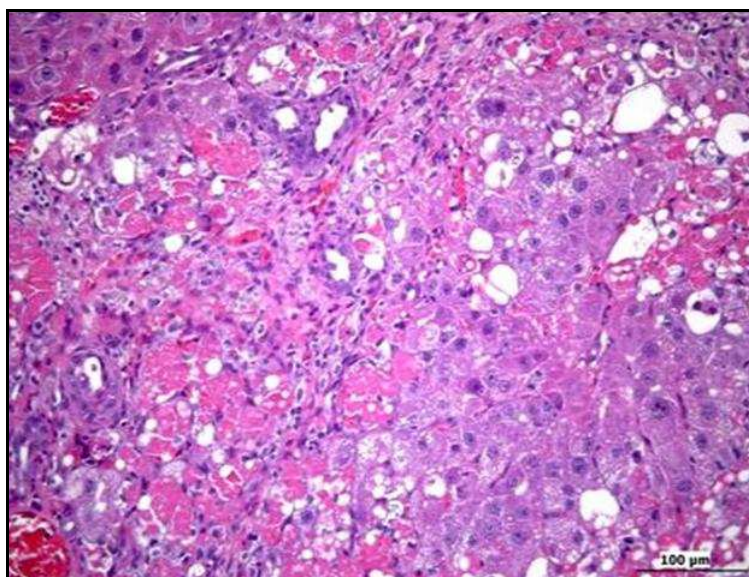
Figura 17: El contenido de agua cerebral fue significativamente más elevado en el grupo de ratas cirróticas + LTP en comparación a los otros grupos.

## 1.10 Histología



## **Histología hepática**

Todas las ratas que fueron tratadas con tetracloruro de carbono desarrollaron cirrosis con nódulos de regeneración. De acuerdo con el sistema de clasificación para valorar el grado de fibrosis descrito por Scheuer<sup>237</sup>, se evidenció que todas las ratas presentaron un grado de fibrosis 4 (F4). (Figura 18). En cambio, en las ratas a las que no se les indujo cirrosis, la histología hepática fue normal, salvo la presencia ocasional (<1 %) de alguna vacuola con contenido graso, hallazgo propio en los animales de esta edad. (Figura 19)



**Figura 18:** Todos los animales de los grupos tratados con CCl<sub>4</sub> (grupos C y D, cirrosis y cirrosis con ligadura, respectivamente) presentaban en las muestras hepáticas cirrosis con necrosis y esteatosis.



Figura 19: Biopsia hepática de un animal del grupo control. Se observa un hígado de aspecto normal con alguna vacuola de grasa.

### **Histología cerebral**

Como era de esperar, no se observaron cambios histológicos en el cerebro en ninguno de los animales de los grupos A y B (animales no cirróticos) (Figura 20). Por el contrario, en el grupo D (cirrosis + LTP) se evidenciaron cambios histológicos compatibles con células tipo II de Alzheimer en los astrocitos (edema astrocitario, núcleo pálido, alargado, grande, edematoso, lobulado, con la cromatina dispuesta en la periferia y con un nucleolo prominente) en casi la mitad de las ratas de este grupo. (Figura 21)



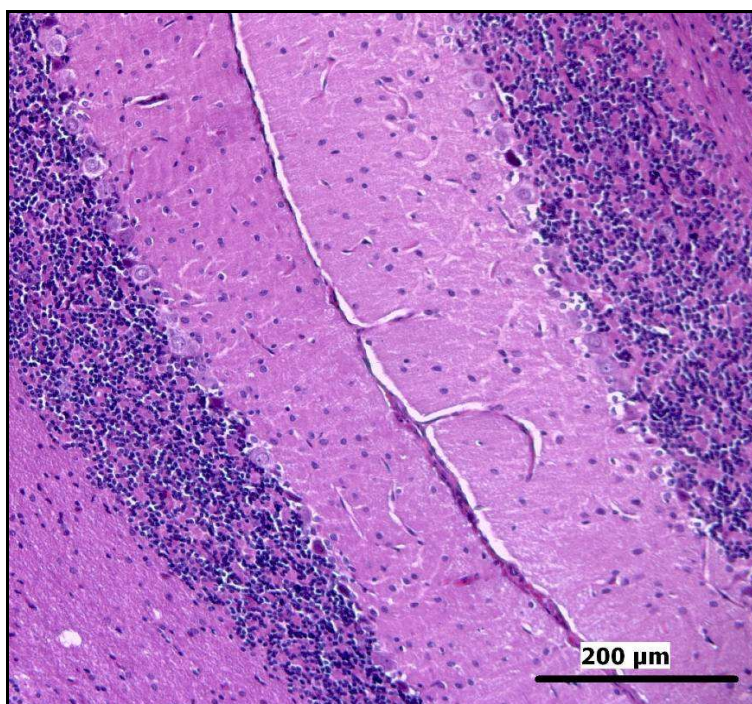


Figura 20: Muestra de un cerebro de rata control donde se aprecian astrocitos de aspecto normal.

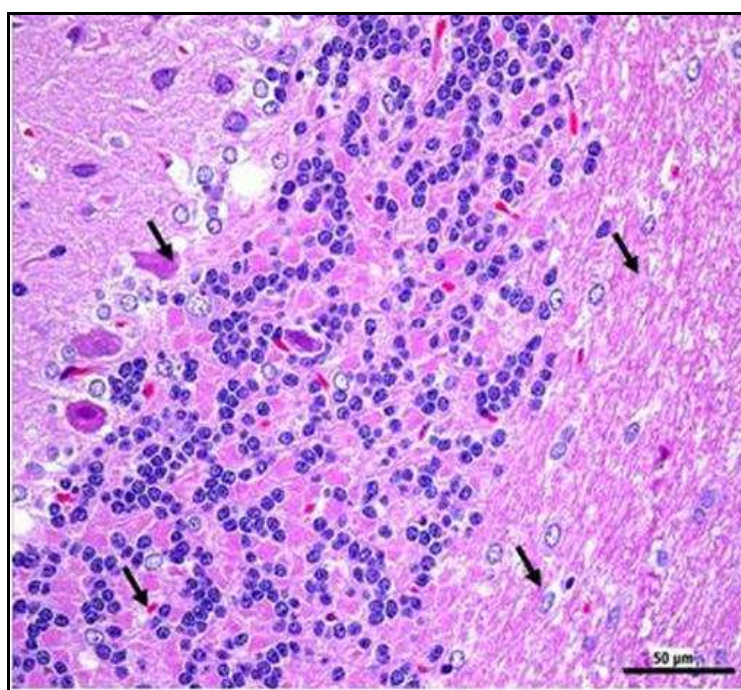


Figura 21: Las flechas muestran astrocitos con cambios morfológicos característicos de las células tipo II de Alzheimer. Este tipo de células fue observado en el 50 % de los animales con cirrosis.

## ESTUDIO 2

### **2.1 Mortalidad**

La mortalidad de los animales en este segundo estudio fue similar a la observada en el primero. Un 64 % de los animales con cirrosis y ligadura de la vena porta murieron antes de desarrollar ascitis. Durante los 14 días de tratamiento (placebo, rifaximina o IGF-1) murieron otros siete animales distribuidos como sigue: tres animales en el grupo cirrosis y LTP (Grupo D; 3/12, 25%), dos animales del grupo cirrosis y LTP tratados con rifaximina (Grupo E; 2/11, 18,2%) y dos animales del grupo cirrosis y LTP tratados con IGF-1 (Grupo F; 2/11, 18,2 %). No hubo diferencias significativas entre los grupos. Ninguno de los animales de los grupos controles (control, control + rifaximina, control + IGF-1) murió durante el estudio.

### **2.2 Parámetros bioquímicos**

En la tabla 9 se muestran los principales parámetros bioquímicos en los seis grupos de ratas estudiadas. Los parámetros bioquímicos de función hepática (AST y ALT) estaban aumentados en los grupos de ratas con cirrosis, siendo las AST significativamente superiores respecto a los controles en los grupos con cirrosis + LTP (grupo D) y en el grupo con cirrosis + LTP + tratamiento con IGF-1 (grupo F).

Respecto a las ALT, los niveles séricos fueron significativamente superiores en los mismos grupos de animales (D y F) respecto a los grupos control y control + IGF-1 (grupos A y C).

La bilirrubina fue significativamente superior en el grupo de ratas con cirrosis + LTP (grupo D) respecto a todos los otros grupos. En el grupo F (cirrosis + LTP + IGF-1) la bilirrubina fue significativamente superiores a la observada en los

grupos controles (A, B y C) y mayor que en el grupo E (cirrosis + LTP + rifaximina) aunque sin diferencias estadísticamente significativas. En el caso del grupo E, los niveles de bilirrubina fueron significativamente superiores a los observados en el grupo de animales control + IGF-1.

En relación a los niveles plasmáticos de glucosa se observaron diferencias significativamente superiores en dos grupos de animales con cirrosis (cirrosis + LTP y cirrosis + LTP + IGF-1, grupos D y E, respectivamente). Por otra parte los niveles de glucosa fueron significativamente superiores en el grupo con cirrosis + LTP + Rifaximina (grupo E) respecto al grupo control + IGF-1 (grupo C).

En los grupos controles (A, B, C) no existieron diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los parámetros valorados. En cuanto a la creatinina y las proteínas totales no se observan diferencias significativas entre ninguno de los grupos estudiados (Tabla 9).

## Parámetros bioquímicos

Grupos	Glucosa mmol/L	Bilirrubina μmol/L	Proteínas Totales	Creatinina μmol/L	GPT UI/L	GOT UI/L
Control (Grupo A)	25,17±8,97	3,2±0,58	48,68±14,6	119,0±24,1	94,43±82,94	179,15±106,9
Control + rifaximina (Grupo B)	31,39±6,26	3,1±0,60	48,78±2,66	97,0±46,3	97,66±70,39	236,22±129,5
Control + IGF-1 (Grupo C)	27,63±7,27	2,9±0,32	44,86±9,05	96,2±43,1	68,9±31,3	183,3±77,8
Cirrosis + LTP (Grupo D)	9,41±5,70 <sup>a</sup>	22±17,76 <sup>c</sup>	44,67±8,69	84,5±20,2	131,2±35,97 <sup>a</sup>	333,2±188,4 <sup>e</sup>
Cirrosis + LTP + rifaximina (Grupo E)	17,75±8,10 <sup>b</sup>	5±3,25 <sup>d</sup>	49,5±2,30	82,4±44,6	121,43±48,83 <sup>d</sup>	262,14±129,9
Cirrosis + LTP + IGF-1 (Grupo F)	9,43±2,10 <sup>a</sup>	10,2±8,77 <sup>a</sup>	52,1±5,14	51,2±13,1	210,33±175,9 <sup>a</sup>	482,33±365 <sup>e</sup>

<sup>a</sup> p<0,05 vs grupos control, <sup>b</sup> p<0,05 vs control+Rifx, <sup>c</sup> p<0,05 vs todos los otros, <sup>d</sup> p<0,05 vs control+IGF-1, <sup>e</sup> p<0,05 vs control y control+IGF-1

Tabla 9: Parámetros bioquímicos de función hepática y función renal.

### 2.3 Niveles de endotoxina plasmática

El grupo de animales con cirrosis y ligadura de la vena porta (grupo D) presentó los niveles más altos de endotoxina plasmática ( $0,0582 \pm 0,021$ ), significativamente más elevados que los grupos control (A:  $0,0384 \pm 0,009$ , B:  $0,0373 \pm 0,007$  y C:  $0,0378 \pm 0,084$ ;  $p < 0,05$ ). Tanto el tratamiento con IGF (grupo F) y con rifaximina (grupo E) fueron capaces de normalizar los niveles plasmáticos de endotoxina y fueron similares a los encontrados en los grupos control (F:  $0,041 \pm 0,009$  y E:  $0,0432 \pm 0,012$ ;  $p = \text{n.s.}$  respecto A, B y C) (Figura 22).

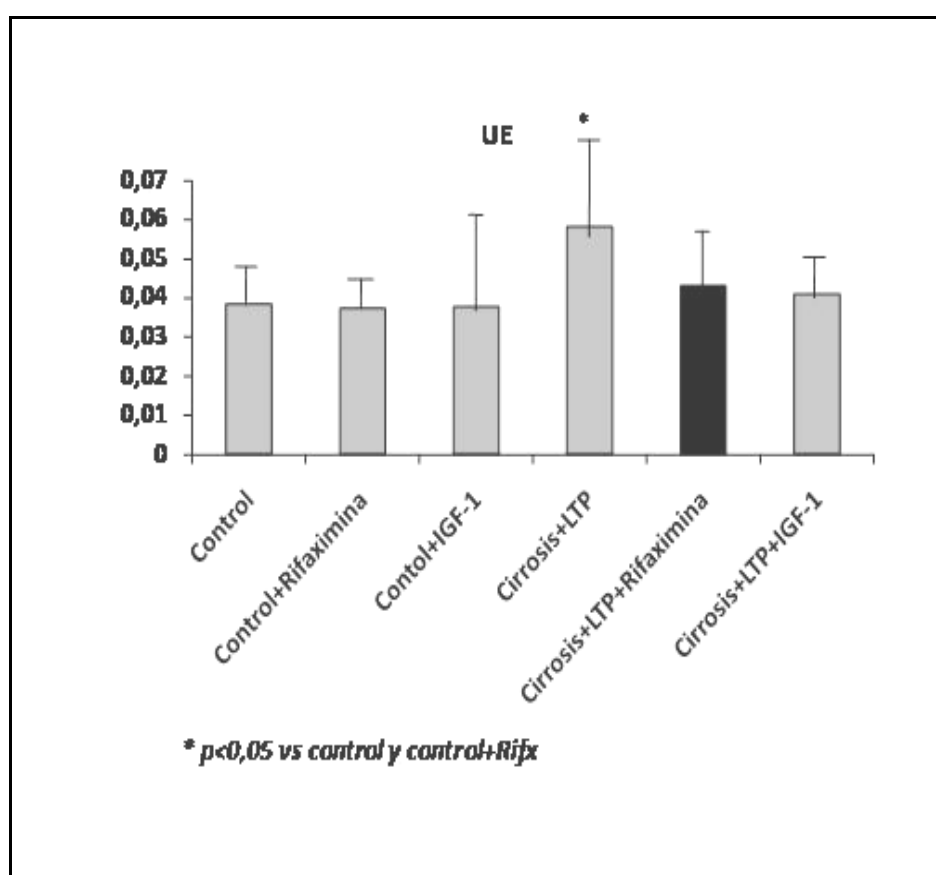


Figura 22: Niveles de endotoxemia plasmática.

## 2.4 Amonio Plasmático

Como ya se evidenció en el estudio 1, los niveles de amonio plasmático basal fueron más altos en el grupo de animales con cirrosis y ligadura de la vena porta (grupo D:  $268,78 \pm 83,11$  p <0.05 respecto a los grupos A, B, C, E). El tratamiento con IGF-1 fue incapaz de reducir dichos niveles (grupos F:  $325,59 \pm 165,7$  , p < 0.05 respecto a los grupos A, B, C y E), Por el contrario, en el grupo tratado con rifaximina (grupo E) disminuyó de forma significativa la concentración de amonio plasmático, alcanzando niveles similares (E:  $200,93 \pm 118,88$ ) a los hallados en los grupos controles (A:  $136,23 \pm 102,7$ , B:  $112,04 \pm 99,94$ , C:  $134,66 \pm 106,78$ , p= n.s) (Figura 23).

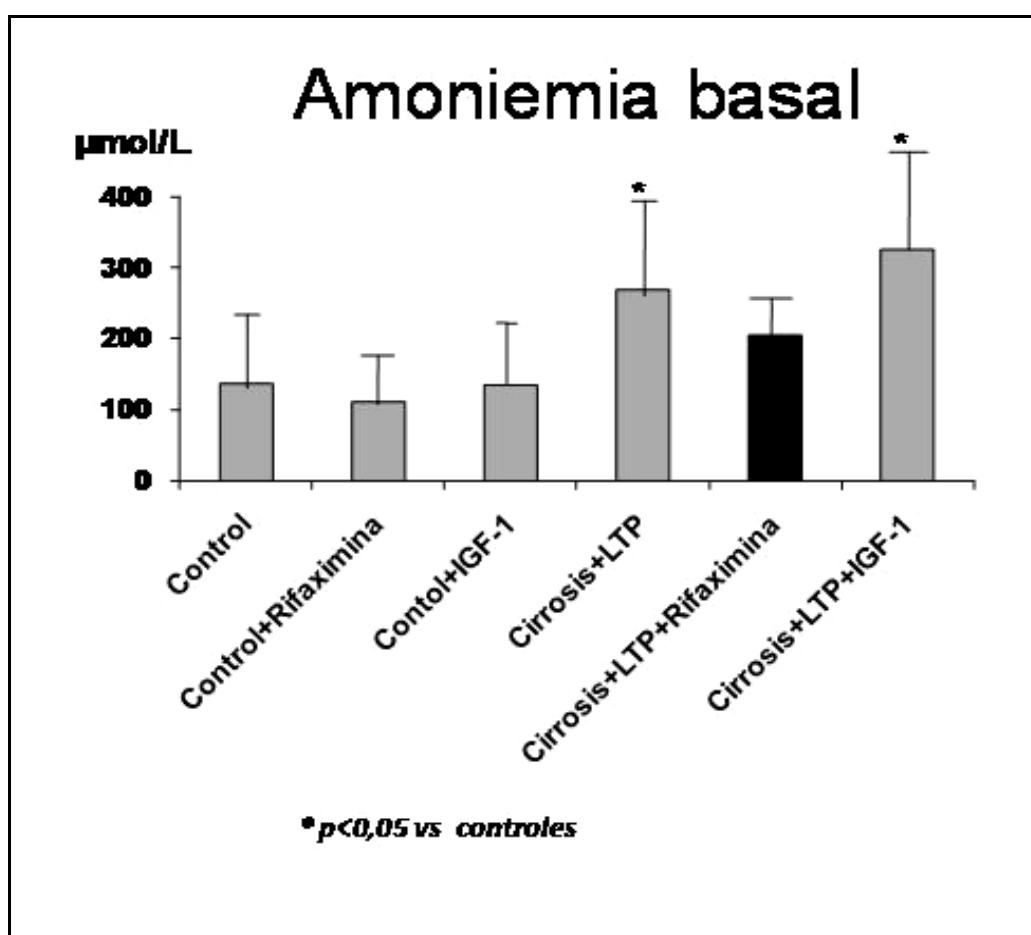
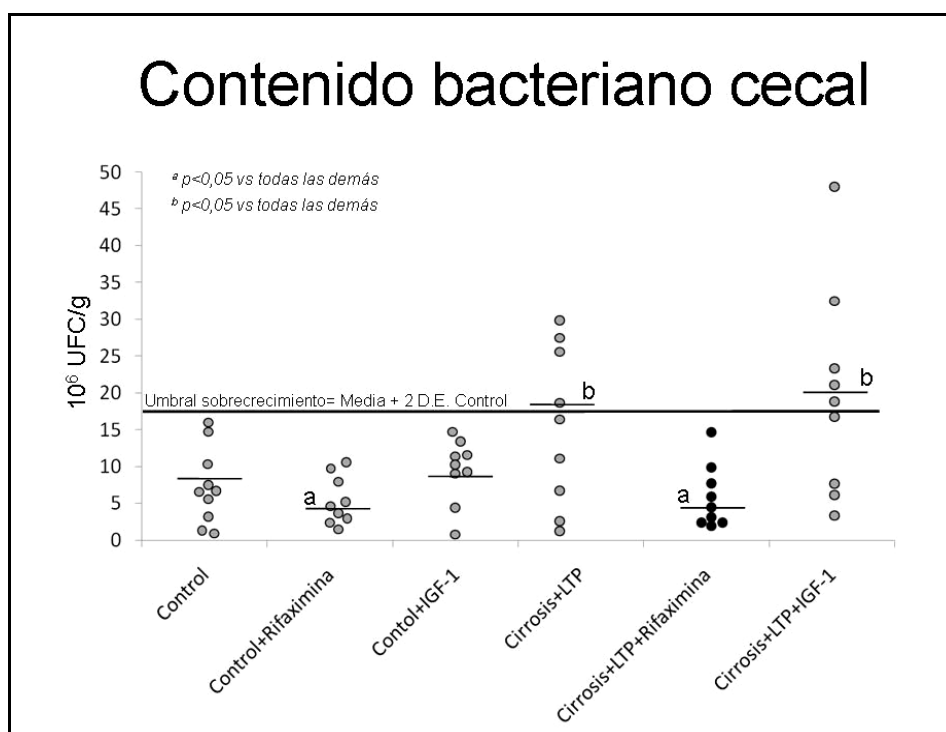


Figura 23: Niveles de amoniemia de todos los grupos de estudio siendo estadísticamente mayor en los grupos D y F.

## 2.5 Sobrecrecimiento bacteriano intestinal

El punto de corte para determinar sobrecrecimiento bacteriano se estableció, a partir de la media  $\pm$  2 DS del grupo control<sup>238</sup>, siendo estos valores de  $8,44 \cdot 10^6 + 2x 4,6 \cdot 10^6 = 17,64 \cdot 10^6$  UFC/mL.

La administración de rifaximina se acompañó de una disminución significativa del contenido bacteriano cecal, tanto en el grupo control + Rifaximina (grupo B:  $4,41 \cdot 10^6 \pm 3,3 \cdot 10^6$ ) como en el grupo cirrosis + LTP + Rifaximina (grupo E:  $4,4 \cdot 10^6 \pm 4,1 \cdot 10^6$  UFC/mL), en comparación tanto con los otros dos grupos controles (grupos A y C, respectivamente  $8,44 \cdot 10^6 \pm 4,6 \cdot 10^6$  y  $8,91 \cdot 10^6 \pm 4,0 \cdot 10^6$  UFC/mL) como en los grupos cirróticos no tratados con rifaximina (grupos D y F  $18,6 \cdot 10^6 \pm 10,7 \cdot 10^6$  y  $20,43 \cdot 10^6 \pm 13,9 \cdot 10^6$  UFC/mL, respectivamente). Además, rifaximina fue capaz de eliminar el sobrecrecimiento bacteriano en el grupo de cirrosis tratado con este antibiótico (grupo E). Por el contrario, casi la mitad de los animales cirróticos + LTP no tratados con rifaximina presentaban sobrecrecimiento bacteriano (Figura 24).



**Figura 24:** Contenido bacteriano cecal, evidenciándose un sobrecrecimiento estadísticamente significativo en los grupos con cirrosis+LTP y cirrosis+LTP + IFG-1, por el contrario el grupo de ratas con cirrosis+LTP en tratamiento con rifaximina los niveles son similares a los controles.



## 2.6 Amonio Cerebral

Los resultados obtenidos en la determinación de amonio cerebral presentaron un comportamiento similar a los de amonio plasmático. Los resultados fueron los siguientes; grupo A:  $0,444 \pm 0,09$  mmol/Kg, grupo B:  $0,484 \pm 0,15$  mmol/Kg, grupo C:  $0,508 \pm 0,165$  mmol/Kg, grupo D:  $0,761 \pm 0,23$  mmol/Kg, grupo E:  $0,535 \pm 0,18$  mmol/Kg y grupo F:  $0,640 \pm 0,21$  mmol/Kg. Los niveles de amonio cerebral en los grupos D (cirrosis + LTP), y F (cirrosis + LTP + IGF-1) fueron significativamente superiores respecto al resto de grupos ( $p < 0,05$ ). En cambio, los niveles de amonio cerebral en el grupo de ratas cirróticas con LTP que fueron tratadas con rifaximina (grupo E) fueron similares a los observados en los grupos controles (Figura 25).

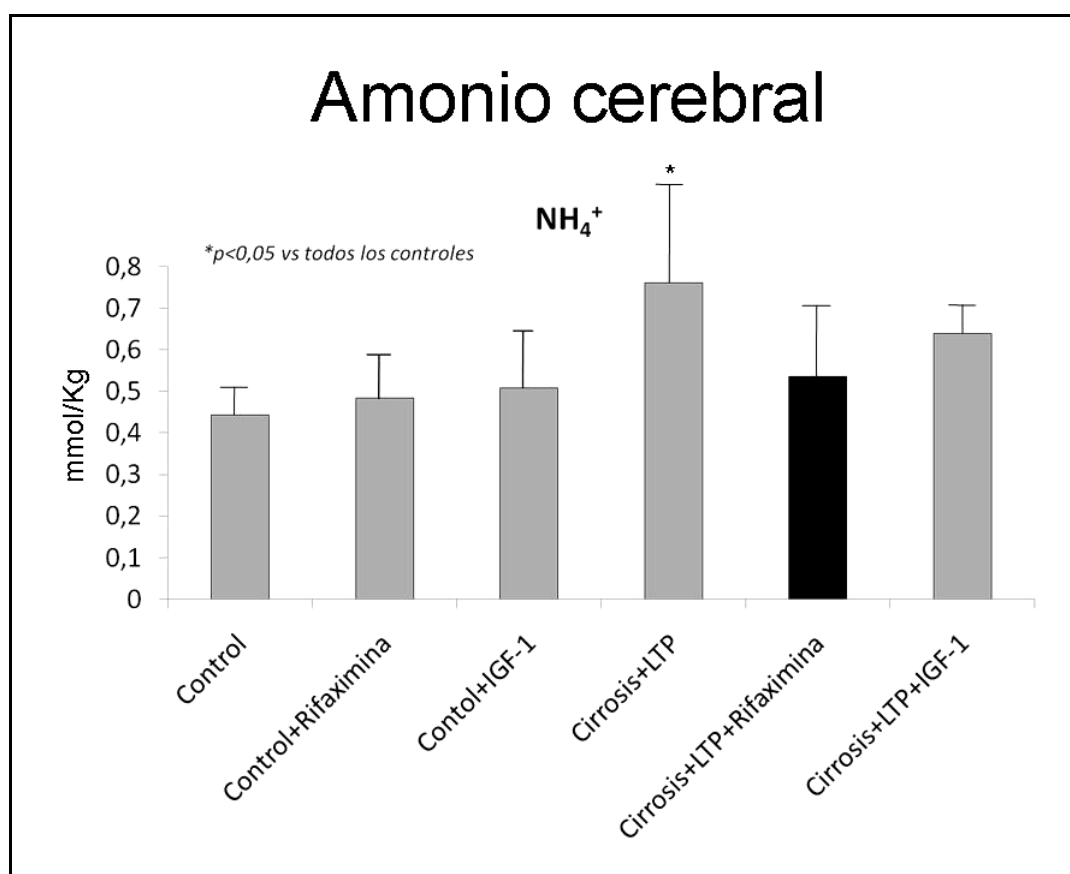


Figura 25: Niveles de amonio cerebral en los distintos grupos de estudio.

## 2.7 Test de sobrecarga de glutamina

La cinética de eliminación de amonio tras sobrecarga de glutamina valorada como el área bajo la curva de eliminación de amonio fue mayor en las ratas cirróticas con ligadura de la vena porta (grupo D:  $1885,9 \pm 198$ ) que en las ratas controles independientemente de su tratamiento A:  $1363,7 \pm 853$ , B:  $1476,6 \pm 659$  y C:  $1158,6 \pm 541$ ). El tratamiento con rifaximina mejoró la cinética de eliminación de amonio en las ratas cirróticas (Grupo E:  $1628,5 \pm 1199$ ), mientras que IGF-1 fue incapaz de mejorar este parámetro en estas ratas (grupo F:  $3337 \pm 2198$ ) (Figura 26).

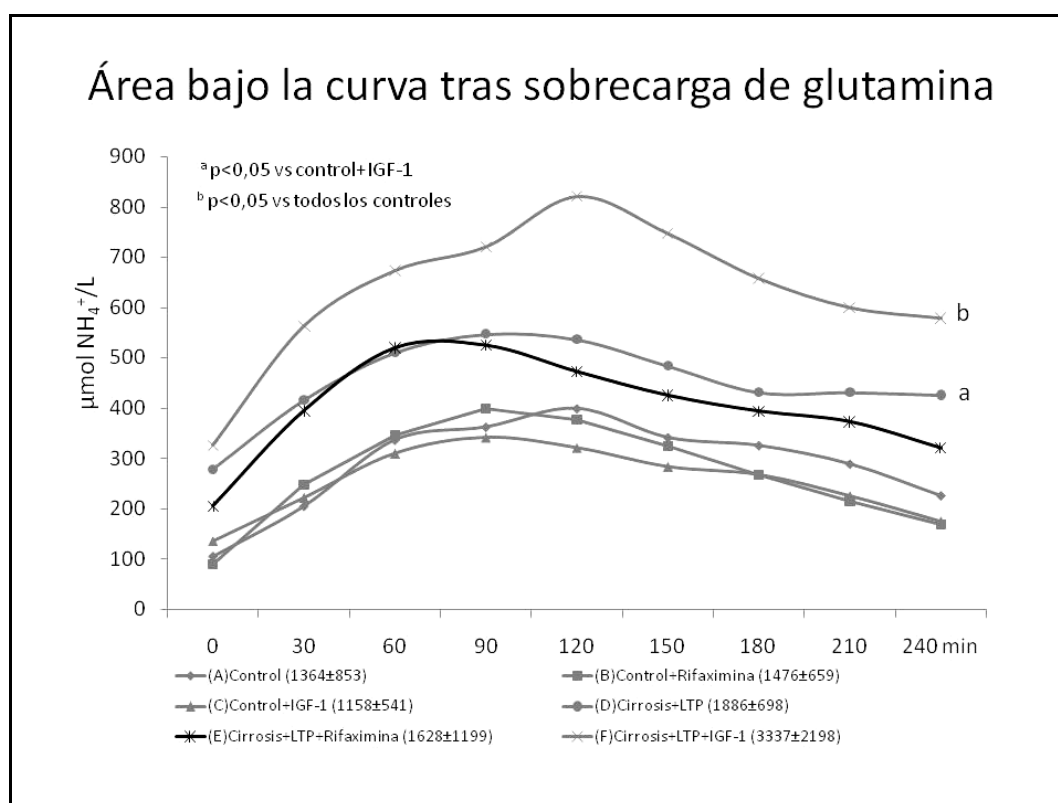


Figura 26: Área bajo la curva de los niveles de amonio tras una sobrecarga de glutamina durante 240 minutos.

## 2.8 Edema de bajo grado cerebral

La presencia de edema de bajo grado se cuantificó mediante el contenido de agua cerebral. Los animales cirróticos con ligadura de la vena porta (grupos D, E y F) mostraron un contenido de agua cerebral significativamente mayor que los controles independientemente del tratamiento (Grupo D:  $0,7907 \pm 0,0067$  frente a grupo A:  $0,7851 \pm 0,0074$ , grupo B:  $0,7796 \pm 0,0070$  y grupo C:  $0,7844 \pm 0,0018$ ;  $p < 0.05$ ). El tratamiento de las ratas cirróticas con rifaximina eliminó la presencia de edema de bajo grado en estos animales (grupo E:  $0,7866 \pm 0,0123$ ;  $p < 0.05$  frente a grupo D y  $p < n.s.$  frente a los grupos A, B, C). Por el contrario, el grupo de ratas cirróticas tratadas con IGF-1 presentaron unos niveles similares al grupo D (grupo F:  $0,7883 \pm 0,0026$ ) (Figura 27).

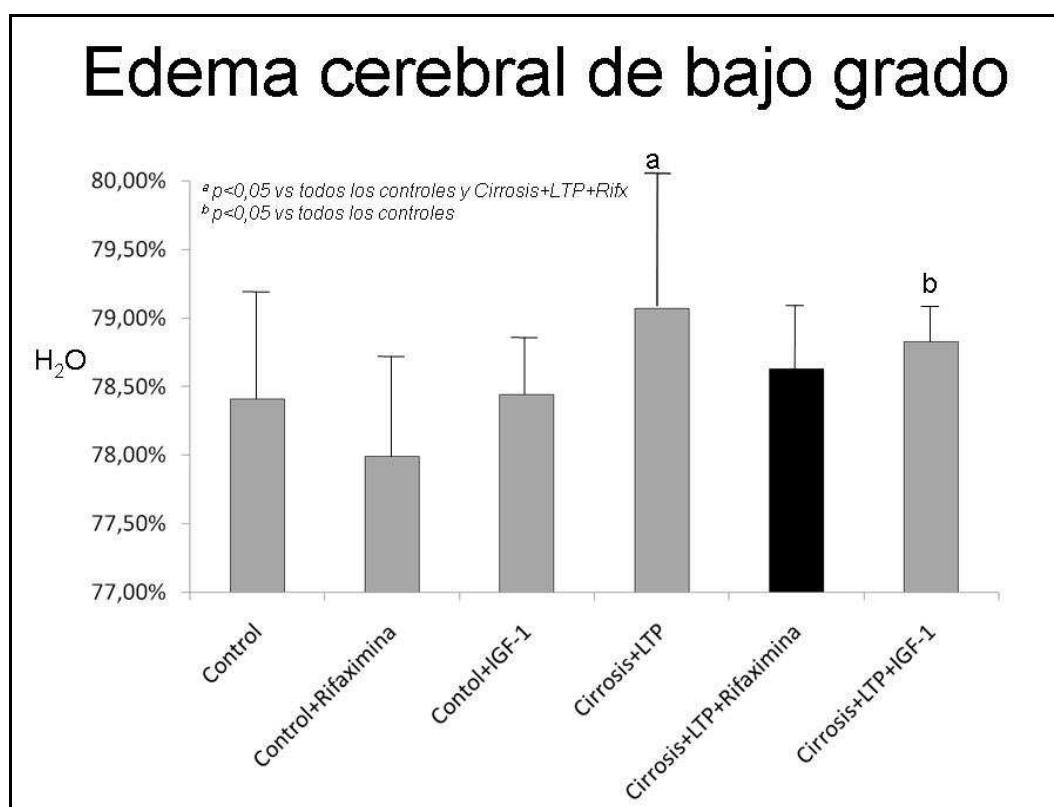


Figura 27: Porcentaje de edema cerebral de bajo grado en los grupos de estudio.

## 2.9 Determinación de los niveles de IGF-1

En relación a los niveles de IGF-1 endógeno (origen murino) se evidenció una clara diferencia de valores entre los grupos control respecto a los grupos cirróticos ( $p < 0,05$ ). Aunque, individualmente no hubo ningún grupo que presentase una diferencia estadísticamente significativa respecto a los demás, se observó que el grupo F (tratado con IFG-1) fue el que presentó los niveles más bajos de IGF-1 murino (Figura 28).

Se determinaron los niveles plasmáticos de IGF-1 exógeno en los grupos a los que se les administró IGF-1, es decir en los grupos C y F. La cuantificación se realizó en sangre periférica unas 12 horas después de su última administración (aproximadamente una  $t_{1/2}$ ). Los niveles fueron indetectables.

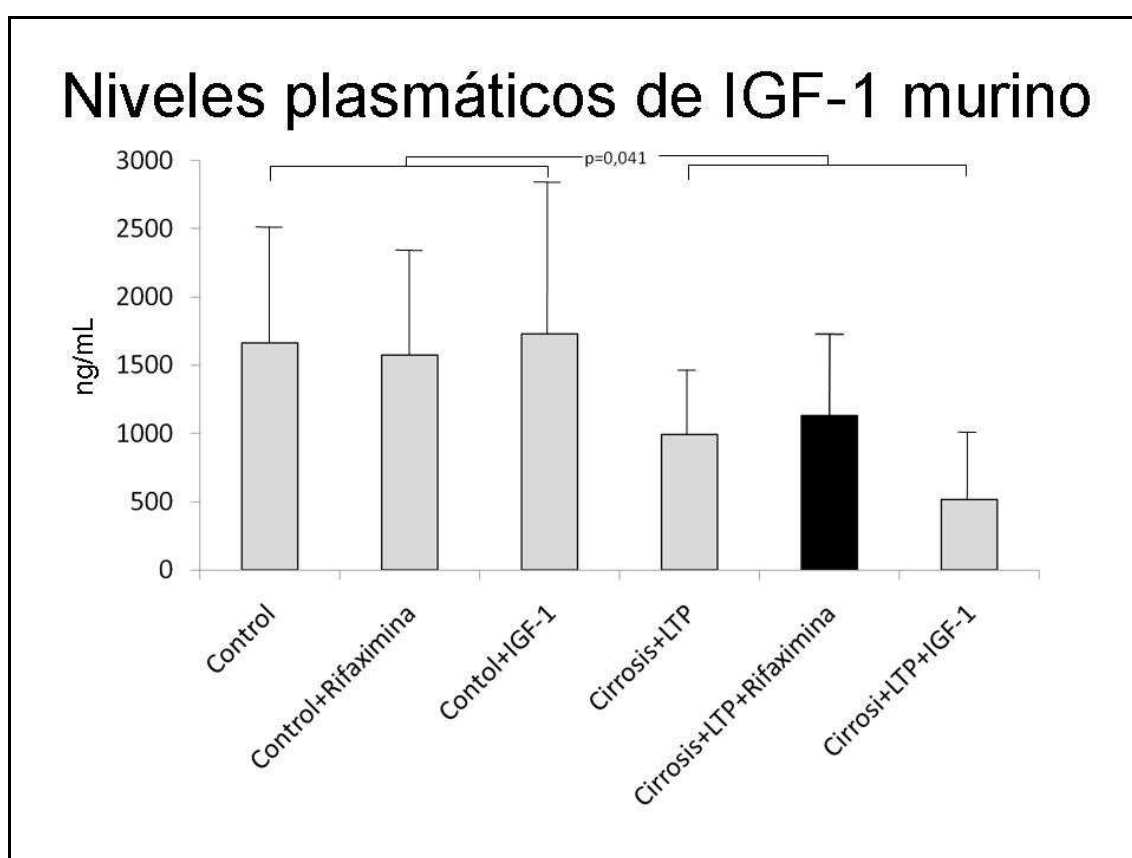


Figura 28: Niveles plasmáticos de IGF-1 murino en los distintos grupos de tratamiento.

## **2.10 Histología**

Todos los animales a los que se les trató con CCl<sub>4</sub>, independientemente del grupo de tratamiento (grupos D, E y F), presentaron criterios de cirrosis con presencia de nódulos de regeneración (F4) en la histología hepática. Respecto a los animales controles (grupos A, B y C) todas las muestras hepáticas presentaron un hígado de aspecto normal (F0 de la clasificación de Scheuer).

Se observó astrocitosis Alzheimer tipo II en casi la mitad de los animales con cirrosis y ascitis, independientemente de si recibieron tratamiento (rifaximina o IGF1) o no.

---

## **DISCUSIÓN**

En la presente Tesis se propone el desarrollo de un nuevo modelo para estudiar la encefalopatía hepática (EH) (Estudio 1) mediante la combinación de dos modelos de hipertensión portal diferentes: la hipertensión portal extrahepática generada por la ligadura total de la porta y un método de hipertensión portal intrahepática mediante la inducción de cirrosis por tetracloruro de carbono (CCl<sub>4</sub>). En el segundo estudio, se ha utilizado este modelo para valorar un posible nuevo tratamiento de la EH.

## ESTUDIO 1

Hasta la fecha, la mayoría de los modelos propuestos de EH se han basado en el fallo hepático agudo. Muchos de ellos utilizan la hepatotoxicidad mediada por azoximetano<sup>204</sup>, dado que es un modelo excelente porque es dosis dependiente, genera coma hepático y, además, es económico. Se han empleado otras sustancias hepatotóxicas como paracetamol<sup>210,239</sup>, galactosamina<sup>240</sup> y tioacetamida<sup>60,205</sup>, pero con resultados más variables y, por tanto, menos reproducibles. Los modelos quirúrgicos basados en la toxicidad por hiperbilirrubinemia como la resección/ligadura<sup>241</sup> del colédoco, en la hipertensión portal generada por la ligadura de la vena porta<sup>242</sup> o en la isquemia inducida por la ligadura de la arteria hepática<sup>243</sup> son también utilizados. A pesar de esto, el modelo quirúrgico más usado es el basado en la derivación porto-sistémica como la anastomosis porto-cava<sup>202, 244</sup>. Sin embargo, en este modelo se produce una EH mínima, lo que no permite el estudio de la EH en todos sus grados (desde formas subclínicas hasta coma profundo). Por otra parte se ha de destacar que todos los modelos quirúrgicos anteriormente descritos se desarrollan sobre un hígado sano, a diferencia de lo que ocurre en la EH que acontece en la cirrosis humana. Recientemente se ha publicado un modelo de enfermedad hepática crónica inducida por la ligadura del colédoco pero, para conseguir cierto grado de EH, este modelo debe estar asociado a la administración de acetato de amonio en la dieta<sup>70</sup>.

En resumen, todos los modelos descritos anteriormente se basan en generar EH mediante un fallo hepático agudo (por toxicidad, isquemia...) o bien mediante técnicas derivativas sobre un hígado sano. Ninguno de los modelos de EH disponibles, salvo el citado anteriormente<sup>70</sup>, se realizan en un hígado con hepatopatía crónica de base. Mullen y cols<sup>199</sup> propusieron una serie de criterios para desarrollar un modelo experimental ideal para estudiar, de la forma más homogénea posible, la EH. Según estos autores, los criterios que definen la idoneidad de un modelo para conocer mejor la fisiopatología y, por ende, posibles tratamientos de la EH son, por un lado, que se asocie a una hepatopatía crónica en fase de cirrosis y, por otro lado, que incluya todos los grados posibles de EH y, como ocurre en la práctica clínica habitual, que sea reversible y no sea debida a complicaciones extrahepáticas. Además, debería desencadenarse tras una sobrecarga de nitrógeno gastrointestinal (test de sobrecarga de glutamina) y mejorar con el tratamiento estándar de la EH. Asimismo, la EH debería asociarse a un metabolismo anormal del nitrógeno y, a nivel histológico, deberían objetivarse astrocitos tipo-II de Alzheimer.

En los modelos en los que se induce cirrosis ya sea mediante ligadura biliar o toxicidad, el desarrollo de EH es mínimo<sup>245, 246</sup> y suele presentarse en estadios muy evolucionados de su hepatopatía y frecuentemente asociados a algún proceso infeccioso (PBE, bacteriemia...). Pese a todo ello, no se consiguen los diferentes grados de EH que se evidencian en los pacientes con cirrosis. Esto genera la necesidad de desarrollar un modelo nuevo que supla estas carencias.

En el modelo propuesto en el estudio 1 de la presente Tesis, la inducción de la cirrosis se realizó mediante la administración intragástrica de CCl<sub>4</sub> y fenobarbital, como inductor enzimático. Se admite que este modelo reproduce con bastante aproximación las alteraciones metabólicas, hemodinámicas y nutricionales de la cirrosis en pacientes<sup>216</sup>. Como era de esperar, la tasa de mortalidad durante el proceso de inducción de cirrosis con ascitis fue del 55 % en el grupo de cirrosis con ascitis (similar a la descrita en la bibliografía<sup>220</sup>) y algo mayor, un 67 %, en el modelo combinado (cirrosis y LTP). Ciertamente, es una mortalidad bastante alta, pero se debe tener en cuenta que la



mortalidad observada en el grupo B (ratas con ligadura total de la porta) al realizar la intervención sobre un hígado sano ya fue del 37 %. A la vista de estos resultados, cabría esperar que la mortalidad del grupo D (cirrosis con LTP) fuera más alta si tenemos en cuenta la mortalidad de cada grupo, cirrosis y LTP (B y C, respectivamente), por separado; sin embargo, la mortalidad sólo se incrementó en un 12 %. Probablemente, esto es debido a que en este grupo de animales que se intervienen cuando son pre-cirróticos (seis semanas de inducción) están desarrollando ya circulación colateral por hipertensión portal incipiente que compensa la ligadura, inicialmente parcial y posteriormente total, de la porta.

Respecto al desarrollo de ascitis, el hecho de no evidenciarse diferencias significativas respecto al tiempo de su diagnóstico, tanto si se realizó sólo cirrosis o si se combinó con la LTP, se puede explicar porque, tanto en modelos experimentales como en pacientes, la hipertensión portal presinusoidal (ligadura de la porta) habitualmente no genera ascitis, sino que esta aparece dependiendo del grado de hipertensión portal sinusoidal que genera la cirrosis. Hay que destacar que el tiempo de aparición de ascitis fue muy variable, circunstancia que ya había sido descrita previamente en el modelo de  $\text{CCl}_4$ <sup>220</sup>. En cualquier caso, en todos los animales en los que se indujo una cirrosis, se comprobó su existencia en los estudios histológicos.

En cuanto a los parámetros de la función hepática, se objetivaron niveles más altos de transaminasas en los animales de los grupos de cirrosis y cirrosis con LTP (grupos C y D, respectivamente), aunque sólo la bilirrubina fue superior en las ratas del grupo en el que se combinaron ambos modelos (grupo D). A pesar de que la albúmina plasmática estaba disminuida en los grupos C y D, sólo fue significativamente menor en el grupo D respecto a los controles y al modelo de control con LTP (grupo B), mientras que los niveles fueron menores, aunque no de forma estadísticamente significativa, respecto al modelo de cirrosis (grupo C). Otro parámetro indirecto de funcionalidad hepática es la glucemia, que en el grupo D fue menor respecto a todos los grupos, lo que sugiere una mayor insuficiencia hepática. Esta diferencia fue significativa respecto a los grupos control y control con LTP (grupos A y B, respectivamente). En los grupos con

cirrosis no se evidenciaron muchas diferencias entre sí, pero se observó una tendencia a tener mayor alteración de la función hepática que se puede atribuir, probablemente, a que la LTP genera un mayor grado de hipertensión portal (intrahepática más extrahepática).

Paradójicamente, y al contrario de lo que sucede en los pacientes cirróticos, las concentraciones plasmáticas de triglicéridos y colesterol en este modelo de cirrosis por CCl<sub>4</sub> en ratas (también en conejos), aumentaron con la progresión de la enfermedad<sup>247, 248</sup>. En nuestro estudio se evidenció un mayor incremento de los niveles plasmáticos de colesterol y triglicéridos en los grupos de ratas con cirrosis (grupos C y D).

Respecto a la función renal, el incremento de urea observado no estuvo en relación a una disfunción renal ya que los niveles de creatinina fueron normales, si no más bien a una menor capacidad de detoxificación hepática del amonio y a un menor flujo sanguíneo hepático (mayor grado de derivación porto-sistémica). Asimismo, no se puede descartar una mayor producción y absorción de la urea intestinal, en relación con el sobrecrecimiento bacteriano cecal evidenciado en el estudio 2.

En este sentido y en relación al mecanismo fisiopatológico descrito anteriormente, los niveles plasmáticos de endotoxina que se observaron en los grupos con cirrosis y cirrosis con LTP y, muy especialmente en este último, fueron más altos. Ello indica una mayor producción de endotoxinas, probablemente debido al sobrecrecimiento bacteriano, a la mayor permeabilidad de la barrera mucosa y, consiguientemente, a una mayor absorción, junto con una menor capacidad de eliminación por insuficiencia hepática, así como por el paso de las endotoxinas directamente a la circulación sistémica (a través de colaterales portosistémicas). El grado de circulación colateral se determinó de manera indirecta valorando la relación existente entre el grado de circulación sistémica (flujo sanguíneo pulmonar) y portal (flujo sanguíneo hepático).

Hasta la fecha, la cuantificación del grado de derivación porto sistémica se había realizado mediante radioactividad. Esta técnica consiste en la inyección de microesferas de látex marcadas radiactivamente en la vena mesentérica superior. Posteriormente se extraen los pulmones e hígado y se mide la radioactividad de cada órgano<sup>249</sup>. Esta metodología, al usar productos radiactivos, requiere unas instalaciones preparadas y un personal entrenado, así como unos protocolos de seguridad muy estrictos. Un método novedoso para determinar el grado de circulación portosistémica es mediante microesferas fluorescentes y es el que se ha empleado en la presente Tesis. El método es similar al usado hasta la fecha con partículas radiactivas pero, en lugar de valorar los niveles de radioactividad en tejido pulmonar y hepático, se valora la cantidad de luz, por lo que no se requieren medidas de seguridad tan estrictas, y simplifica mucho la técnica.

Como era de esperar, se observó un grado importante de derivación en el grupo de ratas con LTP, sólo muy discretamente superado por el grupo de ratas con cirrosis y LTP, porque probablemente la propia cirrosis es capaz de generar algunas colaterales antes de que se realizase la ligadura de la vena porta. A pesar de que en el grupo de cirrosis también se evidenció un cierto grado de circulación colateral, esta fue menor y mucho menos homogénea, cuando se valoró individualmente. Esta variabilidad en los resultados interindividuales en cada uno de los grupos puede ser debida por un lado, en el grupo de cirrosis, a la circulación colateral que se genera en respuesta a la hipertensión portal intrahepática, como sucede en los pacientes con cirrosis. Por otro lado, y respecto al grupo de LTP, esta variabilidad depende de como se formen las colaterales, es decir, la oclusión que se realiza es subaguda y puntual (en un único punto de la vena), por lo que las colaterales porto-portales pueden aparecer más fácilmente que si fuera una estenosis larga y es más fácil que se generen, no tan solo derivaciones porto-sistémicas, sino también derivaciones porto-portales. Otros grupos de trabajo que han utilizado como modelo de hipertensión portal extrahepática la ligadura parcial de la vena porta también han observado la existencia de variabilidad interindividual, independientemente del grado de estenosis realizado<sup>250</sup>. En los modelos que utilizan la anastomosis porto-cava término-lateral también se ha observado

variabilidad interindividual, aunque mucho menor; el grado de derivación es mucho más homogéneo y siempre superior al 95 %, pero hay que recordar que se han realizado sobre hígado sano<sup>251</sup>. La importancia de combinar los dos modelos se demuestra precisamente en el hecho de conseguir un mayor grado de derivación portosistémica, que sea más homogénea y sobre un hígado cirrótico.

Para valorar la EH no se han utilizado métodos conductuales porque los que podíamos utilizar se consideraron observador-dependiente y hubiera podido haber sesgos según el grupo de animales a valorar. Por ello, se han usado parámetros cuantificables, como los niveles de amonio plasmático y cerebral, la determinación de mioinositol y osmolitos cerebrales, el grado de edema cerebral y los cambios histopatológicos de las células astrocitarias.

Los niveles de amonio plasmáticos pueden estar aumentados en los pacientes cirróticos debido a una serie de factores: a) sobrecrecimiento bacteriano intestinal; b) alteraciones estructurales en la barrera endotelial del epitelio intestinal; c) deterioro del sistema inmune (local y sistémico); y d) malnutrición, lo que lleva a una mayor susceptibilidad a las infecciones bacterianas, como la PBE y la bacteriemia<sup>79, 252</sup>, que suelen estar causadas fundamentalmente por organismos de origen entérico<sup>224, 253</sup> como consecuencia de la translocación bacteriana.

En el estudio 1, los niveles de amoniemia basal fueron más altos en los grupos de animales con cirrosis (grupo de ratas con cirrosis y ratas con cirrosis y LTP). Sin embargo, el área bajo la curva de amonio tras la sobrecarga de glutamina fue significativamente más alta en el grupo de ratas con cirrosis y LTP (grupo D). Este parámetro es más preciso que una única determinación de amonio, ya que no tan solo valora el grado de absorción del amonio, sino también la capacidad de metabolización y excreción del mismo e, incluso, se podría llegar a correlacionar con los niveles de amonio cerebrales, que también estuvieron significativamente aumentados en el grupo de ratas con cirrosis y LTP respecto a los otros grupos.

Aunque, como se ha mencionado previamente, parece que no existe una buena correlación entre los niveles de amonio plasmático y el grado de EH<sup>254</sup>,<sup>255</sup>, se piensa que existe una relación entre ellos<sup>255</sup>. Por el contrario, ha quedado bien establecido que los niveles de glutamina en el líquido cefalorraquídeo (índice de exposición cerebral al amonio) guardan una buena relación con el grado de EH<sup>28</sup>. Por otra parte, se ha evidenciado en pacientes con cirrosis una buena correlación entre la EH y los niveles de mioinositol cerebral y otros osmolitos cerebrales, hecho que no se ha observado en pacientes con fallo hepático fulminante<sup>256</sup>. Además, la disminución de la concentración de osmolitos cerebrales es un mecanismo osmoregulador intracelular para evitar el edema cerebral<sup>256</sup>.

Otro parámetro que valora la presencia de EH es el edema cerebral de bajo grado. Los valores de edema cerebral de bajo grado fueron significativamente superiores en el modelo propuesto (ratas con cirrosis y LTP) respecto a los dos otros grupos (cirrosis o LTP), lo que concuerda con la concentración de osmolitos cerebrales detectado entre dicho grupo y los controles, cambios que ya se evidenciaron en modelos de EH descritos anteriormente<sup>50,148,257,258</sup>. La mayor concentración de glutamina observado en el grupo ratas con cirrosis y LTP respecto a las ratas control es debido a un intento de un mecanismo compensador para evitar mayor formación de edema cerebral, circunstancia también descritos en otros modelos con EH<sup>258</sup>.

Todos estos cambios metabólicos concuerdan con los cambios histopatológicos que se producen a nivel astrocitario que son conocidos como células tipo II de Alzheimer (núcleo edematoso, pálido, con cromatina periférica y nucleolo prominente). Dichas células las hemos encontrado en más de la mitad de las ratas del grupo D (grupo de ratas con cirrosis y LTP).

En resumen, este modelo experimental de EH (cirrosis y LTP) es el más fisiopatológicamente parecido a lo que se observa habitualmente en los pacientes con una cirrosis avanzada y/o con abundante circulación colateral. Ante la falta de modelos de estas características pensamos que este, por los

resultados obtenidos, es un buen modelo. Como se ha evidenciado en los resultados, el modelo con ligadura total de la porta, sin lesión del parénquima hepático, y el modelo de cirrosis inducida por CCl<sub>4</sub> no siempre producen suficiente hipertensión portal. La combinación de estos dos modelos reproduce los cambios fisiopatológicos observados en los pacientes con cirrosis. Además, este modelo cumple los criterios propuestos por Mullen y cols<sup>199</sup>. Estos criterios incluyen no solo la alteración de los parámetros de función hepática y metabólica, sino también cambios histológicos que evidencian una cirrosis.

## ESTUDIO 2

Tras establecer que el modelo óptimo para estudiar la EH parece ser aquél que combina un modelo de hipertensión portal intrahepática (cirrosis) y extrahepática (ligadura de la vena porta), en la presente Tesis se ha llevado a cabo este segundo estudio para evaluar la posible eficacia de un tratamiento nuevo para la EH, IGF-1 frente a rifaximina, un tratamiento ya establecido en humanos, pero no evaluado en ratas cirróticas con ascitis.

Como era de esperar, la mortalidad de las ratas incluidas en este estudio fue parecida a la observada en el estudio 1 hasta la obtención del modelo (cirrosis descompensada y LTP). Posteriormente, no existieron diferencias significativas en la mortalidad entre un grupo de tratamiento u otro, aunque fue menor respecto a las ratas cirróticas descompensadas que no habían recibido ningún tipo de tratamiento (grupo D). Esta discreta diferencia quizá pueda explicarse por el hecho de que ambos tratamientos, consiguieron mejorar, en mayor o menor grado, las posibles complicaciones que conlleva la cirrosis evolucionada, como las infecciones<sup>218, 259</sup>, entre otras.

Hemos confirmado la reproducibilidad del modelo propuesto en esta Tesis puesto que los resultados que objetivan la presencia de cirrosis (insuficiencia hepática, necroinflamación, hipertensión portal y nódulos de regeneración) así

como los que confirman la EH (niveles plasmáticos y cerebrales de amonio, edema de bajo grado y cambios histológicos astrocitarios) han sido similares en el grupo D del primer estudio y en el mismo grupo del segundo estudio (ratas con cirrosis y LTP).

La elección de IGF-1 se basó en el intento de aportar una nueva terapia para el tratamiento de la EH, teniendo en cuenta que las concentraciones plasmáticas de este factor de crecimiento están disminuidas en caso de hepatopatía crónica avanzada por deficiente síntesis hepática<sup>260,261</sup>. Aunque no se han evidenciado niveles bajos de IGF-1 en la cirrosis compensada<sup>172</sup> se ha objetivado que la administración exógena de bajas dosis de IGF-1 (2 µg/ 100 g/12 h) se acompaña de efectos beneficiosos<sup>169, 172, 262, 263</sup>.

En estudios previos, a nivel experimental, se ha evidenciado que los efectos beneficiosos se producen tanto con tratamientos de 5 días como de 14 días de duración<sup>165,172, 264</sup>. Estos beneficios se han observado en el estado nutricional, la absorción de azúcares<sup>169</sup>, el hipogonadismo asociado a la cirrosis<sup>196</sup> e, incluso, en la osteopenia<sup>178</sup>. Además, se ha evidenciado una mejoría de la función hepática y un efecto antioxidante en el hígado con estas mismas dosis de IGF-1 administradas durante 14 y 21 días<sup>262</sup>. En un estudio realizado en pacientes con cirrosis alcohólica, se evidenció que tras la administración de IGF-1 durante 4 meses, los niveles de albúmina plasmática mejoraron e incluso se detectó una tendencia a la mejoría del metabolismo energético<sup>265</sup>.

En estudios realizados con dosis más altas de IGF-1 (6-8 µg/ 100 g/12 h) los efectos obtenidos, a pesar de ser beneficiosos para el tratamiento de la osteopenia en las mujeres postmenopáusicas, inducen la aparición de efectos secundarios<sup>266</sup>, principalmente hipotensión arterial y cefaleas. No obstante, estos efectos adversos disminuyen cuando las dosis empleadas son menores (3 µg/ 100 g/12 h) persistiendo los efectos de estimulación del recambio celular óseo<sup>266</sup>. Además, hay que señalar que el uso de dosis elevadas de IGF-1 puede comportar un riesgo de desarrollar un proceso oncogénico. Aunque los datos publicados al respecto no son definitivos, se ha evidenciado una correlación positiva entre los niveles de IGF-1 plasmáticos y el desarrollo de

algunos tipos de cáncer<sup>163</sup>. En este estudio de la presente Tesis, no se han evidenciado efectos secundarios (presencia de neoplasia) debido a que las dosis empleadas de IGF-1 para suplir el déficit de síntesis hepática fueron bajas.

Ante las evidencias científicas de los posibles efectos beneficiosos del IGF-1 tanto desde el punto de vista nutricional, como metabólico, anabólico, hormonal y antifibrogénico, pensamos que podría ser un buen tratamiento para la EH. La hipótesis postulada fue que al mejorar la función hepática, mejoraría la disfuncionalidad de la barrera intestinal (evitando así la translocación bacteriana) e, incluso, podría disminuir la permeabilidad de la barrera hematoencefálica evitando el paso de sustancias neurotóxicas como el amonio, los cambios histopatológicos de los astrocitos y los cambios funcionales, como la disminución del mioinositol y la alteración del resto de osmolitos cerebrales. La dosis escogida para la administración de IGF-1 fue baja (2 µg/100 g/12 h) porque, como ya se ha demostrado, se alcanzan niveles terapéuticos con apenas efectos secundarios.

Para evaluar los efectos de IGF-1 en la EH se escogió como control la rifaximina. Ello fue debido, por una parte, porque es un tratamiento utilizado en la práctica clínica diaria para tratar esta patología<sup>267</sup> y, por otra parte, no hay estudios que valoren la efectividad de la rifaximina en la EH experimental. El motivo por el que rifaximina es usada en la práctica clínica habitual para tratar la EH se debe a que los pacientes con cirrosis pueden presentar sobrecrecimiento bacteriano<sup>268</sup>, habiéndose demostrado a nivel experimental que esto facilita la translocación bacteriana<sup>238</sup>. Probablemente, al evitar el sobrecrecimiento bacteriano intestinal se produzca una menor cantidad de endotoxinas, así como de productos derivados del metabolismo bacteriano con actividad análoga al de las benzodiazepinas y urea que, al ser absorbidos, se transformen en amonio.



Los niveles de IGF-1 endógenos fueron significativamente menores en todos los animales cirróticos con LTP en comparación con las ratas de los grupos control como consecuencia de la insuficiencia hepática avanzada que presentaban estos animales. Aunque no se evidenciaron diferencias significativas entre los grupos cirróticos, se observaron niveles más bajos en el grupo de animales cirróticos con LTP tratados con IGF-1 probablemente debido a que la administración de IGF-1 humano inhibe la producción endógena del mismo. El hecho de que no se detectaran niveles de IGF-1 humano transcurrida una  $t_{1/2}$  probablemente se deba a que existe una mayor metabolización de lo que es habitual en este fármaco. Este incremento puede ser debido a la inducción enzimática producida por el fenobarbital que se administró a las ratas desde que se inició el tratamiento con  $\text{CCl}_4$  para desarrollar cirrosis.

La administración de rifaximina e IGF-1 en los grupo de ratas controles no provocó ningún cambio en los parámetros de función y de necroinflamación hepática. Asimismo, no se evidenciaron efectos tóxicos sobre el organismo. En cuanto a los grupos de ratas con cirrosis y LTP (grupos D, E y F) se evidenció globalmente que el grupo tratado con rifaximina (grupo E) presentó una mejoría de la función hepática (niveles de transaminasas, bilirrubina, glucosa) respecto a los otros dos grupos con cirrosis (grupo D y F). Posiblemente esta mejoría esté en relación a una menor presencia de endotoxinas plasmáticas.

De hecho, los niveles de endotoxemia fueron significativamente superiores en el grupo de ratas con cirrosis y LTP respecto a las ratas control y control tratadas con rifaximina (grupos B y C, respectivamente). Por el contrario, tanto las ratas cirróticas tratadas con rifaximina como las tratadas con IGF-1 (grupos E y F, respectivamente) mostraron unos niveles de endotoxina plasmática parecidos a las ratas control sanas (grupo A). Diversos estudios han demostrado que los lipopolisacáridos (endotoxinas), así como la presencia de ADN bacteriano<sup>269</sup> son capaces de activar las células de Kupffer e inducir la producción de citoquinas proinflamatorias, profibróticas, prostaglandinas y radicales libres de oxígeno<sup>270</sup>. Estos productos son hepatotóxicos y, además, provocan la invasión del hígado por parte de neutrófilos citotóxicos. Toda esta

cascada de productos pro-inflamatorios genera mayor vasoconstricción sistémica, mayor vasodilatación esplácnica y, por tanto, mayor hipertensión portal conllevando menor flujo hepático con el consiguiente empeoramiento de la función hepática<sup>270</sup>.

El hecho que los niveles de endotoxemia sean menores en los grupos de ratas con cirrosis y LTP con tratamiento se debe a los distintos mecanismos de acción de los distintos tratamientos. El tratamiento con rifaximina se acompañó de una disminución del sobrecrecimiento bacteriano intestinal, tal y como se evidencia en los cultivos realizados del contenido cecal, donde los recuentos de unidades formadoras de colonias se redujo prácticamente a la mitad respecto a las ratas control y respecto a los grupos de ratas con cirrosis y LTP con tratamiento con IGF-1 o sin tratamiento (grupos F y E, respectivamente) presentaron una reducción de casi cinco veces, es decir, se formaron sólo un 20 % de unidades formadoras de colonias.

Por el contrario, la reducción de los niveles plasmáticos de endotoxina en el grupo de ratas con cirrosis y LTP tratadas con IGF-1 no fue debido a una disminución del contenido bacteriano cecal, si no que probablemente sea por una mejoría de la permeabilidad intestinal, secundaria a la mejoría de las uniones intercelulares del intestino (tight-junctions). Esto dificultaría la translocación bacteriana<sup>165</sup>, y reduciría la absorción de las endotoxinas<sup>194, 263</sup>. De hecho, casi la mitad de los animales de este grupo presentaron sobrecrecimiento bacteriano de forma similar al grupo de ratas con cirrosis y LTP (grupo D).

Asimismo, la mayor concentración de amonio que se observó en los grupos de ratas con cirrosis y LTP y cirrosis y LTP tratadas con IGF-1 se puede explicar no tan sólo por el sobrecrecimiento bacteriano, si no también por su menor capacidad de eliminación, tal y como se demuestra en el área bajo la curva obtenida tras la sobrecarga de amonio. En cambio, en el grupo de ratas con cirrosis y LTP que recibió tratamiento con rifaximina, hubo una menor producción de amonio como consecuencia de una menor concentración de bacterias, tal y como se ha mencionado anteriormente, y también por la

selección, debido al tratamiento antibiótico, de las bacterias intestinales que son menos productoras de amonio. Por tanto, se produce una menor absorción de esta sustancia, lo que comporta una menor metabolización.

A pesar que los niveles de amonio plasmático fueron más altos en el grupo de ratas con cirrosis y LTP tratadas con IGF-1 (grupo F), no se observaron niveles de amonio cerebral tan elevados como en los animales con cirrosis y LTP (grupo D). De hecho los valores no fueron significativamente distintos de los observados en los grupos de ratas control (A, B, C). Esto probablemente sea debido a una menor permeabilidad de la barrera hematoencefálica que impide el paso de sustancias neurotóxicas como el amonio. Respecto al grupo de ratas con cirrosis y LTP tratadas con rifaximina (grupo E) que presentó valores similares al grupo F, es poco probable que sea debido a una mejoría de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica, aunque no se puede descartar que una menor activación de la cascada de citoquinas proinflamatorias facilite la correcta funcionalidad de la misma<sup>68</sup>. Por otro lado, hay que tener en cuenta que en este grupo la concentración de amonio plasmático fue menor que en el resto de grupos de ratas con cirrosis y LTP (grupo D y F), como ya hemos mencionado.

Los cambios histopatológicos observados en las muestras cerebrales de los grupos de ratas con cirrosis y LTP fueron muy parecidos entre sí. El hecho de no evidenciar diferencias importantes entre grupos sugiere que los tratamientos aplicados mejoran, al menos parcialmente, la función cerebral pero no consiguen una mejoría histológica. No puede descartarse, sin embargo, que la duración del tratamiento sea insuficiente para poder observar cambios histológicos.

Todos los animales a los que se les trató con CCl<sub>4</sub> independientemente del grupo de tratamiento (grupos D, E y F) presentaron criterios de cirrosis (F4) en la histología hepática. Respecto a los animales controles (grupos A, B y C) todas las muestras hepáticas presentaban un hígado de aspecto normal (F0 de la clasificación de Scheuer). En cuanto al grupo de cirrosis con LTP tratado con rifaximina (grupo E), en el que se evidenció mejoría de los parámetros de

función hepática no se tradujo en una mejoría de la histología hepática. No se evidenció mejoría del grado de fibrosis en el grupo tratado con IGF-1 a pesar que están bien establecidos los efectos antifibrogénicos del IGF-1 tanto a nivel experimental como en humanos<sup>163, 262</sup> así como algunas de las complicaciones extrahepáticas secundarias a la cirrosis<sup>163,193,271</sup>. Esta ausencia de mejoría histológica, en nuestro estudio, quizás se pueda atribuir a que las dosis administradas de IGF-1 fueron bajas.

A pesar de que las concentraciones plasmáticas alcanzadas de IGF-1 humano probablemente fueran bajas, dado que no se detectaron transcurrida una  $t_{1/2}$ , se han observado algunos efectos terapéuticos atribuibles a este tratamiento, como, por ejemplo, la menor concentración de endotoxinas plasmáticas a pesar del sobrecrecimiento bacteriano. También pudo producirse una menor permeabilidad de la barrera hematoencefálica, lo que disminuiría el paso de las sustancias neurotóxicas a través de la misma. Por este motivo probablemente los niveles de amonio y agua cerebral fueron menores en este grupo de animales.

Posiblemente una de las causas de este resultado estribe en que la dosis de IGF-1 haya resultado subterapéutica debido probablemente a la inducción enzimática por fenobarbital. Esto nos lleva a pensar que probablemente se tendría que aumentar la frecuencia de administración más que aumentar la dosis en cada administración para conseguir niveles terapéuticos más estables (evitando así picos plasmáticos) o, incluso, tratamiento en perfusión continua. Otro factor a tener en cuenta es la duración del tratamiento y que 14 días de tratamiento no fueran suficientes para evidenciar cambios histológicos en animales con una cirrosis tan evolucionada. Por tanto, no hemos podido demostrar que se obtengan mejores resultados en el tratamiento de la EH con IGF-1 en comparación con el tratamiento con rifaximina.

En cambio, hemos confirmado que rifaximina es un buen tratamiento de la EH ya que ha mejorado no sólo diversos parámetros bioquímicos como la función hepática, o de necroinflamación sino que también disminuye el riesgo de desarrollar EH por el riesgo de infecciones (menores niveles de endotoxina y

probablemente de translocación bacteriana) y principalmente por sobrecarga de amonio. Esto confirma que el amonio juega un papel muy importante en la EH, pero no descarta que otras sustancias que se absorben al mismo tiempo también puedan ser importantes.

Finalmente, tras realizar este trabajo podemos afirmar que la rifaximina es un buen tratamiento para la EH experimental aunque, sería aconsejable realizar estudios a largo plazo en pacientes con cirrosis y EH para evaluar su efectividad y seguridad. Respecto al tratamiento con IGF-1 parece que no es un tratamiento efectivo para la EH, al menos a las dosis empleadas. Se habría de valorar, quizás, la posibilidad de realizar un tratamiento con IGF-1 en perfusión continua y/o una mayor duración del mismo.

# CONCLUSIONES

---

De los resultados obtenidos en los estudios experimentales recogidos en esta Tesis Doctoral, se pueden deducir las siguientes conclusiones:

## Estudio 1

- El modelo experimental con ratas con cirrosis descompensada por CCl<sub>4</sub> y ligadura total de la vena porta es un buen modelo para estudiar la encefalopatía hepática.
- El uso de microesferas fluorescentes permite valorar el grado de derivación porto-sistémica y evita el uso de métodos radiactivos.
- El estudio de la encefalopatía hepática se ha realizado mediante parámetros objetivos como: concentración de osmolitos cerebrales, niveles de amonio plasmático y cerebral tras sobrecarga oral de glutamina y cambios histopatológicos astrocitarios. Los resultados obtenidos cumplen los criterios (analíticos e histológicos) diagnósticos de encefalopatía hepática.
- Se ha evidenciado una relación entre el grado de cirrosis, la derivación portosistémica y el nivel de amoniemia
- Este modelo permitirá la búsqueda de nuevas dianas en la encefalopatía hepática y el desarrollo de diferentes opciones de tratamiento.

## Estudio 2

- Se confirman los hallazgos obtenidos en el estudio 1, por lo que, se demuestra que es un modelo reproducible pues cumple los criterios de Mullen.
- La administración de dosis bajas de IGF-1 no es una buena opción para el tratamiento de la EH, pues aunque mejora los parámetros analíticos e histológicos respecto al grupo de ratas cirróticas sin tratamiento, no es capaz de revertir las manifestaciones características de la encefalopatía hepática, por lo que no es superior a la rifaximina.
- La rifaximina es un buen tratamiento para la encefalopatía hepática experimental.



## **BIBLIOGRAFÍA**

---

1. Blei AT. Encefalopatía hepática. In: Rodes J, Benhamou JP, Bircher J, Mcintyre N, Rizzetto M, editors. Tratado de Hepatología Clínica. segunda ed. Masson, S.A.; 2001 p. 855-876.
2. Riordan SM, Williams R. Treatment of hepatic encephalopathy. *N Engl J Med* 1997; 337:473-479.
3. Pugh RN, Murray-Lyon IM, Dawson JL, Pietroni MC, Williams R. Transection of the oesophagus for bleeding oesophageal varices. *Br J Surg* 1973; 60(8):646-649.
4. Blei AT, Cordoba J. Hepatic Encephalopathy. *Am J Gastroenterol* 2001 Jul ;96 (7 ):1968 -76 2001; 96:1968-1976.
5. Atterbury CE MWCH. Neomycin-sorbitol and lactulose in the treatment of acute portal-systemic encephalopathy. A controlled, double-blind clinical trial. *Am J Dig Dis* 1978;23:398-406 . 1976. Ref Type: Abstract
6. Ferenci P, Lockwood A, Mullen K, Tarter R, Weissenborn K, Blei AT. Hepatic encephalopathy--definition, nomenclature, diagnosis, and quantification: final report of the working party at the 11th World Congresses of Gastroenterology, Vienna, 1998. *Hepatology* 2002; 35(3):716-721.
7. Blei AT, Cho JR. Brain Edema in Acute Liver-Failure - Insight from Experimental Studies. *Revista de Investigacion Clinica* 1990; 42:127-130.
8. Jalan R, Seery JP, Taylor-Robinson SD. Review article: pathogenesis and treatment of chronic hepatic encephalopathy. *Aliment Pharmacol Ther* 1996; 10(5):681-697.
9. Dbouk N, McGuire BM. Hepatic encephalopathy: a review of its pathophysiology and treatment. *Curr Treat Options Gastroenterol* 2006; 9(6):464-474.
10. Phillips G, Schwartz R, Gabuzda G, Davidson CS. The Syndrome of Impending Hepatic Coma in Patients with Cirrhosis of the Liver Given Certain Nitrogenous Substances. . *New England Journal of Medicine* 1952; 247(7):239-246.
11. Weber FL, Fresard KM, Lally BR. Effects of Lactulose and Neomycin on Urea Metabolism in Cirrhotic Subjects. *Gastroenterology* 1982; 82(2):213-217.
12. Conn HO. Hepatic encephalopathy. Syndromes and therapies. In: Conn HO BJ, editor. *The hepatic encephalopathies*. Bloomington, IL: Medi-Ed Press, 1994 p. 1-12.
13. Cooper A, Plum F. Biochemistry and Physiology of Brain Ammonia. *Physiological Reviews* 1987; 67(2):440-519.

14. Tannenbaum SR, Fett D, Young VR, Land PD, Bruce WR. Nitrite and nitrate are formed by endogenous synthesis in the human intestine. *Science* 1978; 200(4349):1487-1489.
15. Cooper AJ. Ammonia metabolism in mammals: interorgan relationships. In: Grisolia SFV, editor. *Cirrosis, Hyperammonemia and Hepatic Encephalopathy*. New York: 1994.
16. Romero-Gomez M, Ramos-Guerrero R, Grande L et al. Intestinal glutaminase activity is increased in liver cirrhosis and correlates with minimal hepatic encephalopathy. *J Hepatol* 2004; 41(1):49-54.
17. Hawkins RA, Jessy J, Mans AM, Chedid A, DeJoseph MR. Neomycin reduces the intestinal production of ammonia from glutamine. In: Felipo V, Grisolia S, editors. *Hepatic encephalopathy, hyperammonemia and ammonia toxicity*. New York: Plenum; 1994 p. 125-134.
18. Masini A, Efrati C, Merli M et al. Effect of lactitol on blood ammonia response to oral glutamine challenge in cirrhotic patients: evidence for an effect of nonabsorbable disaccharides on small intestine ammonia generation. *Am J Gastroenterol* 1999; 94:3323-3327.
19. Opong 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; 26:870-876.
20. 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 Nov ;36 (5):1163 -71 2002; 36:1163-1171.
21. Corvera S, Garcia-Sainz JA. Hormonal stimulation of mitochondrial glutaminase. Effects of vasopressin, angiotensin II, adrenaline and glucagon. *Biochem J* 1983; 210(3):957-960.
22. Marco J, Diego J, Villanueva ML, az-Fierros M, Valverde I, Segovia JM. Elevated plasma glucagon levels in cirrhosis of the liver. *N Engl J Med* 1973; 289(21):1107-1111.
23. McCauley R, Kong SE, Heel K, Hall JC. The role of glutaminase in the small intestine. *Int J Biochem Cell Biol* 1999; 31(3-4):405-413.
24. Nomura F, Ohnishi K, Terabayashi H et al. Effect of intrahepatic portal-systemic shunting on hepatic ammonia extraction in patients with cirrhosis. *Hepatology* 1994; 20(6):1478-1481.
25. Damink SWMO, Jalan R, Deutz NEP et al. The kidney plays a major role in the hyperammonemia seen after simulated or actual GI bleeding in patients with cirrhosis. *Hepatology* 2003; 37(6):1277-1285.

26. Lockwood AH, McDonald JM, Reiman RE et al. The dynamics of ammonia metabolism in man. Effects of liver disease and hyperammonemia. *J Clin Invest* 1979; 63(3):449-460.
27. Cordoba J. Understanding the mechanisms of cerebral complications in fulminant hepatic failure: fluxes better than levels. *J Hepatol* 2002; 37(6):878-879.
28. Watanabe A, Takei N, Higashi T et al. Glutamic acid and glutamine levels in serum and cerebrospinal fluid in hepatic encephalopathy. *Biochem Med* 1984; 32:225-231.
29. Lai JC, Cooper AJ. Brain alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex: kinetic properties, regional distribution, and effects of inhibitors. *J Neurochem* 1986; 47:1376-1386.
30. Pappas SC, Ferenci P, Schafer DF, Jones EA. Visual evoked potentials in a rabbit model of hepatic encephalopathy. II. Comparison of hyperammonemic encephalopathy, postictal coma, and coma induced by synergistic neurotoxins. *Gastroenterology* 1984; 86:546-551.
31. Basile AS, Jones EA. Ammonia and GABA-ergic neurotransmission: interrelated factors in the pathogenesis of hepatic encephalopathy. *Hepatology* 1997; 25:1303-1305.
32. Butterworth RF. Portal-systemic encephalopathy: a disorder of neuron-astrocytic metabolic trafficking. *Dev Neurosci* 1993; 15:313-319.
33. Ha JH, Basile AS. Modulation of ligand binding to components of the GABAA receptor complex by ammonia: implications for the pathogenesis of hyperammonemic syndromes. *Brain Res* 1996; 720:35-44.
34. AMPOLA M.G. UREA CYCLE ENZYMATIC ABNORMALITIES. 45 ed. 1963 p. 182-188.
35. Costa E, Guidotti A. Endogenous ligands for benzodiazepine recognition sites. *Biochem Pharmacol* 1985; 34:3399-3403.
36. Marquardt H, Todaro GJ, Shoyab M. Complete amino acid sequences of bovine and human endozepines. Homology with rat diazepam binding inhibitor. *J Biol Chem* 1986; 261:9727-9731.
37. Goulenok C, Bernard B, Cadranel JF et al. Flumazenil vs. placebo in hepatic encephalopathy in patients with cirrhosis: a meta-analysis. *Aliment Pharmacol Ther* 2002 Mar ;16 (3):361 -72 2002; 16:361-372.
38. Butterworth RF. Complications of cirrhosis III. Hepatic encephalopathy. *J Hepatol* 2000 ;32 (1 Suppl):171 -80 2000; 32:171-180.
39. Krieger D, Krieger S, Jansen O, Gass P, Theilmann L, Lichtnecker H. Manganese and chronic hepatic encephalopathy. *Lancet* 1995; 346:270-274.

40. Papavasiliou PS, Miller ST, Cotzias GC. Role of liver in regulating distribution and excretion of manganese. *Am J Physiol* 1966; 211:211-216.
41. Cordoba J, Sanpedro F, Alonso J, Rovira A. <sup>1</sup>H magnetic resonance in the study of hepatic encephalopathy in humans. *Metab Brain Dis* 2002 Dec ;17(4):415 -29 2002; 17:415-429.
42. Rose C, Butterworth RF, Zayed J et al. Manganese deposition in basal ganglia structures results from both portal-systemic shunting and liver dysfunction. *Gastroenterology* 1999; 117:640-644.
43. Pomier-Layrargues G, Spahr L, Butterworth RF. Increased manganese concentrations in pallidum of cirrhotic patients. *Lancet* 1995; 345:735.
44. Butterworth RF, Spahr L, Fontaine S, Layrargues GP. Manganese toxicity, dopaminergic dysfunction and hepatic encephalopathy. *Metab Brain Dis* 1995; 10:259-267.
45. Spahr L, Butterworth RF, Fontaine S et al. Increased blood manganese in cirrhotic patients: relationship to pallidal magnetic resonance signal hyperintensity and neurological symptoms. *Hepatology* 1996; 24:1116-1120.
46. Kimelberg HK, Jalonen T, Walz W. Regulation of the brain microenvironment: transmitters and ions. In: Murphy S, editor. *Astrocytes: pharmacology and function*. San Diego: Academic Press; 1993 p. 193-228.
47. Poo J.L GSUM. Encefalopatía Hepática. In: Berenguer J, Berenguer M, Ponce J, Prieto M, Sala T, editors. *Gastroenterología y Hepatología*. Tercera ed. Madrid: Elsevier Science; 2002 p. 789-803.
48. Martin H, Voss K, Hufnagl P, Wack R, Wassilew G. Morphometric and densitometric investigations of protoplasmic astrocytes and neurons in human hepatic encephalopathy. *Exp Pathol* 1987; 32:241-250.
49. Noremborg MD. Astrocytes in hepatic encephalopathy. In: Grisolia S FVMM, editor. *Cirrosis, hepatic encephalopathy and ammonium toxicity*. Nueva Cork: Plenum Press; 1990 p. 81-97.
50. Haussinger D, Kircheis G, Fischer R, Schliess F, vom DS. Hepatic encephalopathy in chronic liver disease: a clinical manifestation of astrocyte swelling and low-grade cerebral edema? *J Hepatol* 2000 Jun ;32 (6 ):1035 -8 2000; 32:1035-1038.
51. McManus ML, Churchwell KB, Strange K. Mechanisms of disease - Regulation of cell volume in health and disease. *N Engl J Med* 1995; 333:1260-1266.

52. Ross BD, Jacobson S, Villamil F et al. Subclinical hepatic encephalopathy: proton MR spectroscopic abnormalities. *Radiology* 1994; 193:457-463.
53. Cordoba J, Alonso J, Rovira A et al. The development of low-grade cerebral edema in cirrhosis is supported by the evolution of (1)H-magnetic resonance abnormalities after liver transplantation. *J Hepatol* 2001 Nov ;35 (5):598 -604 2001; 35:598-604.
54. Rovira A, Cordoba J, Raguer N, Alonso J. Magnetic resonance imaging measurement of brain edema in patients with liver disease: resolution after transplantation. *Curr Opin Neurol* 2002 Dec ;15 (6 ):731 -7 2002; 15:731-737.
55. Cordoba J, Raguer N, Flavia M et al. T2 hyperintensity along the cortico-spinal tract in cirrhosis relates to functional abnormalities. *Hepatology* 2003 Oct ;38 (4):1026 -33 2003; 38:1026-1033.
56. Fuentes JA, Ruiz-Gayo M. Introducción a la farmacología del sistema nervioso central. Neurotransmisores y receptores. In: Lorenzo P, Moreno A, Leza JC, Lizasoain I, Moro MA, editors. *Farmacología Básica y Clínica*. 17 ed. Madrid: Editorial Medica Panamericana; 2004 p. 193-215.
57. Lavoie J, Giguere JF, Layrargues GP, Butterworth RF. Amino acid changes in autopsied brain tissue from cirrhotic patients with hepatic encephalopathy. *J Neurochem* 1987; 49:692-697.
58. Gonzalez-Abraldes J, Mas A. Encefalopatía hepática. patogenia y formas clínicas. *Medicine* 2000; 08:508-515.
59. Stephenson FA. Understanding the GABAA receptor: a chemically gated ion channel. *Biochem J* 1988; 249:21-32.
60. Zimmermann C, Ferenci P, Pifl C et al. Hepatic encephalopathy in thioacetamide-induced acute liver failure in rats: characterization of an improved model and study of amino acid-ergic neurotransmission. *Hepatology* 1989; 9(4):594-601.
61. Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Moore PK. Otros mediadores periféricos:5-hidroxitriptamina y purinas. In: Rang H.P DMMRJMMPK, editor. *Farmacología*. 5ª ed. Elsevier; 2004 p. 184-197.
62. Rang H.P., Dale MM, Ritter JM, Moore PK. Otros transmisores y moduladores. In: Rang H.P DMMRJMMPK, editor. *Farmacología*. 5ª ed. Elsevier; 2004 p. 474-489.
63. Butterworth RF. Neuronal cell death in hepatic encephalopathy. *Metab Brain Dis* 2007; 22(3-4):309-320.
64. Weissenborn K, Bokemeyer M, Krause J, Ennen J, Ahl B. Neurological and neuropsychiatric syndromes associated with liver disease. *AIDS* 2005; 19 Suppl 3:S93-S98.

65. Weissenborn K, Krause J, Bokemeyer M et al. Hepatitis C virus infection affects the brain-evidence from psychometric studies and magnetic resonance spectroscopy. *J Hepatol* 2004; 41(5):845-851.
66. Forton DM, Allsop JM, Main J, Foster GR, Thomas HC, Taylor-Robinson SD. Evidence for a cerebral effect of the hepatitis C virus. *Lancet* 2001; 358(9275):38-39.
67. Hilsabeck RC, Perry W, Hassanein TI. Neuropsychological impairment in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 2002; 35(2):440-446.
68. Stamatovic SM, Dimitrijevic OB, Keep RF, Andjelkovic AV. Inflammation and brain edema: new insights into the role of chemokines and their receptors. *Acta Neurochir Suppl* 2006; 96:444-450.
69. Schliess F, Gorg B, Haussinger D. Pathogenetic interplay between osmotic and oxidative stress: the hepatic encephalopathy paradigm. *Biol Chem* 2006; 387(10-11):1363-1370.
70. Jover R, Rodrigo R, Felipo V et al. Brain edema and inflammatory activation in bile duct ligated rats with diet-induced hyperammonemia: A model of hepatic encephalopathy in cirrhosis. *Hepatology* 2006; 43(6):1257-1266.
71. Llansola M, Rodrigo R, Monfort P et al. NMDA receptors in hyperammonemia and hepatic encephalopathy. *Metab Brain Dis* 2007; 22(3-4):321-335.
72. Felipo V. Contribution of altered signal transduction associated to glutamate receptors in brain to the neurological alterations of hepatic encephalopathy. *World J Gastroenterol* 2006; 12(48):7737-7743.
73. Rodrigo R, Erceg S, Rodriguez-Diaz J et al. Glutamate-induced activation of nitric oxide synthase is impaired in cerebral cortex in vivo in rats with chronic liver failure. *J Neurochem* 2007; 102(1):51-64.
74. Maejima K, Deitch E, Berg R. Promotion by burn stress of the translocation of bacteria from the gastrointestinal tracts of mice. *Arch Surg* 1984; 119(2):166-172.
75. Wells CL, Maddaus MA, Simmons RL. Proposed mechanisms for the translocation of the intestinal bacteria. *Rev Infect Dis* 1988; 10(5):958-979.
76. Rabinovitz M, Gavalier JS, Kumar S, Kajani M, Van Thiel DH. Role of serum complement, immunoglobulins, and cell-mediated immune system in the pathogenesis of spontaneous bacterial peritonitis (SBP). *Dig Dis Sci* 1989; 34(10):1547-1552.
77. Hoefs JC, Runyon BA. Spontaneous bacterial peritonitis. *Dis Mon* 1985; 31(9):1-48.

78. Runyon BA. Patients with deficient ascitic fluid opsonic activity are predisposed to spontaneous bacterial peritonitis. *Hepatology* 1988; 8(3):632-635.
79. Rimola A, Soto R, Bory F, Arroyo V, Piera C, Rodes J. Reticuloendothelial system phagocytic activity in cirrhosis and its relation to bacterial infections and prognosis. *Hepatology* 1984; 4(1):53-58.
80. RUTENBURG AM, SONNENBLICK E, KOVEN I, SCHWEINBURG F, FINE J. Comparative response of normal and cirrhotic rats to intravenously injected bacteria. *Proc Soc Exp Biol Med* 1959; 101(2):279-281.
81. Groszmann RJ, Kravetz D, Parysow O. Intrahepatic arteriovenous shunting in cirrhosis of the liver. *Gastroenterology* 1977; 73(1):201-204.
82. Huet PM, Chartrand R, Marleau D. Extrahepatic uptake of <sup>99m</sup>Tc-phytate: its mechanism and significance in chronic liver disease. *Gastroenterology* 1980; 78(1):76-80.
83. Gomez F, Ruiz P, Schreiber AD. Impaired function of macrophage Fc gamma receptors and bacterial infection in alcoholic cirrhosis. *N Engl J Med* 1994; 331(17):1122-1128.
84. Bolognesi M, Merkel C, Bianco S et al. Clinical significance of the evaluation of hepatic reticuloendothelial removal capacity in patients with cirrhosis. *Hepatology* 1994; 19(3):628-634.
85. Brayton RG, Stokes PE, Schwartz MS, Louria DB. Effect of alcohol and various diseases on leukocyte mobilization, phagocytosis and intracellular bacterial killing. *N Engl J Med* 1970; 282(3):123-128.
86. Rimola A, Bory F, Planas R. Infecciones bacterianas en la cirrosis hepática. *gastroenterol hepatol* 1981; 4:453-458.
87. Zetterman RK, Sorrell MF. Immunologic aspects of alcoholic liver disease. *Gastroenterology* 1981; 81(3):616-624.
88. Fierer J, Finley F. Deficient serum bactericidal activity against *Escherichia coli* in patients with cirrhosis of the liver. *J Clin Invest* 1979; 63(5):912-921.
89. Naveau S, Poynard T, Abella A et al. Prognostic value of serum fibronectin concentration in alcoholic cirrhotic patients. *Hepatology* 1985; 5(5):819-823.
90. Akalin HE, Laleli Y, Telatar H. Bactericidal and opsonic activity of ascitic fluid from cirrhotic and noncirrhotic patients. *J Infect Dis* 1983; 147(6):1011-1017.
91. Rabinovitz M, Gavalier JS, Kumar S, Kajani M, Van Thiel DH. Role of serum complement, immunoglobulins, and cell-mediated immune system



- in the pathogenesis of spontaneous bacterial peritonitis (SBP). *Dig Dis Sci* 1989; 34(10):1547-1552.
92. Lebrun L, Pelletier G, Briantais MJ, Galanaud P, Etienne JP. Impaired functions of normal peripheral polymorphonuclear leukocytes in cirrhotic ascitic fluid. *J Hepatol* 1992; 16(1-2):98-101.
  93. O'Keefe SJD, El-Zayadi AR, Carraher TE, Davis M, Williams R. Malnutrition and immuno-incompetence in patients with liver disease. *Lancet* 1980; 2:615-617.
  94. O'Keefe SJD, El-Zayadi AR, Carraher TE, Davis M, Williams R. Malnutrition and immuno-incompetence in patients with liver disease. *Lancet* 1980; 2:615-617.
  95. Conn HO, Fessel JM. Spontaneous bacterial peritonitis in cirrhosis: variations on a theme. *Medicine (Baltimore)* 1971; 50(3):161-197.
  96. Hoefs JC, Runyon BA. Spontaneous bacterial peritonitis. *Dis Mon* 1985; 31(9):1-48.
  97. Runyon BA. Low-protein-concentration ascitic fluid is predisposed to spontaneous bacterial peritonitis. *Gastroenterology* 1986; 91(6):1343-1346.
  98. Runyon BA, Morrissey RL, Hoefs JC, Wyle FA. Opsonic activity of human ascitic fluid: a potentially important protective mechanism against spontaneous bacterial peritonitis. *Hepatology* 1985; 5(4):634-637.
  99. Such J, Guarner C, Enriquez J, Rodriguez JL, Seres I, Vilardell F. Low C3 in cirrhotic ascites predisposes to spontaneous bacterial peritonitis. *J Hepatol* 1988; 6(1):80-84.
  100. D'Amico G, Morabito A, Pagliaro L, Marubini E. Survival and prognostic indicators in compensated and decompensated cirrhosis. *Dig Dis Sci* 1986; 31(5):468-475.
  101. Andreu M, Sola R, Sitgesserra A et al. Risk Factors for Spontaneous Bacterial Peritonitis in Cirrhotic Patients with Ascites. *Gastroenterology* 1993; 104:1133-1138.
  102. Llach J, Rimola A, Navasa M et al. Incidence and predictive factors of first episode of spontaneous bacterial peritonitis in cirrhosis with ascites: relevance of ascitic fluid protein concentration. *Hepatology* 1992; 16(3):724-727.
  103. Tito L, Rimola A, Gines P, Llach J, Arroyo V, Rodes J. Recurrence of spontaneous bacterial peritonitis in cirrhosis: frequency and predictive factors. *Hepatology* 1988; 8(1):27-31.

104. Zeni F, Tardy B, Vindimian M et al. High levels of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 in the ascitic fluid of cirrhotic patients with spontaneous bacterial peritonitis. *Clin Infect Dis* 1993; 17(2):218-223.
105. Byl B, Roucloux I, Crusiaux A, Dupont E, Deviere J. Tumor necrosis factor alpha and interleukin 6 plasma levels in infected cirrhotic patients. *Gastroenterology* 1993; 104(5):1492-1497.
106. Navasa M, Francitorra A, Follo A et al. Endotoxin (Etx), Tumor-Necrosis-Factor (Tnf-Alpha) and Interleukin-6 (II-6) in Cirrhosis with Infected and Noninfected Ascites. *Hepatology* 1993; 18(4):A104.
107. Such J, Guarner C, Soriano G et al. Selective intestinal decontamination increases serum and ascitic fluid C3 levels in cirrhosis. *Hepatology* 1990; 12(5):1175-1178.
108. Berg RD, Garlington AW. Translocation of certain indigenous bacteria from the gastrointestinal tract to the mesenteric lymph nodes and other organs in a gnotobiotic mouse model. *Infect Immun* 1979; 23(2):403-411.
109. KELLER R, ENGLEBY FB, Jr. Fate of bacteriophage particles introduced into mice by various routes. *Proc Soc Exp Biol Med* 1958; 98(3):577-580.
110. Mainous MR, Tso P, Berg RD, Deitch EA. Studies of the route, magnitude, and time course of bacterial translocation in a model of systemic inflammation. *Arch Surg* 1991; 126(1):33-37.
111. Lescut D, Colombel JF, Vincent P et al. Bacterial translocation in colorectal cancers. *Gastroenterol Clin Biol* 1990; 14:811-814.
112. Deitch EA. Bacterial translocation: is it of clinical significance? *Gastroenterology* 1990; 98(1):243-244.
113. Owen RL, Pierce NF, Apple RT, Cray WC, Jr. M cell transport of *Vibrio cholerae* from the intestinal lumen into Peyer's patches: a mechanism for antigen sampling and for microbial transepithelial migration. *J Infect Dis* 1986; 153(6):1108-1118.
114. Wells CL, Jechorek RP, Erlandsen SL. Evidence for the translocation of *Enterococcus faecalis* across the mouse intestinal tract. *J Infect Dis* 1990; 162(1):82-90.
115. Wang XD, Pärsson H, Andersson R, Soltesz V, Johansson K, Bengmark S. Bacterial translocation, intestinal ultrastructure and cell membrane permeability early after major liver resection in the rat. *Br J Surg* 1994; 81:579-584.
116. Tancrede CH, Andreumont AO. Bacterial translocation and gram-negative bacteremia in patients with hematological malignancies. *J Infect Dis* 1985; 152(1):99-103.

117. Debure A, Colombel JF, Cywiner GC et al. [Role of the digestive tract immune system in the control of bacterial translocation in gnotoxenic mice]. *Gastroenterol Clin Biol* 1986; 10(11):712-717.
118. Williams RC, Gibbons RJ. Inhibition of bacterial adherence by secretory immunoglobulin A: a mechanism of antigen disposal. *Science* 1972; 177(50):697-699.
119. Alexander JW, Boyce ST, Babcock GF et al. The process of microbial translocation. *Ann Surg* 1990; 212(4):496-510.
120. Morehouse JL, Specian RD, Stewart JJ, Berg RD. Translocation of indigenous bacteria from the gastrointestinal tract of mice after oral ricinoleic acid treatment. *Gastroenterology* 1986; 91(3):673-682.
121. Deitch EA, Morrison J, Berg R, Specian R. Effect of hemorrhagic shock on bacterial translocation, intestinal morphology, and intestinal permeability in conventional and antibiotic-decontaminated rats. *Crit Care Med* 1990; 18:529-536.
122. Wang XD, Parsson H, Andersson R, Soltesz V, Johansson K, Bengmark S. Bacterial translocation, intestinal ultrastructure and cell membrane permeability early after major liver resection in the rat. *Br J Surg* 1994; 81(4):579-584.
123. Baker JW, Deitch EA, Li M, Berg RD, Specian RD. Hemorrhagic shock induces bacterial translocation from the gut. *J Trauma* 1988; 28(7):896-906.
124. Steffen EK, Berg RD, Deitch EA. Comparison of translocation rates of various indigenous bacteria from the gastrointestinal tract to the mesenteric lymph node. *J Infect Dis* 1988; 157(5):1032-1038.
125. Martini GA, PHEAR EA, RUEBNER B, Sherlock S. The bacterial content of the small intestine in normal and cirrhotic subjects: relation to methionine toxicity. *Clin Sci (Lond)* 1957; 16(1):35-51.
126. Apter FM, Lencer WI, Finkelstein RA, Mekalanos JJ, Neutra MR. Monoclonal immunoglobulin A antibodies directed against cholera toxin prevent the toxin-induced chloride secretory response and block toxin binding to intestinal epithelial cells in vitro. *Infect Immun* 1993; 61(12):5271-5278.
127. Michetti P, Mahan MJ, Slauch JM, Mekalanos JJ, Neutra MR. Monoclonal secretory immunoglobulin A protects mice against oral challenge with the invasive pathogen *Salmonella typhimurium*. *Infect Immun* 1992; 60(5):1786-1792.
128. Owens WE, Berg RD. Bacterial translocation from the gastrointestinal tract of athymic (nu/nu) mice. *Infect Immun* 1980; 27(2):461-467.

129. Gautreaux MD, Gelder FB, Deitch EA, Berg RD. Adoptive transfer of T lymphocytes to T-cell-depleted mice inhibits *Escherichia coli* translocation from the gastrointestinal tract. *Infect Immun* 1995; 63(10):3827-3834.
130. Gautreaux MD, Deitch EA, Berg RD. T lymphocytes in host defense against bacterial translocation from the gastrointestinal tract. *Infect Immun* 1994; 62(7):2874-2884.
131. Deventer SJH, Cate JWT, Tytgat GNJ. Intestinal endotoxemia. Clinical significance. *Gastroenterology* 1988; 94(3):825-831.
132. Jacob AI, Goldberg PK, Bloom N, Degenshein GA, Kozinn PJ. Endotoxin and bacteria in portal blood. *Gastroenterology* 1977; 72(6):1268-1270.
133. Van Leeuwen PAM, Boermeester MA, Houdijk APJ et al. Clinical Significance of Translocation. *Gut* 1994; 35:S28-S34.
134. Katayama M, Xu D, Specian RD, Deitch EA. Role of bacterial adherence and the mucus barrier on bacterial translocation: effects of protein malnutrition and endotoxin in rats. *Ann Surg* 1997; 225(3):317-326.
135. Klastersky J. Chemoprophylaxis of gram-negative infections in neutropenic patients. *Eur Urol* 1990; 17 Suppl 1:40-45.
136. Garcia-Tsao G, Albillos A, Barden GE, West AB. Bacterial translocation in acute and chronic portal hypertension. *Hepatology* 1993; 17(6):1081-1085.
137. Sikuler E, Kravetz D, Groszmann RJ. Evolution of portal hypertension and mechanisms involved in its maintenance in a rat model. *Am J Physiol* 1985; 248(6 Pt 1):G618-G625.
138. Cornet A, Hartmann L, Courtois JE et al. [Cirrhosis of the liver and small intestine. Clinical, biological, histological, immunological and bacteriological comparisons]. *Sem Hop* 1973; 49(23):1639-1648.
139. Alexander JW. Nutrition and translocation. *JPEN* 1990; 14(Suppl)(5):170S-174S.
140. Kundra A, Jain A, Banga A, Bajaj G, Kar P. Evaluation of plasma ammonia levels in patients with acute liver failure and chronic liver disease and its correlation with the severity of hepatic encephalopathy and clinical features of raised intracranial tension. *Clin Biochem* 2005; 38(8):696-699.
141. Lockwood AH. Blood ammonia levels and hepatic encephalopathy. *Metab Brain Dis* 2004; 19(3-4):345-349.
142. Romero-Gomez M, Boza F, Garcia-Valdecasas MS, Garcia E, guilar-Reina J. Subclinical hepatic encephalopathy predicts the development of

- overt hepatic encephalopathy. *Am J Gastroenterol* 2001; 96(9):2718-2723.
143. Romero GM, Cordoba J, Jover R et al. [Normality tables in the Spanish population for psychometric tests used in the diagnosis of minimal hepatic encephalopathy]. *Med Clin (Barc)* 2006; 127(7):246-249.
  144. Romero-Gomez M, Grande L, Camacho I. Prognostic value of altered oral glutamine challenge in patients with minimal hepatic encephalopathy. *Hepatology* 2004; 39(4):939-943.
  145. Weissenborn K, Ennen JC, Schomerus H, Ruckert N, Hecker H. Neuropsychological characterization of hepatic encephalopathy. *J Hepatol* 2001; 34(5):768-773.
  146. Ortiz M, Jacas C, Cordoba J. Minimal hepatic encephalopathy: diagnosis, clinical significance and recommendations. *J Hepatol* 2005; 42 Suppl(1):S45-S53.
  147. Liehr H, Englisch G, Rasenack U. Lactulose--a drug with antiendotoxin effect. *Hepatogastroenterology* 1980; 27(5):356-360.
  148. Shawcross D, Jalan R. Dispelling myths in the treatment of hepatic encephalopathy. *Lancet* 2005; 365(9457):431-433.
  149. Als-Nielsen B, Gluud LL, Gluud C. Non-absorbable disaccharides for hepatic encephalopathy: systematic review of randomised trials. *BMJ* 2004; 328(7447):1046.
  150. Williams R, James OF, Warnes TW, Morgan MY. Evaluation of the efficacy and safety of rifaximin in the treatment of hepatic encephalopathy: a double-blind, randomized, dose-finding multi-centre study. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2000; 12(2):203-208.
  151. Mas A, Rodes J, Sunyer L et al. Comparison of rifaximin and lactitol in the treatment of acute hepatic encephalopathy: results of a randomized, double-blind, double-dummy, controlled clinical trial. *J Hepatol* 2003; 38(1):51-58.
  152. Fernandez J, Mas A. Tratamiento de la encefalopatía hepática. Fármacos y mecanismos de acción. *Medicine* 2000; 08:516-521.
  153. Stauch S, Kircheis G, AdLer G et al. Oral L-ornithine-L-aspartate therapy of chronic hepatic encephalopathy: results of a placebo-controlled double-blind study. *J Hepatol* 1998; 28(5):856-864.
  154. Kircheis G, Nilius R, Held C et al. Therapeutic efficacy of L-ornithine-L-aspartate infusions in patients with cirrhosis and hepatic encephalopathy: results of a placebo-controlled, double-blind study. *Hepatology* 1997; 25(6):1351-1360.

155. Sushma S, Dasarathy S, Tandon RK, Jain S, Gupta S, Bhist MS. Sodium benzoate in the treatment of acute hepatic encephalopathy: a double-blind randomized trial. *Hepatology* 1992; 16(1):138-144.
156. Campollo O, Cortez R, Gutierrez M, Odor A, Munoz RM. Sodium benzoate and lactulose for the treatment of hepatic encephalopathy. *J Hepatol* 1994; 21(6):1144.
157. Av SP. Hepatic encephalopathy: pathophysiology and advances in therapy. *Trop Gastroenterol* 2007; 28(1):4-10.
158. Marchesini G, Fabbri A, Bianchi G, Brizi M, Zoli M. Zinc supplementation and amino acid-nitrogen metabolism in patients with advanced cirrhosis. *Hepatology* 1996; 23:1084-1092.
159. Riggio O, Ariosto F, Merli M et al. Short-term oral zinc supplementation does not improve chronic hepatic encephalopathy. Results of a double-blind crossover trial. *Dig Dis Sci* 1991; 36(9):1204-1208.
160. Yoshida Y, Higashi T, Nouse K et al. Effects of zinc deficiency/zinc supplementation on ammonia metabolism in patients with decompensated liver cirrhosis. *Acta Med Okayama* 2001; 55(6):349-355.
161. Cordoba J, Olive G, Alonso J et al. Improvement of magnetic resonance spectroscopic abnormalities but not pallidal hyperintensity followed amelioration of hepatic encephalopathy after occlusion of a large spleno-renal shunt. *J Hepatol* 2001 Jan ;34 (1):176 -8 2001; 34:176-178.
162. Barbaro G, Di LG, Soldini M et al. Flumazenil for hepatic encephalopathy grade III and IVa in patients with cirrhosis: an Italian multicenter double-blind, placebo-controlled, cross-over study. *Hepatology* 1998; 28(2):374-378.
163. Conchillo M, Prieto J, Quiroga J. Insulin-like growth factor I (IGF-I) and liver cirrhosis. *Rev Esp Enferm Dig* 2007; 99(3):156-164.
164. Le RD. Seminars in medicine of the Beth Israel Deaconess Medical Center. Insulin-like growth factors. *N Engl J Med* 1997; 336(9):633-640.
165. Lorenzo-Zuniga V, Rodriguez-Ortigosa CM, Bartoli R et al. Insulin-like growth factor I improves intestinal barrier function in cirrhotic rats. *Gut* 2006; 55(9):1306-1312.
166. Li JB, Higgins JE, Jefferson LS. Changes in protein turnover in skeletal muscle in response to fasting. *Am J Physiol* 1979; 236(3):E222-E228.
167. Park JH, Vanderhoof JA, Blackwood D, MacDonald RG. Characterization of type I and type II insulin-like growth factor receptors in an intestinal epithelial cell line. *Endocrinology* 1990; 126(6):2998-3005.

168. Steeb CB, Trahair JF, Read LC. Administration of insulin-like growth factor-I (IGF-I) peptides for three days stimulates proliferation of the small intestinal epithelium in rats. *Gut* 1995; 37(5):630-638.
169. Castilla-Cortazar I, Prieto J, Urdaneta E et al. Impaired intestinal sugar transport in cirrhotic rats: Correction by low doses of insulin-like growth factor I. *Gastroenterology* 1997; 113:1180-1187.
170. MacDonald RS, Park JH, Thornton WH, Jr. Insulin, IGF-1, and IGF-2 receptors in rat small intestine following massive small bowel resection. Analysis by binding, flow cytometry, and immunohistochemistry. *Dig Dis Sci* 1993; 38(9):1658-1669.
171. Vanderhoof JA, McCusker RH, Clark R et al. Truncated and native insulinlike growth factor I enhance mucosal adaptation after jejunoileal resection. *Gastroenterology* 1992; 102(6):1949-1956.
172. Picardi A, De Oliveira AC, Muguera B et al. Low doses of insulin-like growth factor-I improve nitrogen retention and food efficiency in rats with early cirrhosis. *J Hepatol* 1997; 26:191-202.
173. Petersen KF, Jacob R, West AB, Sherwin RS, Shulman GI. Effects of insulin-like growth factor I on glucose metabolism in rats with liver cirrhosis. *Am J Physiol* 1997; 273(6 Pt 1):E1189-E1193.
174. Jones JI, Clemmons DR. Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. *Endocr Rev* 1995; 16(1):3-34.
175. Boulware SD, Tamborlane WV, Matthews LS, Sherwin RS. Diverse effects of insulin-like growth factor I on glucose, lipid, and amino acid metabolism. *Am J Physiol* 1992; 262(1 Pt 1):E130-E133.
176. Borkman M, Storlien LH, Pan DA, Jenkins AB, Chisholm DJ, Campbell LV. The relation between insulin sensitivity and the fatty acid composition of skeletal muscle phospholipids. *N Engl J Med* 1993; 328:238-244.
177. Schoenle EJ, Zenobi PD, Torresani T, Werder EA, Zachmann M, Froesch ER. Recombinant human insulin-like growth factor I (rhIGF I) reduces hyperglycaemia in patients with extreme insulin resistance. *Diabetologia* 1991; 34(9):675-679.
178. Diamond T, Stiel D, Lunzer M, Wilkinson M, Roche J, Posen S. Osteoporosis and skeletal fractures in chronic liver disease. *Gut* 1990; 31(1):82-87.
179. Guler HP, Zapf J, Froesch ER. Short-term metabolic effects of recombinant human insulin-like growth factor I in healthy adults. *N Engl J Med* 1987; 317(3):137-140.
180. Casanueva FF. Physiology of growth hormone secretion and action. *Endocrinol Metab Clin North Am* 1992; 21(3):483-517.

181. Sokhi RP, Anantharaju A, Kondaveeti R, Creech SD, Islam KK, Van Thiel DH. Bone mineral density among cirrhotic patients awaiting liver transplantation. *Liver Transpl* 2004; 10(5):648-653.
182. Stellon AJ, Webb A, Compston J, Williams R. Low bone turnover state in primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 1987; 7(1):137-142.
183. Stellon AJ, Davies A, Compston J, Williams R. Osteoporosis in chronic cholestatic liver disease. *Q J Med* 1985; 57(223):783-790.
184. Cemborain A, Castilla-Cortazar I, Garcia M et al. Osteopenia in rats with liver cirrhosis: beneficial effects of IGF-I treatment. *J Hepatol* 1998; 28(1):122-131.
185. Kudo Y, Iwashita M, Iguchi T, Takeda Y. The regulation of L-proline transport by insulin-like growth factor-I in human osteoblast-like SaOS-2 cells. *Pflugers Arch* 1996; 432(3):419-425.
186. Gallego-Rojo FJ, Gonzalez-Calvin JL, Munoz-Torres M, Mundi JL, Fernandez-Perez R, Rodrigo-Moreno D. Bone mineral density, serum insulin-like growth factor I, and bone turnover markers in viral cirrhosis. *Hepatology* 1998; 28(3):695-699.
187. Renier G, Clement I, Desfaits AC, Lambert A. Direct stimulatory effect of insulin-like growth factor-I on monocyte and macrophage tumor necrosis factor-alpha production. *Endocrinology* 1996; 137(11):4611-4618.
188. Auernhammer CJ, Feldmeier H, Nass R, Pachmann K, Strasburger CJ. Insulin-like growth factor I is an independent coregulatory modulator of natural killer (NK) cell activity. *Endocrinology* 1996; 137(12):5332-5336.
189. De BF, Alonzi T, Moretta A et al. Interleukin 6 causes growth impairment in transgenic mice through a decrease in insulin-like growth factor-I. A model for stunted growth in children with chronic inflammation. *J Clin Invest* 1997; 99(4):643-650.
190. Propst T, Propst A, Herold M et al. Spontaneous bacterial peritonitis is associated with high levels of interleukin-6 and its secondary mediators in ascitic fluid. *Eur J Clin Invest* 1993; 23(12):832-836.
191. Caregaro L, Alberino F, Amodio P et al. Nutritional and prognostic significance of insulin-like growth factor 1 in patients with liver cirrhosis. *Nutrition* 1997; 13(3):185-190.
192. Moller S, Becker U, Juul A, Skakkebaek NE, Christensen E. Prognostic value of insulinlike growth factor I and its binding protein in patients with alcohol-induced liver disease. EMALD group. *Hepatology* 1996; 23(5):1073-1078.
193. Caregaro L, Alberino F, Angeli P, Gatta A. Insulin-like growth factor 1 (IGF-1) in liver cirrhosis: a marker of hepatocellular dysfunction? *J Hepatol* 1998; 29(2):342.



194. Castilla-Cortazar I, Picardi A, Tosar A et al. Effect of insulin-like growth factor I on in vivo intestinal absorption of D-galactose in cirrhotic rats. *Am J Physiol* 1999; 276(1 Pt 1):G37-G42.
195. Pascual M, Castilla-Cortazar I, Urdaneta E et al. Altered intestinal transport of amino acids in cirrhotic rats: the effect of insulin-like growth factor-I. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000; 279(2):G319-G324.
196. Castilla-Cortazar I, Garcia M, Quiroga J et al. Insulin-like growth factor-I reverts testicular atrophy in rats with advanced cirrhosis. *Hepatology* 2000; 31(3):592-600.
197. Lawrence RA, Burk RF. Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *Biochem Biophys Res Commun* 1976; 71(4):952-958.
198. Richter C, Gogvadze V, Laffranchi R et al. Oxidants in mitochondria: from physiology to diseases. *Biochim Biophys Acta* 1995; 1271(1):67-74.
199. Mullen KD, McCullough AJ. Problems with animal models of chronic liver disease: suggestions for improvement in standardization. *Hepatology* 1989; 9(3):500-503.
200. Funovics JM, Cummings MG, Shuman L, James JH, Fischer JE. An improved nonsuture method for portacaval anastomosis in the rat. *Surgery* 1975; 77(5):661-664.
201. Lee SH, Fisher B. Portacaval shunt in the rat. *Surgery* 1961; 50:668-672.
202. Arias J, Andres-Trelles F, Alsasua A. [Simplified technique for portocaval shunt in rats (author's transl)]. *Arch Farmacol Toxicol* 1977; 3(3):205-214.
203. Traber P, DalCanto M, Ganger D, Blei AT. Effect of body temperature on brain edema and encephalopathy in the rat after hepatic devascularization. *Gastroenterology* 1989; 96:885-891.
204. Matkowskyj KA, Marrero JA, Carroll RE, Danilkovich AV, Green RM, Benya RV. Azoxymethane-induced fulminant hepatic failure in C57BL/6J mice: characterization of a new animal model. *Am J Physiol* 1999; 277(2 Pt 1):G455-G462.
205. Chu CJ, Lee FY, Wang SS et al. Establishment of an animal model of hepatic encephalopathy. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi (Taipei)* 2000; 63(4):263-269.
206. Keppler D, Lesch R, Reutter W, Decker K. Experimental hepatitis induced by D-galactosamine. *Exp Mol Pathol* 1968; 9(2):279-290.
207. Jezequel AM, Mancini R, Rinaldesi ML, Macarri G, Venturini C, Orlandi F. A morphological study of the early stages of hepatic fibrosis induced

- by low doses of dimethylnitrosamine in the rat. *J Hepatol* 1987; 5(2):174-181.
208. Cater KC, Gandolfi AJ, Sipes IG. Characterization of dimethylnitrosamine-induced focal and nodular lesions in the livers of newborn mice. *Toxicol Pathol* 1985; 13(1):3-9.
209. Kountouras J, Billing BH, Scheuer PJ. Prolonged bile duct obstruction: a new experimental model for cirrhosis in the rat. *Br J Exp Pathol* 1984; 65(3):305-311.
210. Scorticati C, Prestifilippo JP, Eizayaga FX et al. Hyperammonemia, brain edema and blood-brain barrier alterations in prehepatic portal hypertensive rats and paracetamol intoxication. *World J Gastroenterol* 2004 May 1;10(9):1321-4 2004; 10:1321-1324.
211. Krahenbuhl S, Reichen J, Zimmermann A, Gehr P, Stucki J. Mitochondrial structure and function in CCl<sub>4</sub>-induced cirrhosis in the rat. *Hepatology* 1990; 12(3 Pt 1):526-532.
212. Perez TR. Is cirrhosis of the liver experimentally produced by CCl<sub>4</sub> and adequate model of human cirrhosis? *Hepatology* 1983; 3(1):112-120.
213. Zimmerman SW, Norbach DH. Nephrotoxic effects of long-term carbon tetrachloride administration in rats. *Arch Pathol Lab Med* 1980; 104(2):94-99.
214. Vorobioff J, Bredfeldt JE, Groszmann RJ. Increased blood flow through the portal system in cirrhotic rats. *Gastroenterology* 1984; 87(5):1120-1126.
215. Lebrec D. Animal models of portal hypertension. In: Okuda K, Benhamou J, editors. *Portal hypertension. Clinical and Physiological aspects*. Tokio: Springer-Verlag; 1991 p. 101-113.
216. Ariosto F, Riggio O, Cantafora A et al. Carbon tetrachloride-induced experimental cirrhosis in the rat: a reappraisal of the model. *Eur Surg Res* 1989; 21(5):280-286.
217. Chatamra K, Proctor E. Phenobarbitone-induced enlargement of the liver in the rat: its relationship to carbon tetrachloride-induced cirrhosis. *Br J Exp Pathol* 1981; 62(3):283-288.
218. Llovet JM, Bartolí R, Planas R et al. Bacterial translocation in cirrhotic rats. Its role in the development of spontaneous bacterial peritonitis. *Gut* 1994; 35:1648-1652.
219. Proctor E, Chatamra K. High yield micronodular cirrhosis in the rat. *Gastroenterology* 1982; 83(6):1183-1190.

220. Runyon BA, Sugano S, Kanel G, Mellencamp M. A rodent model of cirrhosis, ascites, and bacterial peritonitis. *Gastroenterology* 1991; 100:489-493.
221. Claria J, Jimenez W. Cirrosis hepática experimental y fisiopatología de la formación de ascitis en la enfermedad hepática crónica. *Gastroenterología y hepatología* 1992; 15:171-182.
222. Clark SM, Lai E, Birren BW, Hood L. A novel instrument for separating large DNA molecules with pulsed homogeneous electric fields. *Science* 1988; 241(4870):1203-1205.
223. Wang X, Soltesz V, Axelson J, Andersson R. Cholecystokinin increases small intestinal motility and reduces enteric bacterial overgrowth and translocation in rats with surgically induced acute liver failure. *Digestion* 1996; 57(1):67-72.
224. Caly WR, Strauss E. A prospective study of bacterial infections in patients with cirrhosis. *J Hepatol* 1993; 18(3):353-358.
225. Lopez C, Jimenez W, Arroyo V et al. Effects of atrial natriuretic peptide on urinary kallikrein excretion and renal function in rats. *Eur J Pharmacol* 1989; 168(1):1-6.
226. Jimenez W, Martinez-Pardo A, Arroyo V et al. Temporal relationship between hyperaldosteronism, sodium retention and ascites formation in rats with experimental cirrhosis. *Hepatology* 1985; 5(2):245-250.
227. Dusting GJ, MacDonald PS. Prostacyclin and vascular function: implications for hypertension and atherosclerosis. *Pharmacol Ther* 1990; 48(3):323-344.
228. Finn WF, Hak LJ, Grossman SH. Protective effect of prostacyclin on postischemic acute renal failure in the rat. *Kidney Int* 1987; 32(4):479-487.
229. Skrinska VA, Lucas FV, Chisolm GM, Hesse BL. Intravenous administration of prostacyclin in rabbits: elimination kinetics and blood pressure response. *J Lab Clin Med* 1986; 107(3):187-193.
230. Neuhof H. Experimental ligation of the portal vein; its application to the treatment of suppurative pylephlebitis. *Surg Gynecol Obstet* 1913; 16:481-488.
231. REYNELL PC. Portal hypertension in the rat. *Br J Exp Pathol* 1952; 33(1):19-24.
232. Rozga J, Jeppsson B, Hagerstrand I, Bengmark S. Acute portal vein stenosis. An experimental study on portal circulation and hepatosplenic function. *Acta Chir Scand* 1985; 151(2):125-131.

233. Um SH, Nishida O, Tokubayashi M et al. Hemodynamic changes after ligation of a major branch of the portal vein in rats: comparison with rats with portal vein constriction. *Hepatology* 1994; 19(1):202-209.
234. Geraghty JG, Angerson WJ, Carter DC. Portal venous pressure and portasystemic shunting in experimental portal hypertension. *Am J Physiol* 1989; 257(1 Pt 1):G52-G57.
235. Haussinger D, Laubenberger J, vom DS et al. Proton magnetic resonance spectroscopy studies on human brain myo-inositol in hypo-osmolarity and hepatic encephalopathy. *Gastroenterology* 1994; 107(5):1475-1480.
236. Kreis R, Ross BD, Farrow NA, Ackerman Z. Metabolic disorders of the brain in chronic hepatic encephalopathy detected with H-1 MR spectroscopy. *Radiology* 1992; 182(1):19-27.
237. Scheuer PJ. Classification of chronic viral hepatitis: a need for reassessment. *J Hepatol* 1991; 13(3):372-374.
238. Guarner C, Runyon BA, Young S, Heck M, Sheikh MN. Intestinal bacterial overgrowth and bacterial translocation in cirrhotic rats with ascites. *J Hepatol* 1997; 26:1372-1378.
239. Francavilla A, Makowka L, Polimeno L et al. A dog model for acetaminophen-induced fulminant hepatic failure. *Gastroenterology* 1989; 96(2 Pt 1):470-478.
240. Arai K, Lee K, Berthiaume F, Tompkins RG, Yarmush ML. Intrahepatic amino acid and glucose metabolism in a D-galactosamine-induced rat liver failure model. *Hepatology* 2001; 34(2):360-371.
241. Zimmermann H, Blaser H, Zimmermann A, Reichen J. Effect of development on the functional and histological changes induced by bile-duct ligation in the rat. *J Hepatol* 1994; 20(2):231-239.
242. Alonso MJ, Aller MA, Corcuera MT et al. Progressive hepatocytic fatty infiltration in rats with prehepatic portal hypertension. *Hepatogastroenterology* 2005; 52(62):541-546.
243. Silva PC, Jamel N, Refinetti RA, Manso EF, Schanaider A. [Development of blood vessels of the greater omentum in the hepatic lobe after vascular ligation. An experimental model in the rats]. *Acta Cir Bras* 2006; 21(6):416-421.
244. Benjamin IS, Ryan CJ, Engelbrecht GH, Campbell JA, van Hoorn-Hickman R, Blumgart LH. Portacaval transposition in the rat: definition of a valuable model for hepatic research. *Hepatology* 1984; 4(4):704-708.
245. Cordoba J, Dupuis J, Gottstein J, Blei AT. Stenosis of a portacaval anastomosis affects circadian locomotor activity in the rat: a multivariable analysis. *Am J Physiol* 1997; 273:G1218-G1225.

246. Cordoba J, Dupuis J, Gottstein J, Blei AT. Stenosis of a portacaval anastomosis affects circadian locomotor activity in the rat: a multivariable analysis. *Am J Physiol* 1997; 273:G1218-G1225.
247. Preedy VR, Gove CD, Panos MZ et al. Liver histology, blood biochemistry and RNA, DNA and subcellular protein composition of various skeletal muscles of rats with experimental cirrhosis: implications for alcoholic muscle disease. *Alcohol Alcohol* 1990; 25(6):641-649.
248. Kotani M, Seiki K, Yamashita A, Takashima A, Nakagawa T, Horii I. Serum and lymph lipids in rabbits with carbon tetrachloride-induced cirrhosis of the liver. *J Lipid Res* 1967; 8:181-184.
249. Blei AT, O'Reilly DJ, Gottstein J. Portal-systemic shunting and the hemodynamic effects of nitroglycerin in the rat. *Gastroenterology* 1984; 86:1428-1436.
250. Lozeva V, Montgomery JA, Tuomisto L et al. Increased brain serotonin turnover correlates with the degree of shunting and hyperammonemia in rats following variable portal vein stenosis. *J Hepatol* 2004 May ;40 (5):742 -8 2004; 40:742-748.
251. Rimola A, Soto R, Bory F, Arroyo V, Piera C, Rodes J. Reticuloendothelial system phagocytic activity in cirrhosis and its relation to bacterial infections and prognosis. *Hepatology* 1984; 4(1):53-58.
252. Conn HO. Spontaneous Peritonitis and Bacteremia in Laennec's Cirrhosis Caused by Enteric Organisms. A Relatively Common Rarely Recognized Syndrome. *Ann Intern Med* 1964; 60:568-580.
253. Llovet JM, Planas R, Morillas R et al. Short-term prognosis of cirrhotics with spontaneous bacterial peritonitis: multivariate study. *Am J Gastroenterol* 1993; 88(3):388-392.
254. Kundra A, Jain A, Banga A, Bajaj G, Kar P. Evaluation of plasma ammonia levels in patients with acute liver failure and chronic liver disease and its correlation with the severity of hepatic encephalopathy and clinical features of raised intracranial tension. *Clin Biochem* 2005; 38(8):696-699.
255. Ong JP, Aggarwal A, Krieger D et al. Correlation between ammonia levels and the severity of hepatic encephalopathy. *Am J Med* 2003; 114(3):188-193.
256. Cordoba J, Gottstein J, Blei AT. Glutamine, myo-inositol, and organic brain osmolytes after portacaval anastomosis in the rat: implications for ammonia-induced brain edema. *Hepatology* 1996; 24:919-923.
257. Grover VP, Dresner MA, Forton DM et al. Current and future applications of magnetic resonance imaging and spectroscopy of the brain in hepatic encephalopathy. *World J Gastroenterol* 2006; 12(19):2969-2978.

258. Verma A, Saraswat VA, Radha KY, Nath K, Thomas MA, Gupta RK. In vivo (1)H magnetic resonance spectroscopy-derived metabolite variations between acute-on-chronic liver failure and acute liver failure. *Liver Int* 2008.
259. Garcia-Tsao G, Lee F-Y, Barden GE, Cartun R, West AB. Bacterial translocation to mesenteric lymph nodes is increased in cirrhotic rats with ascites. *Gastroenterology* 1995; 108:1835-1841.
260. Donaghy A, Ross R, Gimson A, Hughes SC, Holly J, Williams R. Growth hormone, insulinlike growth factor-1, and insulinlike growth factor binding proteins 1 and 3 in chronic liver disease. *Hepatology* 1995; 21:680-688.
261. Hattori N, Kurahachi H, Ikekubo K et al. Serum growth hormone-binding protein, insulin-like growth factor-I, and growth hormone in patients with liver cirrhosis. *Metabolism* 1992; 41(4):377-381.
262. Castilla-Cortazar I, Garcia M, Mugerza B et al. Hepatoprotective effects of insulin-like growth factor I in rats with carbon tetrachloride-induced cirrhosis. *Gastroenterology* 1997; 113:1682-1691.
263. Castilla-Cortazar I, Pascual M, Urdaneta E et al. Jejunal microvilli atrophy and reduced nutrient transport in rats with advanced liver cirrhosis: improvement by Insulin-like Growth Factor I. *BMC Gastroenterol* 2004 Jun 14;4:12 2004; 4:12.
264. Mugerza B, Castilla-Cortazar I, Garcia M, Quiroga J, Santidrian S, Prieto J. Antifibrogenic effect in vivo of low doses of insulin-like growth factor-I in cirrhotic rats. *Biochim Biophys Acta* 2001; 1536(2-3):185-195.
265. Conchillo M, de Knecht RJ, Payeras M et al. Insulin-like growth factor I (IGF-I) replacement therapy increases albumin concentration in liver cirrhosis: results of a pilot randomized controlled clinical trial. *J Hepatol* 2005; 43(4):630-636.
266. Ebeling PR, Jones JD, O'Fallon WM, Janes CH, Riggs BL. Short-term effects of recombinant human insulin-like growth factor I on bone turnover in normal women. *J Clin Endocrinol Metab* 1993; 77(5):1384-1387.
267. Leevy CB, Phillips JA. Hospitalizations during the use of rifaximin versus lactulose for the treatment of hepatic encephalopathy. *Dig Dis Sci* 2007; 52(3):737-741.
268. Casafont Morencos F, De las Heras Castano G, Martin Ramos L, Lopez Arias MJ, Ledesma F, Pons Romero F. Small bowel bacterial overgrowth in patients with alcoholic cirrhosis. *Dig Dis Sci* 1995; 40:1252-1256.
269. Gonzalez-Navajas JM, Bellot P, Frances R et al. Presence of bacterial-DNA in cirrhosis identifies a subgroup of patients with marked inflammatory response not related to endotoxin. *J Hepatol* 2008; 48(1):61-67.

270. Urtasun R, Nieto N. [Hepatic stellate cells and oxidative stress]. *Rev Esp Enferm Dig* 2007; 99(4):223-230.
271. Garcia-Fernandez M, Castilla-Cortazar I, az-Sanchez M et al. Antioxidant effects of insulin-like growth factor-I (IGF-I) in rats with advanced liver cirrhosis. *BMC Gastroenterol* 2005; 5:7.
272. Albrecht J, Norenberg MD. Glutamina: a Trojan horse in ammonia neurotoxicity. *Hepatology* 2006; 44:788-794.
273. Norenberg MD, Jayakumar AR, Rama Rao KV, Panickar KS. New concepts in the mechanism of ammonia-induced astrocyte swelling. *Metab. Barin Dis.* 2007; 22: 219-234.

---

# **COMUNICACIONES A CONGRESOS**



## Congresos Nacionales

- **Desenvolupament d'un nou model experimental d'encefalopatia hepàtica en rates cirròtiques amb ascites i lligadura total de la vena porta.** M. Miquel, G. Òdena, R. Bartolí, R. Planas; R.M. Morillas, H. Masnou, M.A. Gassull. Servei d'Àparell Digestiu. Hospital Universitari Germans Trias i Pujol. XV Congrés de la Societat Catalana de Digestologia. Del 26 al 28 de gener de 2006. Tarragona.
- **Resposta a una sobrecàrrega de glutamina en un model d'encefalopatia hepàtica en rates cirròtiques amb ascites i lligadura de la vena porta.** R. Bartolí, M. Miquel, G. Òdena, R. Planas, RM Morillas, H Masnou, MA Gassull. Servei d'Àparell Digestiu. Hospital Universitari Germans Trias i Pujol. Badalona. XV Congrés de la Societat Catalana de Digestologia. Del 26 al 28 de gener de 2006. Tarragona.
- **Respuesta a una sobrecarga de glutamina en un modelo de encefalopatía hepática en ratas cirróticas con ascitis y ligadura de la vena porta.** R. Bartolí, M. Miquel, G. Òdena, R Planas, RM Morillas, H Masnou, MA Gassull. Servicio de Ap. Digestivo. Hospital Germans Trias i Pujol. Badalona. XXXI Congreso Anual de la Fundación y Asociación Española para el Estudio del Hígado. Del 15-17 de febrero de 2006. Madrid.
- **IGF-1 front Rifaximina en el tractament de l'encefalopatia hepàtica (EH) en rates cirròtiques amb ascites i lligadura total de la vena portal (LTP).** M.Miquel, G. Ódena, R. Bartolí, A. Serafin, R.M. Morillas, M.A Gassull, R. Planas. Unitat d'Hepatología, Servei de Digestiu, Hospital Germans Trias i Pujol . Badalona, Barcelona. XVII Congrés de

la Societat Catalana de Digestologia. Del 31 gener al 2 de febrer de 2008. Salou

- **IGF-1 frente a Rifaximina en el Tratamiento de la Encefalopatía Hepática en Ratas Cirróticas con Ascitis y Ligadura total de la vena porta.** R. Bartola, G. Òdena, M. Miquel, A. Serafín, R.M. Morillas, A. Galan, M.A. Gassull, R. Planas. Servicios de gastroenterología y Bioquímica. Hospital Universitari Germans Trias i Pujol. Servicio de medicina y cirugía animal. Universitat Autònoma de Barcelona. XXXIII Congreso Asociación Española para el Estudio del Hígado. Del 20 al 22 febrer de 2008. Madrid.
- **IGF-1 versus Rifaximine for hepatic encephalopathy treatment in ascitic cirrhotic rats with total portal vein ligation.** M Miquel<sup>1</sup>, G. Òdena<sup>1</sup>, R Bartolí<sup>1</sup>, Serafin A<sup>2</sup>, A Galan<sup>3</sup>, MA Gassull<sup>1</sup>, R Planas<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Gastroenterology Department. Hospital Universitari Germans Trias i Pujol. <sup>2</sup>Animal Medicine & Surgery Department. Universitat Autònoma de Barcelona. <sup>3</sup>Biochemistry Department. Hospital Universitari Germans Trias i Pujol. Spain. Digestive Disease Week 2008. Del 17 al 22 de maig de 2008. San Diego, USA.