



Departament de Medicina
Facultat de Medicina
Universitat Autònoma de Barcelona

[Tesis Doctoral]

FISIOPATOLOGIA DE L'EDEMA CEREBRAL EN LA
INSUFICIÈNCIA HEPÀTICA MITJANÇANT
RESSONÀNCIA MAGNÈTICA

MEMÒRIA PER OPTAR A GRAU DE DOCTOR DE
LAIA CHAVARRIA VILARASAU

Directors de la Tesis

Joan Córdoba Cardona
Juli Alonso Farré

Laboratori de Malalties Hepàtiques , Vall Hebron Institut de Recerca (VHIR)
Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas
(CIBEREHD), Instituto de Salud Carlos III, Madrid.

[Barcelona 2012]

AGRAÏMENTS

Com en cada etapa de la vida, tot té un començament i un final, també la tesi i aquest és un bon instant per reflexionar sobre el camí recorregut. Un camí que no l'he fet pas sola, i ara és el moment ideal per dir quatre paraules sobre els companys i amics involucrats en aquesta etapa magnífica.

En primer lloc agrair al Joan per donar-me l'oportunitat de realitzar la tesi en el seu grup i per confiar en mi en cada pas donat, ets el responsable d'introduir-me al món de la investigació. També agrair a tots "els ressonants" implicats en aquesta tesi, ja que sou en part els grans culpables que hagi arribat fins aquí. No m'hagués imaginat que el que va començar en unes pràctiques em portaria cap aquesta direcció. Donar les gràcies a tota la gent del laboratori i de l'hospital, que sou uns quants, amb vosaltres he viscut dia a dia per assolir nous reptes, celebrar els èxits, superar els fracassos i ens hem fet internacionals en els congressos! També hem viscut algunes nits en blanc, encara que no totes eren per anar de festa, i altres moments més lúdics com els dijous cervesers, el *rafting* pels Pirineus, els *dàncings* ètnics, els coachings al costat de la platja o les festes de pijama a la plana (entre molts d'altres moments). Per últim, i no menys important, agrair als incondicionals, família i amics, sempre heu estat compartint aquesta període amb mi, m'heu donat molta força.

M'heu ajudat a créixer com a persona i com a científica, i formeu part de la culminació d'aquesta tesi.

Moltes gràcies a tots!

ÍNDEX

1. ÍNDEX

2. INTRODUCCIÓ	13
2.1. METABOLISME DE L'AMONI	15
2.2. TIPUS D'INSUFICIÈNCIA HEPÀTICA	16
2.2.1. AGUDA	16
2.2.2. CRÒNICA	17
2.3. COMPLICACIONS DE LA INSUFICIÈNCIA HEPÀTICA	17
2.3.1. ENCEFALOPATIA (EH)	17
- CLASSIFICACIÓ DE L'EH	17
- MANIFESTACIONS NEUROLÒGIQUES DE L'EH	18
- TESTS NEUROPSICOLÒGICS	20
2.3.2. EDEMA CEREBRAL	21
- MECANISMES DE FORMACIÓ DE L'EDEMA CEREBRAL	21
2.3.3. FLUX SANGUINI CEREBRAL	22
2.3.4. METABOLISME CEREBRAL	23
2.4. TÈCNiques DE NEUROIMATGE	24
2.4.1. RESSONÀNCIA MAGNÈTICA	24
2.4.2. TÈCNiques DE RESSONÀNCIA MAGNÈTICA	25
- TÈCNiques D'IMATGE	25
- ESPECTROSCÒPIA	28
2.4.3. ESTUDI DE L'EDEMA CEREBRAL PER RESSONÀNCIA MAGNÈTICA	29
2.4.4. ESTUDI DEL METABOLISME CEREBRAL PER RESSONÀNCIA MAGNÈTICA	31
2.4.5. ALTERACIONS EN LA INSUFICIÈNCIA HEPÀTICA	33
3. HIPÒTESI	39
4. OBJECTIU	39
5. ESTUDI 1	41
5.1. INTRODUCCIÓ	43
5.2. OBJECTIU	43
5.3. MATERIALS I MÈTODES	43
5.4. DISSENY EXPERIMENTAL	43
5.5. RESULTATS	44
5.6. RESULTATS ADDICIONALS DE L'ESTUDI	45
5.6.1. ANÀLISI METABONÒMIC	45
5.6.2. ESPECTROSCÒPIA AMB CARBONI 13	47
5.7. ARTICLE ORIGINAL	48
6. ESTUDI 2	59
6.1. INTRODUCCIÓ	59
6.2. OBJECTIUS	59
6.3. MATERIALS I MÈTODES	59
6.4. RESULTATS	60
6.5. ARTICLE ORIGINAL	60

7. ESTUDI 3	69
7.1. INTRODUCCIÓ	71
7.2. OBJECTIUS	71
7.3. MATERIALS I MÈTODES	71
7.4. RESULTATS	71
7.5. ARTICLE ORIGINAL	72
8. ESTUDI 4	89
8.1. INTRODUCCIÓ	91
8.2. OBJECTIUS	91
8.3. MATERIALS I MÈTODES	91
8.4. RESULTATS	92
8.5. ARTICLE ORIGINAL	92
9. DISCUSSIÓ	107
9.1. EDEMA CEREBRAL	107
9.2. METABOLISME CEREBRAL	114
10. CONCLUSIONS	119
11. MATERIALS I MÈTODES	123
11.1. SUBJECTES	123
11.1.1. ESTUDI DE RM EN PACIENTS AMB CIRROSI	123
11.1.2. ESTUDI DE RM EN PACIENTS DURANT UN EPISODI D'EH	124
11.2. MODELS ANIMALS	125
11.2.1. MODEL D'INSUFICIÈNCIA HEPÀTICA AGUDA: DESVASCULARITZACIÓ	125
11.2.2. INSUFICIÈNCIA HEPÀTICA CRÒNICA: L·LIGADURA DEL CONDUCTE BILIAR	126
- FACTOR PRECIPITANT DE LA CASCADA NEUROINFLAMATÒRIA: LIPOPOLISACÀRIDS	127
11.3. GRAVIMETRIA	128
11.4. METABONÒMICA: ESTUDI DE METABOLISME AMB ¹³ C-GLUCOSA	128
11.5. RESSONÀNCIA MAGNÈTICA (RM)	129
11.5.1. PACIENTS	130
- SYMPHONY QUANTUM MAESTRO CLASS (1.5T)	130
- TRIO (3T)	131
11.5.2. ANIMALS: BRUKER BIOSPEC (7T)	132
- METABONÒMICA: BRUKER AVANCE	133
11.6. PROCESSAMENT DE DADES	133
11.6.1. TENSOR DE DIFUSIÓ: ANÀLISI BIEXPONENCIAL	134
11.6.2. LESIONS EN LES IMATGES FLAIR: ANÀLISI AMB JIM	135
11.6.3. ESPECTROSCÒPIA 'IN VIVO': ANÀLISI AMB LCMODEL	135
11.6.4. METABONÒMICA: ANÀLISI DE COMPONENTS PRINCIPALS	136
12. ANNEX I	141
13. ANNEX II	149

14. BIBLIOGRAFIA

171

INTRODUCCIÓ

2. INTRODUCCIÓ

El fetge, òrgan fonamental en el control del metabolisme intermediari, està implicat en múltiples funcions com la producció de la bilis per la digestió, el metabolisme de carbohidrats i de lípids; la síntesi de proteïnes i dels factors de coagulació; l'emmagatzematge de vitamines i de ions; o l'eliminació de substàncies tòxiques de la sang. Quan el fetge perd la seva funció sintètica i metabòlica es produeix una insuficiència hepàtica.

2.1. Metabolisme de l'amoni

El fetge és l'únic òrgan capaç de metabolitzar l'amoni de l'organisme a través del cicle de la urea. Aquest nitrogen de l'organisme prové bàsicament de la degradació proteica del múscul esquelètic, de la dieta i de la acció dels bacteris de l'intestí.

Quan hi ha una derivació porto-sistèmica o una insuficiència hepàtica es produeix un augment de la concentració d'amoni en sang. Es creu que aquest excés d'amoni és el responsable d'algunes de les greus complicacions cerebrals produïdes per la insuficiència hepàtica. L'amoni és capaç de travessar, per difusió passiva, la barrera hematoencefàlica i això causa un augment de la concentració d'amoni al cervell que estimula la síntesi de glutamina en els astròcits. La glutamina generada s'allibera a l'espai extracel·lular on serà recaptada per la neurona per metabolitzar-la i formar glutamat que és un metabòlit implicat en la neurotransmissió (Figura 2.1)(1).

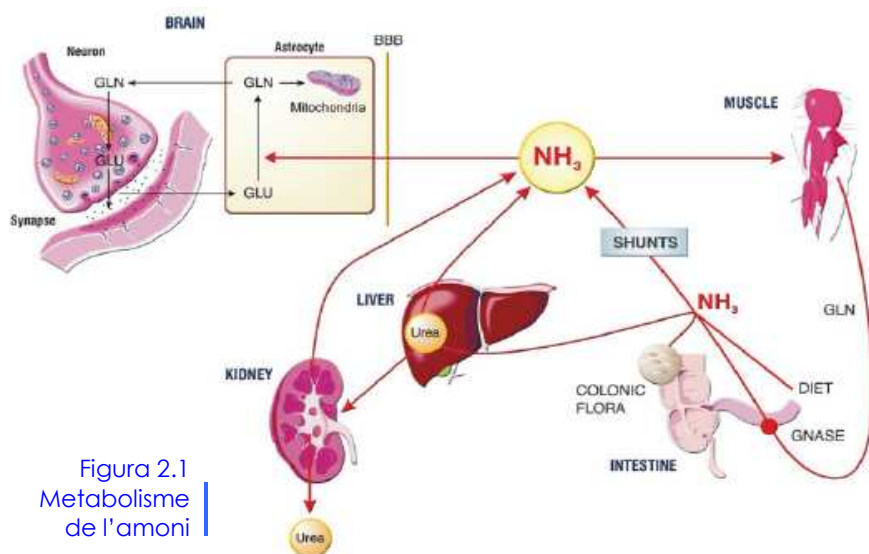


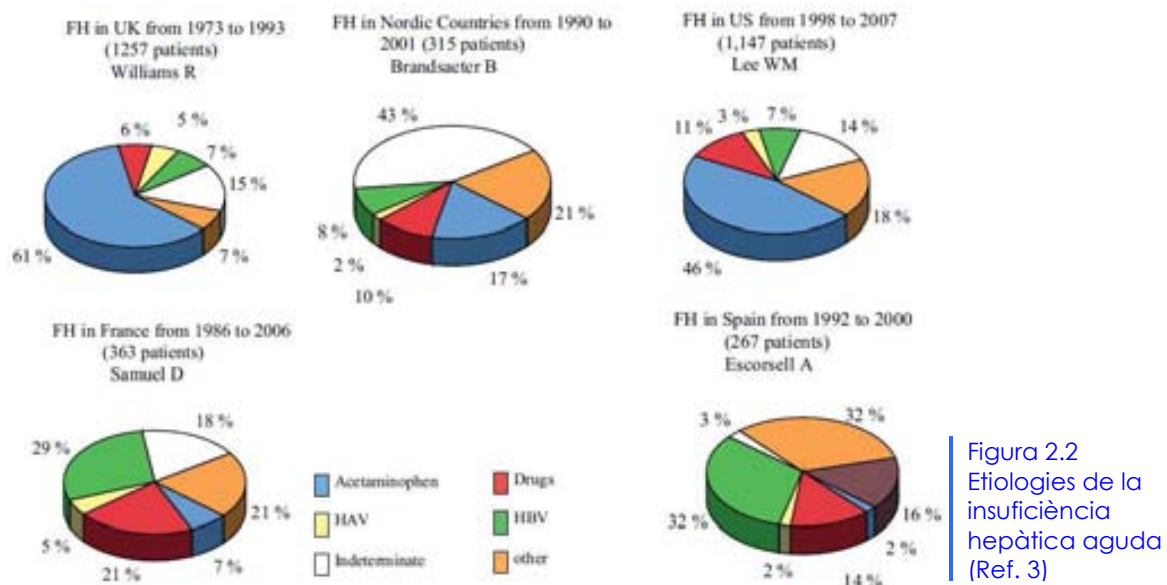
Figura 2.1
Metabolisme
de l'amoni

2.2. Tipus d'insuficiència hepàtica

2.2.1. Aguda

La insuficiència hepàtica aguda és un greu síndrome que normalment es desenvolupa per una hepatitis viral aguda (HVA, HVB, HVE), una intoxicació amb fàrmacs (paracetamol, teràpia antituberculosa) o una intoxicació ambiental o alimentària (com el consum d'*Amanita phalloides*). També pot ésser causada per malalties menys comuns com la malaltia de Wilson, la síndrome Budd-Chiari, la síndrome de Reye o l'hepatitis isquèmica.

Aquesta tipus insuficiència és poc freqüent en els països desenvolupats, com Espanya, on es donen un promig de 30 casos per any i on la causa predominant era l'hepatitis viral aguda (61/145 casos, 42%) (Figura 2.2) (2). En els últims anys s'ha vist disminuïda la incidència de l'etiologia viral fins al 30% (37/122 casos) mentre que ha augmentat els casos de reacció idiosincràtica a fàrmacs o per l'efecte de toxines (del 13 al 27%). Cal destacar que aquesta tendència també s'ha observat en altres països d'Europa (2;3).



La insuficiència hepàtica aguda es caracteritza per produir alteracions en diverses rutes metabòliques, on normalment està implicat l'amoníac. Encara que també estan involucrats altres factors que poden causar perturbacions a la funció cerebral com són l'activació de la resposta inflammatòria sistèmica, la disfunció circulatoria i el fracàs d'altres òrgans. Aquestes perturbacions poden induir el desenvolupament de

l'edema cerebral així com causar canvis en les rutes metabòliques i energètiques del cervell.

2.2.2. Crònica

La insuficiència hepàtica crònica és més freqüent i normalment es desenvolupa per un abús del consum d'alcohol, per hepatitis virals cròniques (HVC o HVB) o per l'obstrucció del conducte biliar. També existeixen algunes malalties autoimmunes, hereditàries o metabòliques que poden desenvolupar aquest tipus d'insuficiència com la malaltia de Wilson o l'hematocromatosis. Segons l'Institut Nacional d'Estadística al 2009 es van produir 20680 altes hospitalàries a Espanya degut a la malaltia hepàtica i a la cirrosi crònica (4). La taxa de mortalitat per cirrosi i per altres malalties cròniques del fetge era del 12 per cada 100.000 habitants (5).

2.3. Complicacions de la insuficiència hepàtica

La insuficiència hepàtica produeix complicacions que afecten al cervell com són desordres en el sistema nerviós central, augment del contingut d'aigua cerebral, alteracions de l'autoregulació del flux sanguini i canvis en el metabolisme cerebral.

2.3.1. Encefalopatia Hepàtica (EH)

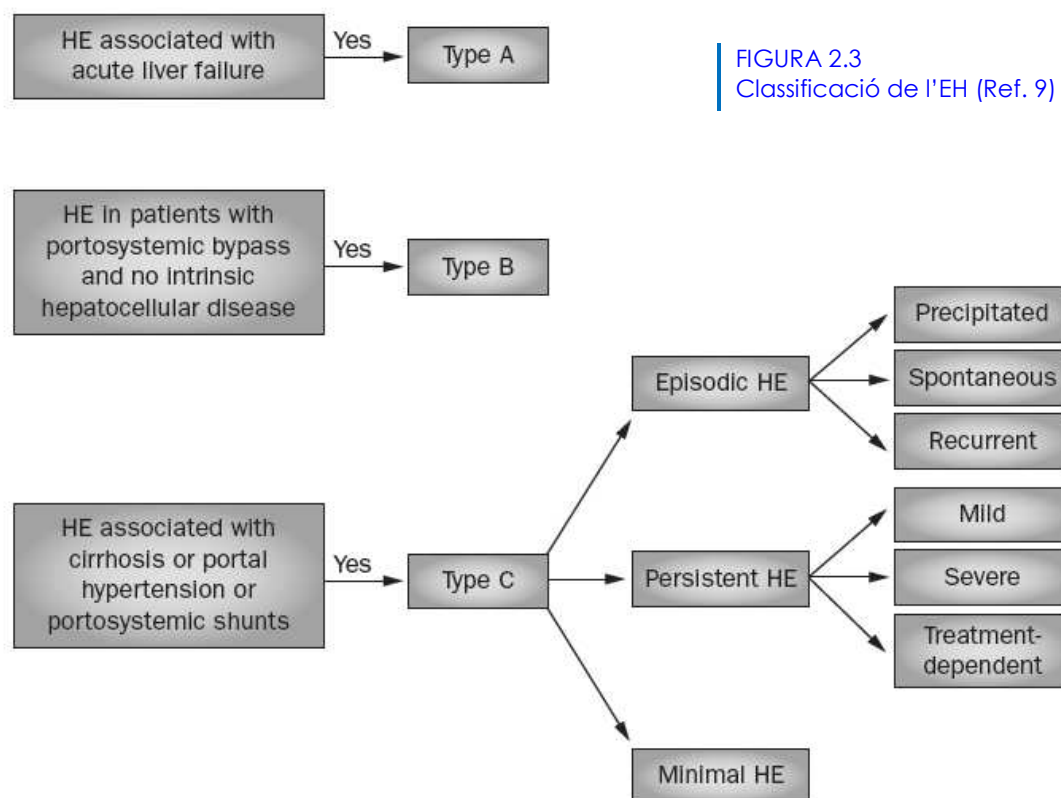
L'EH és una greu complicació produïda per una insuficiència hepàtica tant crònica com aguda. Els pacients amb EH manifesten desordres en el sistema nerviós central que van des de canvis neurològics mínims fins a un estat de coma. La qualitat de vida d'aquests pacients es troba afectada i això fa que l'EH sigui un element a considerar en les estratègies per la gestió clínica, per la prioritat del trasplantament hepàtic i per la supervivència del pacient (6).

La fisiopatologia de l'EH és complexa i es creu que l'amoni és la principal substància nociva tot i que, poden estar implicats altres mecanismes com ara modificacions de la barrera hematoencefàlica, alteracions en la neurotransmissió o anomalies en les vies GABAèrgiques i de les benzodiazepines (7).

- Classificació de l'EH

Existeixen tres classes d'EH que es classifiquen segons el tipus d'insuficiència hepàtica (Figura 2.3)(8;9).

- L'EH de tipus A està associada a la insuficiència hepàtica aguda com a resultat de processos inflamatoris severos i/o processos ràpids de necrosi hepàtica.
- L'EH de tipus B està relacionada amb pacients que tenen derivacions porto-sistèmiques en absència de dany al parènquima hepàtic. Aquest tipus d'encefalopatia és molt poc freqüent.
- L'EH de tipus C està vinculada a la cirrosi hepàtica. Aquest és el tipus d'encefalopatia més freqüent i es pot dividir en tres categories: EH mínima o latent, EH episòdica que pot ser precipitada, espontània o recurrent, i EH persistent que pot ser moderada, severa o dependre del tractament.



- Manifestacions neurològiques de l'EH

En els pacients amb insuficiència crònica bàsicament s'observa dos tipus de conseqüències neurològiques anomenades: l'EH latent o l'EH manifesta.

En l'EH latent, els pacients aparentment no tenen un episodi d'EH encara que tenen un deteriorament cognitiu que queda palès amb un estudi neuropsicològic. Entre el 20-70% dels pacients amb mala funció hepàtica pateixen aquest nivell subclínic

d'EH, el problema és que no existeix un sistema diagnòstic estandarditzat i el diagnòstic depèn del mètode establert en cada centre. S'estima que el 30% dels pacients amb EH mínima acabaran per manifestar EH episòdica. Una millora en les eines diagnòstiques per aquest estat subclínic podria permetre actuar de forma precoç (6).

L'EH manifesta és una complicació hepàtica que fa referència a un síndrome neuropsiquiàtric amb alteracions neurològiques i neuropsicològiques clàssicament reversibles. Actualment es creu que la reversibilitat d'aquest síndrome no és total. Entre el 10-50% dels pacients amb cirrosi o amb shunts porto-sistèmics pateixen un episodi d'EH durant el curs de la seva malaltia, però la falta d'un patró per avaluar la presència de EH repercuteix en la incidència d'aquesta complicació. A més, existeixen alguns factors que poden precipitar l'EH com són la dieta hiperproteica, el sagnat gastrointestinal, la infecció i l'empitjorament de la funció hepàtica (6).

Estudis recents han demostrat que els pacients cirròtics amb EH presenten un deteriorament cognitiu, especialment en la memòria, l'atenció i la funció motora. Aquest empitjorament es troba relacionat directament a la insuficiència hepàtica. Encara que, també s'ha vist associada a l'etiologia de la insuficiència hepàtica, així els pacients amb etiologia alcohòlica mostren pitjor funció cognitiva que els que tenen una hepatitis viral tipus C. Aquestes alteracions reverteixen després del trasplantament hepàtic tant a curt (6-12 mesos) com a llarg (6-9 anys) termini. No obstant, cal destacar que els pacients que tenen un nombre elevat d'episodis d'EH previ al trasplantament presenten una pitjor funció cognitiva. Es creu que el número d'episodis EH pot estar relacionat amb la degeneració neuronal (10;11). Tanmateix, altres complicacions de la cirrosi com la hiponatrèmia, o comorbiditats no relacionades amb la malaltia hepàtica com són les malalties cerebrovasculars o els efectes del tractament amb immunosupressors també poden afectar a la funció cognitiva.

En els pacients amb insuficiència hepàtica aguda l'EH es caracteritza per una disminució del nivell de consciència. Aquesta situació és diferent a altres alteracions que poden influir directament a la funció cerebral, com la hipoglucèmia o la sèpsia. Una característica de la insuficiència hepàtica aguda és que els nivells d'amoni

tendeixen a ser molt més elevats que els nivells d'amoni en la insuficiència crònica. Es considera que això pot contribuir a l'aparició de símptomes neuroexcitadors com l'agitació, les convulsions i les contraccions musculars multifocals (6).

- Tests neuropsicològics

Existeixen diverses proves que permeten avaluar el grau d'encefalopatia i determinar la funció cognitiva dels pacients amb EH (12).

El grau d'EH s'estableix amb el test West Haven que és una avaluació subjectiva del nivell d'atenció del pacient (Taula1).

Taula 1. West Haven: Estats clínic de l'encefalopatia hepàtica

Grau EH		Estat Mental
Baix grau	1	Confusió lleu, eufòria o depressió, manca de l'atenció, lentitud mental, desordre, arrossegament de les paraules quan parla, irritabilitat, patró de la son canviat, tremolors lleus.
	2	Somnolència, letargia, lentitud mental greu, evidents canvis de personalitat, conducta inapropiada, desorientació intermitent, manca del control d'esfínters, presència d'asterixis.
Alt grau	3	Somnolent però pot despertar-se, incapaç de realitzar tasques mentals, desorientació persistent, amnèsia, atacs ocasionals de ràbia, parla incoherent, confusió marcada, tremolors probablement absents.
	4	Coma (no respon a estímuls verbals o dolorosos)

La funció cognitiva es sol valorar a partir d'una bateria de qüestionaris neuropsicològics. Una bateria de proves neuropsicològiques que s'ha estès en molts països es l'anomenada PHEs (*psychometric hepatic encephalopathy score*). Altres tests bastant utilitzats són els que avaluen la memòria (*Auditory Verbal Learning Memory Test*); l'atenció i el processament de la informació (*Trail A, Symbol Digit Test*); i la funció psicomotora (*Grooved Pegboard*), la executiva (*Controlled Oral Word Association Test*) i la percepció visual (*Hooper Visual Organization test, Judgment of Line Orientation test*). Els resultats d'aquestes proves es transformen en uns índexs T, ajustats per l'edat, sexe i nivell d'educació, que mostren qualsevol desviació del grup control de persones sanes (T=50) (13). Es considera que un pacient cirròtic té EH

subclínica quan dos o més tests d'aquesta bateria es troben per sota a dues desviacions estàndards de la mitja ($T < 30$). També existeixen altres proves per determinar l'EH mínima com la freqüència crítica de parpelleig o l'*inhibitory control test* (14).

2.3.2. Edema Cerebral

L'edema cerebral també és una greu complicació observada en la insuficiència hepàtica. Encara que, no està clar quin paper juga aquest increment d'aigua en l'EH, sembla que l'amoni també està implicat en el mecanisme de formació de l'edema. Es creu que l'amoni té un efecte advers en la regulació dels osmolits, induint la formació de glutamina que és un reservori d'amoni cerebral i això contribueix a perpetuar l'edema cerebral.

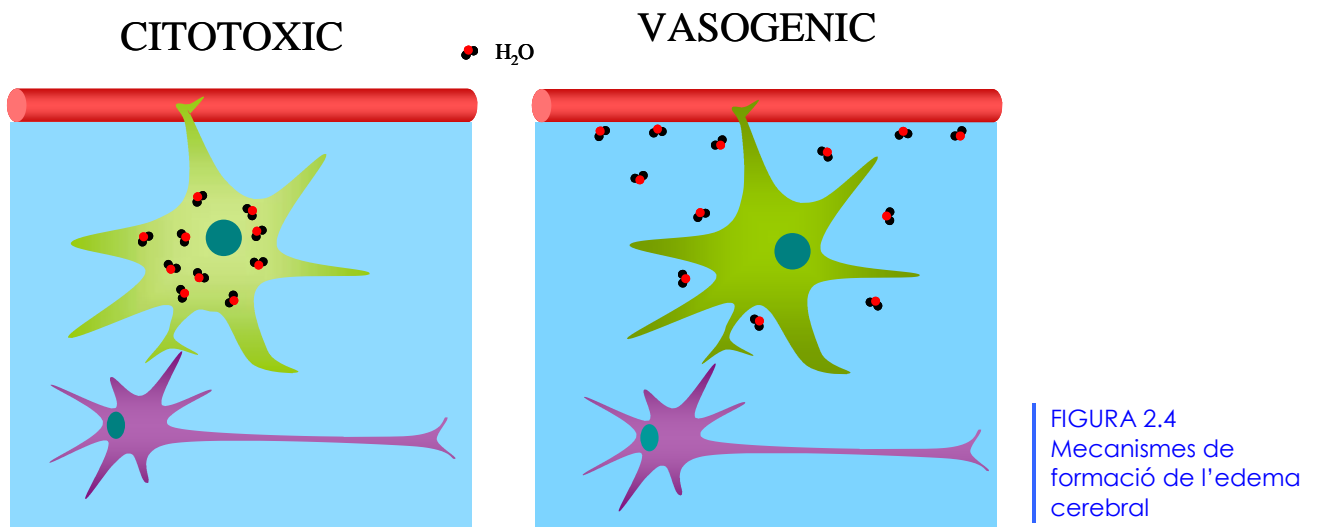
En pacients cirròtics s'ha observat un increment d'aigua cerebral i aquest increment es veu accentuat a mesura que augmenta el grau d'EH (15).

En els pacients amb insuficiència hepàtica aguda, aquest increment d'aigua cerebral és un dels problemes neurològics més importants ja que produeix un increment del volum cerebral i això genera un augment de la pressió dins del crani. Aquest augment de pressió activa mecanismes compensatoris mitjançant una disminució del volum en altres compartiments (en el líquid cefaloraquídi o en el volum de flux sanguini). Si no es corregeix aquest augment de pressió es pot generar una herniació del cervell i com a conseqüència la mort d'aquests pacients (s'estima una taxa de mortalitat del 70-80%) (16). A més, aquesta hipertensió intracranial pot estar exacerbada per augments sobtats en el volum sanguini cerebral secundaris a la vasodilatació. Actualment, les unitats de cures intensives estan molt ben equipades pel maneig d'aquests tipus de pacients i això ha fet disminuir la taxa de mortalitat degut a aquestes complicacions fins a una incidència de menys de 25% dels pacients (17).

- Mecanismes de formació de l'edema cerebral

Clàssicament, existeixen dos tipus de mecanismes de formació de l'edema cerebral i es va descriure per primera vegada en pacients amb isquèmia cerebral. En les fases inicials de la isquèmia es produeix un increment d'aigua a l'espai intracel·lular que pot arribar a produir lesió cel·lular i per això aquest mecanisme es va anomenar

edema citotòxic. En les fases tardanes de la isquèmia es produeix un trencament de la barrera hematoencefàlica que provoca un increment d'aigua a l'espai extracel·lular produint un edema de tipus vasogènic (Figura 2.4)(18).



Existeix certa controvèrsia per establir quin és el tipus de mecanisme implicat en la formació de l'edema cerebral observat en la insuficiència hepàtica (19-21).

2.3.3. Flux sanguini cerebral

El flux sanguini cerebral (FSC) és un procés dinàmic que es troba afectat per múltiples factors i que està directament relacionat amb la viabilitat del teixit cerebral. En condicions normals, el FSC es manté estable encara que es donin canvis en la pressió de perfusió cerebral ja que s'activen mecanismes compensatoris que provoquen canvis en el diàmetre de les arterioles cerebrals. Aquest procés de compensació anomenat autoregulació es deteriora quan existeix una insuficiència hepàtica o una hiperamonèmia (22).

Aquestes variacions del FSC s'han estudiat en pacients amb insuficiència aguda i s'ha proposat un mecanisme de desenvolupament que consta de 5 fases. Aquest mecanisme es va proposar en un estudi retrospectiu amb 26 pacients on es suggereix que primer es produeixen canvis en el FSC que contribueixen a augmentar la pressió intracranial i l'aigua cerebral (23).

2.3.4. Metabolisme Cerebral

El cervell, que representa un 2% de la massa corporal, és un òrgan amb un alt requeriment energètic i aproximadament, consumeix un 20% de l'oxigen i de la glucosa de l'organisme. Tradicionalment la glucosa s'ha considerat com el substrat energètic universal de les cèl·lules neuronals per a l'activitat cerebral.

L'astròcit és una cèl·lula estretament relacionada amb la neurona i es considera que actua com a principal proveïdor dels substrats necessaris pel metabolisme cerebral. En els últims anys, els investigadors neuroenergètics han incorporat una nova hipòtesi on es postula que les neurones també utilitzen el lactat (bàsicament subministrat pels astròcits) com a substrat aeròbic per la fosforilació oxidativa en l'activitat glutamatèrgica. El glutamat sembla tenir un paper clau en la producció de lactat. L'exposició del glutamat en els astròcits produeix un augment dels transportadors de glucosa (GLUT1) que va en paral·lel a un augment del consum de glucosa. A més, l'absència de transportadors aspartat/glutamat en els mitocondris dels astròcits afavoreix la formació de lactat per tal de mantenir el flux glicolític. Finalment, aquest lactat s'allibera a l'espai extracel·lular i es recapta per la neurona on l'incorpora de nou a la via de la glicòlisi (Figura 2.5)(24;25).

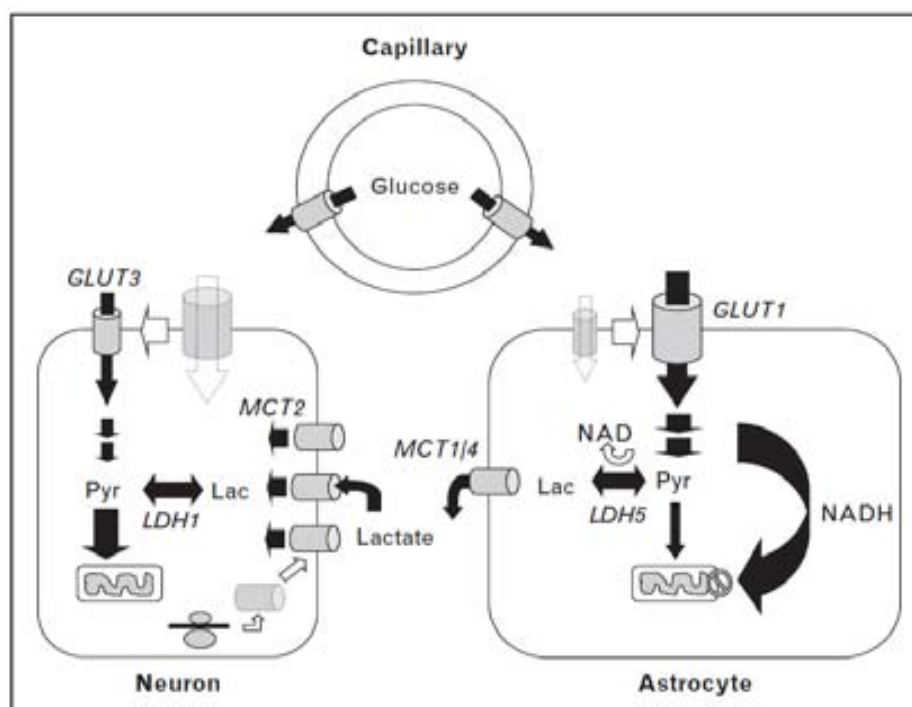


Figura 2.5
Metabolisme
energètic: neurona-
astròcit (Ref. 25)

En el metabolisme cerebral també existeix un procés anomenat anaplerosi. L'anaplerosi, o la formació 'de novo' dels intermedis del cicle dels àcids

tricarboxílics, és un fenomen de compensació per la pèrdua dels intermediaris d'aquest cicle, especialment de l'alfa-cetoglutarat. La pèrdua de l'alfa-cetoglutarat es produeix per l'alliberament de glutamat i GABA de les neurones i aquesta pèrdua es compensa per l'absorció de la glutamina de la glia (26).

En els pacients amb insuficiència hepàtica es produeixen alteracions en el cicle de glutamat/glutamina, ja que la formació de la glutamina contribueix a la detoxificació de l'excés d'amoni i això pot produir canvis en el metabolisme cerebral (27).

2.4. Tècniques de Neuroimatge

El desenvolupament de noves tecnologies no invasives ha permès avaluar la morfologia i la funció cerebral '*in vivo*' i això ha estat crucial per entendre la patogènesi de diferents desordres neurològics(28).

Aquestes metodologies proporcionen des d'informació microscòpica, com dóna la microscòpia confocal o les imatges bioluminiscentes, fins a informació morfològica, fisiològica o funcional utilitzant tècniques com la ultrasonografia Doppler transcranial, la tomografia axial computeritzada, la ressonància magnètica (RM) o les imatges obtingudes amb lligands radioactius (28).

Aquests mètodes s'han anat incorporant progressivament a la pràctica clínica diària per avaluar les alteracions cerebrals produïdes per la insuficiència hepàtica crònica o aguda. En aquesta tesi s'ha utilitzat la RM i, a continuació, es presenta la tècnica i una revisió sobre la informació que ha aportat en la insuficiència hepàtica.

2.4.1. Ressonància Magnètica

La RM és una tècnica que proporciona informació anatòmica, metabòlica i funcional. Es basa en el fenomen físic de ressonància magnètica que tenen alguns nuclis atòmics (els més comuns són ^1H , ^{31}P , ^{23}Na , ^{13}C) quan es sotmeten a un camp magnètic potent. Aquests nuclis poden absorbir energia a una determinada radiofreqüència i l'alliberació d'aquesta energia indueix un senyal elèctric que, segons com es genera i processa, proporciona una imatge o un espectre dels metabòlits.

2.4.2. Tècniques de Ressonància Magnètica

Existeixen diferents tècniques de RM que es poden agrupar en dos grans grups, els mètodes d'imatge i els d'espectroscòpia.

- Tècniques d'imatge

Els mètodes d'imatges es basen en la informació que proporcionen els àtoms d'hidrogen de les molècules que, principalment, provenen de l'aigua i els lípids presents en el cos humà. En les tècniques d'imatge s'estudia com evolucionen el conjunt d'àtoms d'hidrogen que es troben en unitats de volum que s'anomenen vòxels. Els nuclis presents en un vòxel sota un camp magnètic adquireixen unes propietats magnètiques que es representen de manera conjunta en el que s'anomenen magnetització. Aquesta magnetització és proporcional a la densitat d'àtoms d'hidrogen que conté el vòxel i es troba alineada a la mateixa direcció del camp magnètic. En enviar una emissió de radiofreqüència a la mateixa freqüència de precessió, els nuclis absorbeixen l'energia i la magnetització es desplaça de l'estat d'equilibri. Quan s'acaba l'emissió de radiofreqüència, la magnetització d'aquests àtoms torna al seu estat inicial en un procés d'alliberament d'energia que s'anomena relaxació. Aquesta relaxació ve regida per dues propietats inherents a l'entorn en que es troben els nuclis i, per tant, a un determinat camp magnètic són fixes. Aquestes dues propietats s'anomenen temps de relaxació longitudinal (T1) i temps de relaxació transversal (T2) (29). La ressonància magnètica es capaç de proporcionar imatges basades en aquestes propietats i en la concentració en que es troben els nuclis i s'anomenen, respectivament, imatges potenciades en T1, imatges potenciades en T2 i imatges potenciades en densitat protònica. D'aquesta manera, les imatges potenciades en la intensitat del senyal són directament proporcional a la concentració d'àtoms d'hidrogen. Per tant aquells teixits que tinguin poca densitat de protons com l'os cortical o els lligaments apareixen hipotenses i en canvi, aquells teixits amb alta densitat protònica com el teixit adipós o l'aigua lliure es veuen hipertenses (Figura 2.6). Les imatges potenciades en T1, la intensitat de senyal és directament proporcional a la facilitat de relaxació energètica i inversament proporcional al valor de T1. Així, en aquest tipus d'imatges l'aigua lliure apareix hipointensa pel seu elevat valor de T1 i el greix es veu hiperintens pel seu valor curt de T1 (Figura 2.6). En canvi, en les imatges potenciades en T2, la intensitat del senyal és proporcional a la poca estructuració dels àtoms d'hidrogen amb l'entorn i directament proporcional al valor de T2. Per tant, l'aigua

lliure apareix hiperintensa pel seu valor de T2 elevat i el múscul es veu hipointens amb un valor de T2 curt (Figura 2.6). Si no es corregeixen les heterogeneïtats produïdes pel camp magnètic s'obtenen un subtipus d'imatges anomenades T2* que mostren un millor contrast entre certs teixits com entre el cartílag i l'os cortical (30).

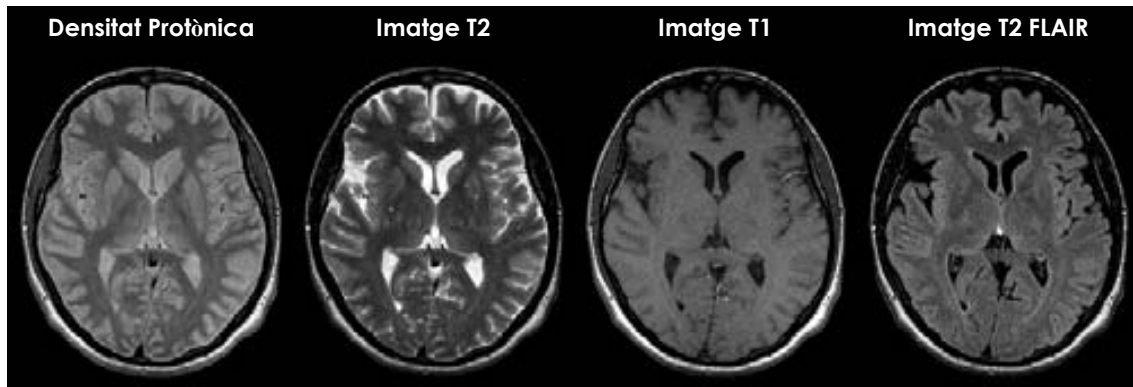


Figura 2.6 Diferents tipus de contrastos que donen els diferents tipus d'imatge: densitat protònica, imatges amb contrast T2, imatges amb contrast T1, i imatges amb contrast T2 on s'ha aplicat una seqüència FLAIR.

Adicionalment, en aquestes imatges es poden utilitzar unes seqüències anomenades d'inversió/recuperació que permeten eliminar el senyal d'algun tipus de teixit. Normalment s'utilitzen per anul·lar el senyal del greix (seqüència STIR) o el senyal del líquid cefaloraquídi (seqüència FLAIR) (Figura 2.6)(30).

Actualment existeix una nova tècnica on s'obtenen unes imatges anomenades de transferència de magnetització. Aquesta tècnica es basa en que tots els nuclis d'hidrogen no estan en un mateix entorn. Per una banda hi ha nuclis d'hidrogen amb un moviment més restringit que formen part de les macromolècules o de les capes d'hidratació. Per l'altra hi ha els nuclis d'aigua lliure que no tenen restricció de moviments i estan en continu bescanvi amb els nuclis d'hidrogen anteriorment descrits. Per aconseguir el contrast d'aquestes imatges el que es fa és enviar un pols de saturació a la freqüència dels nuclis més immobilitzats abans d'iniciar la seqüència de polsos d'excitació. D'aquesta manera s'obté una nova imatge en la que el senyal està reduït en funció de la importància d'aquestes interaccions amb l'entorn. Mitjançant l'adquisició de la imatge potenciada en densitat sense i amb aquest tipus de contrast es pot generar, matemàticament, una nova imatge anomenada relació de transferència de magnetització (*magnetic transfer ratio, MTR*). Aquesta imatge proporciona el percentatge de canvi entre les imatges potenciada en densitat (I_0) i les imatges amb contrast de transferència de

magnetització (I_{MT}) d'acord amb la següent equació $MTR = [(I_0 - I_{MT}) / I_0] \cdot 100$. La imatge MTR és quantitativa i dóna informació sobre la relació entre els nuclis d'hidrogen lliures i els nuclis d'hidrogen lligats (Figura 2.7) (31;32).

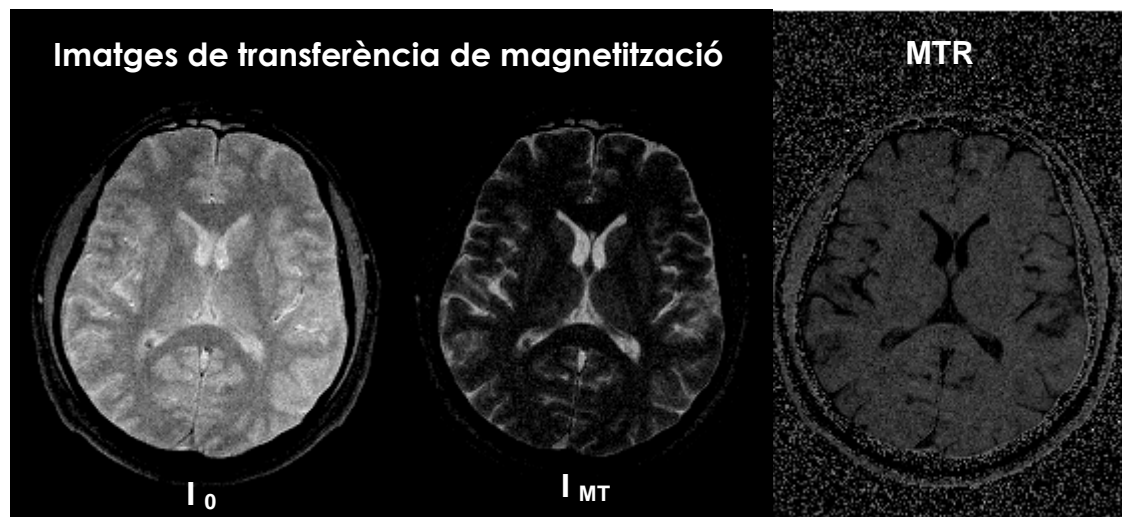


Figura 2.7 Imatges de transferència de magnetització: imatge de T2 (dreta), imatge de amb transferència de magnetització (centre) i imatge on es representa la relació de transferència de magnetització (MTR).

Però la RM també pot generar altres tipus d'imatges que donen coneixement sobre la funcionalitat dels teixits, com les imatges de difusió o les imatges d'activitat neuronal.

Les imatges de difusió es basen en estudiar la difusió molecular de l'aigua lliure pels diferents teixits (Figura 2.8) (33). Per aconseguir obtenir imatges de difusió cal aplicar gradients de camp magnètic en diferents direccions durant el període d'evolució del senyal de RM que venen definits pel factor de difusió (b). El senyal d'aquestes imatges és inversament proporcional al factor de difusió (b) i es descriu per una corba exponencial decreixent. A partir d'imatges obtingudes amb diferents valors de b i en diferents direccions es poden obtenir imatges quantitatives del coeficient aparent de difusió (ADC) o difusivitat mitja (MD) que caracteritza la mobilitat de les molècules pel medi o imatges de la fracció d'anisotropia (FA) que és una mesura de la integritat estructural. El problema d'aquest tipus d'imatge és l'elevada sensibilitat al moviment que pot causar diversos artefactes.

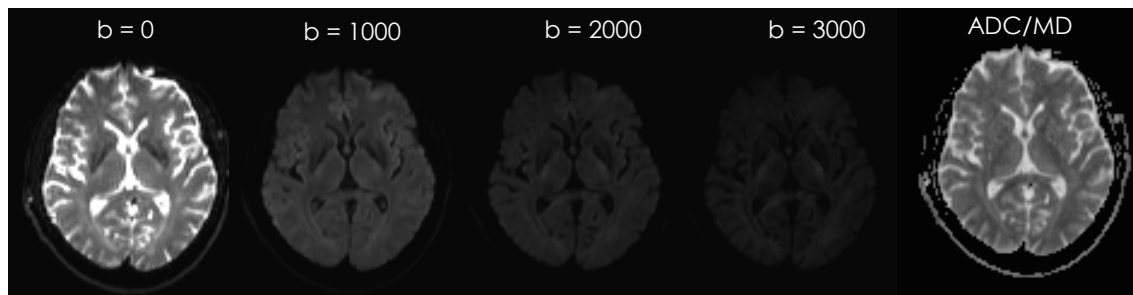


Figura 2.8 Imatges de difusió: imatges adquirides amb diferents factors de difusió (b , en s/mm^2) i la imatge on es representa el coeficient de difusió (ADC o MD, en mm^2/s).

- Espectroscòpia

L'espectroscòpia és una tècnica analítica utilitzada per determinar l'estructura molecular d'un compost químic però també serveix per determinar la composició metabòlica de diferents teixits. En situació patològica es poden detectar alteracions d'alguns dels pic dels metabòlits i fins i tot, identificar nous pics que es poden considerar com a biomarcadors de la patologia. Per aquesta raó, un camp important de l'espectroscòpia per la identificació de patrons metabòlics característics d'una determinada patologia.

En general, l'espectroscòpia es pot realitzar *'in vivo'* o *'ex vivo'* la diferència entre ambdós mètodes és la quantitat d'informació que s'obté degut a la complexitat de la mostra (Figura 2.9). A més, l'espectroscòpia es pot realitzar de diferents àtoms i segons el tipus d'àtom, s'aconsegueix diferent informació metabòlica (34).

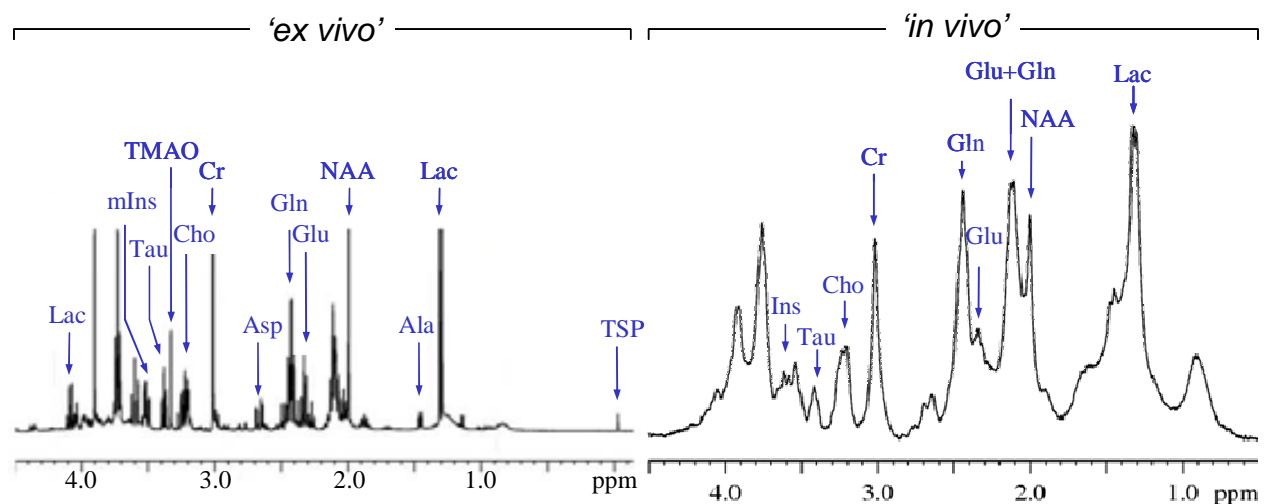


Figura 2.9 Espectroscòpia de protó del cervell de rata amb insuficiència hepàtica aguda realitzada *'ex vivo'* a partir d'un extracte o realitzada *'in vivo'*. Metabòlits: Lac, lactat; NAA, N-acetilaspartat; Glu, glutamat; Gln, glutamina; Cr, creatina; Cho, derivats de colina; Tau, taurina; mIns, myo-inositol; Ala, alanina; Asp, aspartat; TMAO, òxid de trimetilamina; TSP, trisililpropionat (referència externa).

Els primers estudis espectroscòpics (*'in vivo'* i *'ex vivo'*) realitzats van ser amb fòsfor 31. Aquesta espectroscòpia permet mesurar el metabolisme energètic ja que dona informació sobre els pics de fosfocreatina, adenosina trifosfat (ATP) i fosfat inorgànic. També es pot mesurar el pH intracel·lular a partir de la distància entre els pics del fosfat inorgànic i la fosfocreatina. A mesura que es van anar desenvolupant les tècniques de supressió del senyal d'aigua i de localització espacial, l'espectroscòpia de protó va adquirir més importància (34). Actualment, l'espectroscòpia de protó és la més utilitzada ja que l'àtom d'hidrogen és el més sensible, amb una abundància natural de casi el 100% i es troba en quasi tots els metabòlits d'interès biològic. També existeixen espectroscòpies amb altres àtoms que permeten obtenir informació sobre una via metabòlica específica. Per exemple, l'espectroscòpia de carboni 13 permet estudiar els metabòlits relacionats amb la glucòlisi i amb l'espectroscòpia de fluor 19 es pot observar el metabolisme d'alguns fàrmacs que contenen aquest àtom (35;36).

2.4.3. Estudi de l'edema cerebral per RM

L'avaluació de l'edema cerebral és un element clau per esbrinar les alteracions produïdes per la insuficiència hepàtica. Existeixen diverses tècniques que permeten avaluar, de manera directa o indirecta, el contingut d'aigua del cervell així com valorar la distribució d'aquesta aigua pels teixits.

Les imatges de la relació de transferència de magnetització (MTR) permeten quantificar la proporció d'aigua lliure/aigua lligada del cervell. D'aquesta manera, aquelles zones amb poca quantitat d'aigua lligada tenen valors baixos de MTR i al contrari, aquelles zones amb més quantitat de protons lligats els valors són més elevats. En cas que, en situació patològica hi hagi una disminució d'aquest índex, pot indicar la presència d'un edema inflamatori sense destrucció de mielina o una destrucció de mielina ja que el colesterol que conté és una de les principals fonts d'aigua lligada que es troba al cervell (37;38).

Com s'ha explicat abans, les imatges potenciades en T2 donen informació sobre la interacció de les molècules amb l'entorn, on les zones amb aigua lliure surten hiperintenses (líquid cefaloraquidi). Per tant, en aquelles zones on l'aigua es trobi més estructurada, degut a la formació de capes d'hidratació o a la interacció amb macromolècules, la imatge de T2 serà menys intensa que en aquelles zones on

l'aigua es troba lliure de restriccions. Es pot aprofitar la informació d'aquest tipus d'imatge per avaluar l'edema cerebral ja que un augment del contingut d'aigua al cervell alteraran els valors de T2 i a la imatge es pot traduir en l'existència d'una regió hiperintensa (39;40).

Alternativament, les imatges de difusió permeten estudiar la mobilitat de l'aigua lliure al cervell. En els teixits, la difusió depèn de la direcció ja que l'aigua lliure tendeix a moure cap a la direcció més fàcil del teixit. Per exemple, en la substància blanca l'aigua lliure es mourà amb més facilitat si es desplaça en la mateixa direcció dels axons que si es desplaça en la direcció perpendicular. Això es coneix com a difusió anisotròpica. Per estudiar aquest tipus de difusió s'han desenvolupat les tècniques basades en el tensor de difusió. Al aplicar aquestes tècniques s'obtenen paràmetres útils per avaluar la mobilitat de l'aigua de forma independent de la direcció (el coeficient de difusió) i per avaluar la integritat estructural del teixit (la fracció d'anisotropia). Una de les avantatges de les imatges de difusió respecte a les imatges en T2 és que són més sensibles per detectar petites alteracions. Per exemple, en una situació d'isquèmia aguda les imatges de difusió poden detectar alteracions que no es poden detectar amb les imatges potenciades en T2 (33).

Els estudis de difusió han permès determinar els diferents mecanismes de formació de l'edema cerebral en l'ictus. En una situació d'accident isquèmic es pot diferenciar dues fases. Una primera fase, anomenada fase aguda o edema citotòxic, caracteritzada per un augment del senyal en les imatges de difusió i una disminució del coeficient aparent de difusió sense canvis en les imatges potenciades en T2. Aquestes alteracions es deuen a un increment d'aigua a nivell intracel·lular. La segona és la fase crònica on es produeix un augment dels valors del senyal en les imatges potenciades en T2, una disminució del senyal de difusió i un augment del coeficient aparent de difusió. Aquestes alteracions indiquen un increment d'aigua lliure a l'espai extracel·lular anomenat edema vasogènic(18). Aquestes alteracions de la difusió relacionades amb els mecanismes de formació de l'edema cerebral també s'han observat en altres patologies. En una situació d'hiponatrèmia es produeix un edema citotòxic degut a la fallada de la bomba de sodi/potassi que no està associat a un procés d'isquèmia cerebral i que causa una disminució del coeficient de difusió (41). En canvi l'edema cerebral peritumoral,

que es genera com a conseqüència de l'increment de la permeabilitat de la barrera hematoencefàlica, provoca un augment d'aigua en el compartiment intersticial (mecanisme vasogènic) i es caracteritza per un increment del coeficient de difusió (42).

Actualment, s'han dissenyant nous mètodes més sofisticats per obtenir una quantificació absoluta d'aigua al cervell. Bàsicament consisteix en aplicar unes determinades seqüències per obtenir imatges potenciades en T1 i T2. Aquestes imatges s'adquireixen utilitzant una referència externa que permet determinar la concentració absoluta d'aigua (43).

2.4.4. Estudi del metabolisme cerebral per RM

L'espectroscòpia és una tècnica utilitzada per avaluar el metabolisme cerebral tant en l'àmbit clínic com en la investigació experimental.

L'espectroscòpia de protó '*in vivo*' cerebral permet detectar els senyals de diferents metabòlits així com el senyal de lípids i macromolècules (44). Alguns d'aquests metabòlits són de gran interès neurocientífic. Per exemple, l'*N*-acetilaspargat (NAA), que es troba exclusivament a les neurones i es considera com un marcador de viabilitat i/o pèrdua neuronal. Com que l'enzim responsable de la síntesi de l'*N*-NAA es troba al mitocondri, una reducció de NAA també podria indicar una disfunció mitocondrial. També es pot detectar els derivats de la colina. La colina és un precursor de la fosfatidilcolina que representa al voltant del 40% del contingut de fosfolípids de la membrana cel·lular. A més aquest pic també correspon a la glicerofosforilcolina (subproducte del trencament de la fosfatidilcolina), la fosfocolina (un altre precursor de la fosfatidilcolina), l'acetilcolina i la colina lliure. Per tant, alteracions en la síntesi de la membrana cel·lular poden produir canvis en el pic de colina. El *myo*-inositol està considerat com a putatiu marcador de la neuroglia. El glutamat és un neurotransmissor excitador i també és un precursor per la síntesi de glutamina. En canvi l'àcid gamma-aminobutíric (GABA) és un neurotransmissor inhibitori (35).

Un altre tipus d'espectroscòpia és la del carboni 13. Aquest tipus d'àtom està en poca abundància natural (1%) i això fa que el temps d'adquisició dels espectres sigui alt i que normalment els estudis es realitzin '*ex vivo*'. En aquests estudis es sol

administrar glucosa marcada amb carboni 13 per enriquir la quantitat de carboni 13 de les mostres i així poder obtenir més relació senyal/soroll en els espectres. Aquest tipus d'espectroscòpia és útil per seguir el metabolisme de la glucosa. En l'espectre del metabolisme de la glucosa s'obté els pics del lactat i l'alanina, que donen informació sobre la via anaeròbica de la glicòlisi, i els pics del glutamat i la glutamina que donen informació de la via aeròbica. A més, depenent de la posició del marcatge d'aquets últims metabòlits, es pot diferenciar quina és la ruta enzimàtica utilitzada. D'aquesta manera, el glutamat i la glutamina marcats en la posició 4 de la molècula indiquen que la glicòlisi ha anat per via piruvat deshidrogenasa, en canvi si el marcatge es troba en la posició 2 es deu a una glicòlisi via piruvat carboxilasa que és un enzim específic dels astròcits (Figura 2.10)(45).

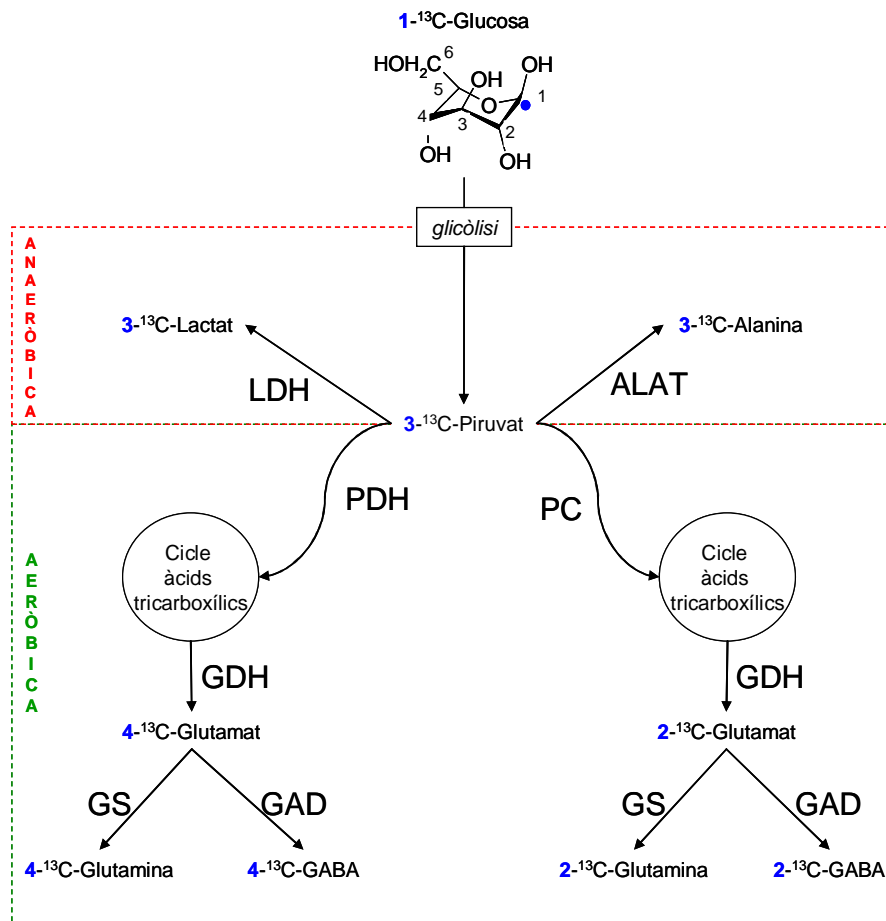


Figura 2.10 Metabolisme de la 1-¹³C-Glucosa. LDH, lactat deshidrogenasa; ALAT, alanina transaminasa; PDH, piruvat deshidrogenasa; PC, piruvat carboxilasa; GDH, glutamat deshidrogenasa; GS, glutamina sintetasa, GAD, glutamat descarboxilasa.

Recentment s'han dissenyat noves seqüències que permeten obtenir imatges espectroscòpiques per veure la distribució dels metabòlits en els diferents teixits

cerebrals (46). També s'han dissenyat nous instruments com l'hiperpolaritzador que permet seguir el metabolisme de carboni 13 'in vivo' (47).

2.4.5. Alteracions en la insuficiència hepàtica

Els estudis de RM han permès avaluar les diferents alteracions cerebrals que pateixen els pacients amb insuficiència hepàtica. Gairebé tots els estudis clínics s'han realitzant en la insuficiència crònica ja que com ja s'ha esmentat la situació aguda es produeix en baixa freqüència.

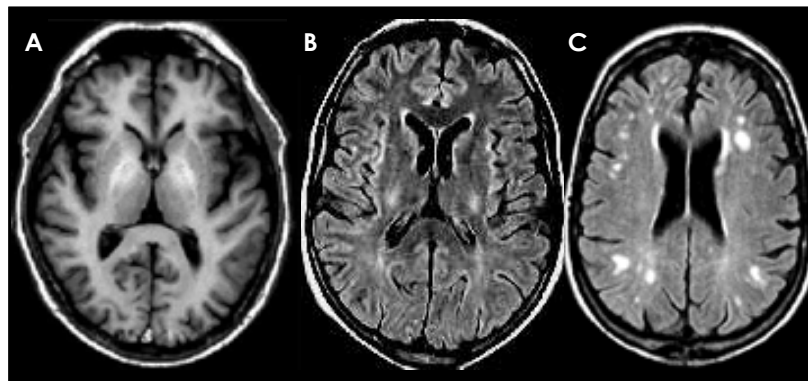
En pacients cirròtics s'han descrit imatges potenciades en T1 característiques, on s'observen hiperintensitats situades en els ganglis de la base (Figura 2.11 A). Aquestes hiperintensitats corresponen a una acumulació de substàncies paramagnètiques que probablement es deu a una deposició de manganès com a conseqüència dels shunts porto-sistèmics (48). Aquest procés d'acumulació és lent i és el responsable que aquests pacients desenvolupin cert grau de parkinsonisme com la bradicinèsia o la rigidesa. Tanmateix, aquestes alteracions no solen estar present en pacients amb insuficiència hepàtica aguda encara que existeix un estudi que descriu aquest tipus d'alteracions en un pacient amb insuficiència hepàtica aguda produïda per una hepatitis del virus E i amb signes de parkinsonisme (49).

En estudis de transferència de magnetització realitzats en pacients amb cirrosis i EH mínima s'ha observat una disminució de l'índex de transferència de magnetització en la regió de substància blanca parietal. Aquesta disminució pot ser atribuïble a una deposició de manganès o a un increment d'aigua cerebral. Però els valors d'aquest índex es normalitzen ràpidament després del transplantament hepàtic i això dona suport a la hipòtesi d'un edema cerebral de baix grau, probablement secundari a un increment de la glutamina cerebral (50). S'ha observat que existeix una correlació negativa entre l'índex de transferència de magnetització i el grau de EH tant en els ganglis de la base (probablement degut a la deposició de manganès) com en la substància blanca (51). Els estudis de quantificació absoluta d'aigua cerebral demostren que existeix un increment significatiu d'aigua en els pacients cirròtics indicatiu de l'existència d'un edema cerebral i a més aquest increment augmenta amb el grau d'EH (15).

Altres treballs han estudiat les alteracions que es produeixen en les imatges potenciades en T2 i de difusió. Els pacients cirròtics mostren unes hiperintensitats difuses en les imatges T2 que es troben situades en la regió corticoespinal (Figura

2.11 B)(52). En estudis de neurofisiologia s'ha observat que la regió corticoespinal d'aquests pacients és especialment susceptible(52). Cal afegir que aquestes hiperintensitats es resolen després del transplantament hepàtic(53). Els estudis de difusió en pacients amb insuficiència hepàtica mostren alteracions en la mobilitat d'aigua cerebral. En els pacients cirròtics es veu un augment del coeficient aparent de difusió que s'ha postulat com un increment d'aigua a l'espai extracel·lular (54). Per tant, tots aquests resultats obtinguts amb els diferents tipus d'imatges semblen corroborar la existència d'un edema cerebral en els pacients amb insuficiència hepàtica.

Figura 2.11 Imatges potenciades en T1 (A) i en T2 (B, C) en pacients amb cirrosi



Destacar que en els estudis amb imatges potenciades en T2 on s'utilitza una seqüència FLAIR s'observen unes hiperintensitats focals distribuïdes en la substància blanca (Figura 2.11 C)(53). Aquestes lesions s'assemblen a les que es veuen en pacients amb malaltia cerebrovascular de petit vas com l'arteriosclerosi, l'angiopatia amiloide cerebral o l'arteriopatia cerebral autosòmica dominant amb infarts subcorticals i leucoencefalopatia. Per tant, aquestes lesions semblen indicar que els pacients cirròtics tenen malaltia de petit vas (55).

En estudis de volumetria amb pacients cirròtics es detecta un augment de la mida dels ventricles que és una mesura indirecta del volum cerebral. Aquest augment del volum ventricular persisteix després del transplantament hepàtic tant a curt (6-12 mesos) com en llarg termini (6-9 anys) i això indica que aquests pacients tenen cert grau d'atròfia (56). Aquest resultat s'han confirmat en treballs posteriors on s'ha realitzat un estudi de volumetria de tot el cervell (10).

En els estudis espectroscòpics d'aquests pacients s'observen patrons metabòlics característics definits per un augment dels pics de glutamat i glutamina i una

disminució del pic de colina tant en la insuficiència hepàtica aguda com en la crònica (57-59). A més, en la situació crònica també es veuen disminuïts els pics de myo-inositol i NAA (58) (Figura 2.12).

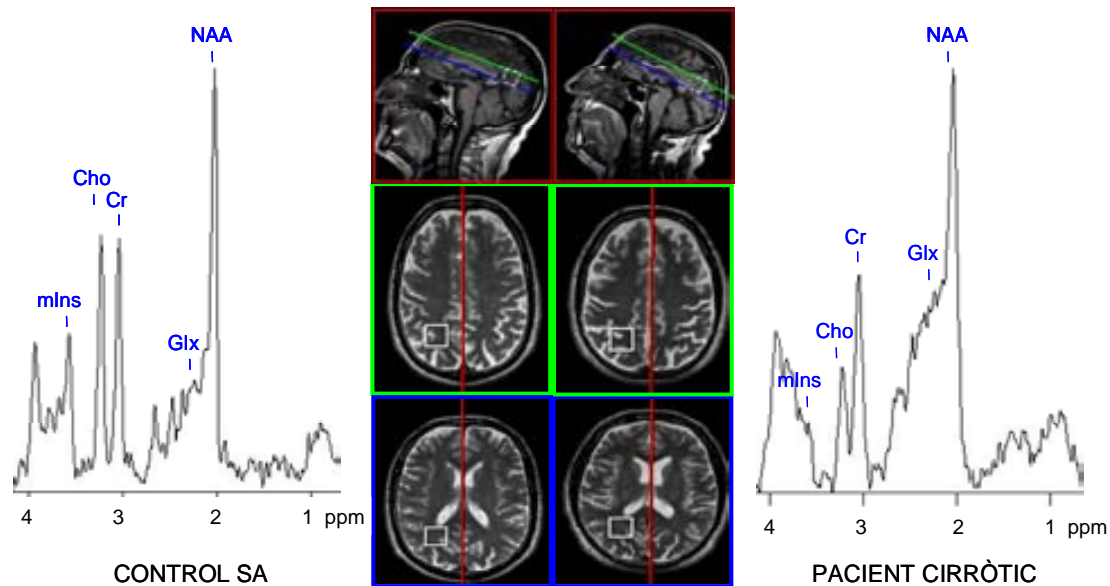


Figura 2.12 Espectre localitzat a substància blanca parietal amb un espectròmetre de 1.5 Tesla
NAA, n-acetilaspargat; Glx, glutamina i glutamat; Cr, creatina; Cho, derivats de colina; mIns myo-inositol

Recentment s'ha demostrat que existeix una disminució del NAA en pacients cirròtics que han patit algun episodi d'EH. Aquest metabòlit és considerat com un marcador neuronal i pot indicar que aquests pacients pateixen cert grau de degeneració i atrofia cerebral (10).

HIPÒTESI I OBJECTIU

3. HIPÒTESI

En la insuficiència hepàtica apareix edema cerebral degut a les conseqüències que té el metabolisme de l'amoniac en la funció de l'astròcit, que són diferents en la forma aguda i crònica.

4. OBJECTIU

Estudiar les característiques de la distribució de l'edema cerebral secundari a la insuficiència hepàtica aguda i crònica i la seva relació amb els metabòlits cerebrals, en models experimentals i en pacients, per obtenir informació sobre els processos fisiopatològics que hi participen.

ESTUDI 1

5. ESTUDI 1

Les imatges de tensor de difusió donen suport a l'origen citotòxic de l'edema cerebral en un model experimental d'insuficiència hepàtica aguda.

5.1. Introducció

L'edema cerebral és una greu complicació de la insuficiència hepàtica aguda que s'ha relacionat amb l'augment d'amoni en sang produït per la mala funció hepàtica. S'ha proposat l'existència de dos tipus de mecanismes en el desenvolupament de l'edema: vasogènic associat a un trencament de la barrera hematoencefàlica i citotòxic causat pel metabolisme de l'amoni als astròcits.

5.2. Objectiu

Estudiar l'edema cerebral en un model experimental d'insuficiència hepàtica aguda per obtenir informació sobre els mecanismes de desenvolupament de l'edema cerebral en l'EH. També es va avaluar les implicacions associades en el metabolisme cerebral.

5.3. Materials i mètodes

Es va realitzar un estudi de RM 'in vivo' per estudiar la distribució intracel·lular o extracel·lular de l'aigua cerebral en un model animal d'insuficiència hepàtica aguda produït per una devascularització hepàtica. També es va quantificar el contingut d'aigua cerebral a partir d'estudis gravimètrics. D'altra banda es va analitzar el metabolisme cerebral 'in vivo' i 'ex vivo' (resultats addicionals) mitjançant espectroscòpia de protó i de carboni-13. La valoració de la integritat de la barrera hematoencefàlica es va mesurar amb estudis de permeabilitat amb sucrosa marcada amb carboni-14.

5.4. Disseny experimental

El disseny experimental constava de tres estudis:

- 1) L'estudi de RM es va dividir en dos experiments: A i B. L'objectiu de l'experiment A era avaluar l'efecte de la derivació de la vena porta a la vena cava sobre l'edema cerebral. En l'experiment B es pretenia estudiar

l'edema cerebral en rates amb insuficiència hepàtica aguda induïda per la derivació porto-sistèmica i la lligadura de l'artèria hepàtica. Es va realitzar estudis de RM a les 6, 12 i 15 hores d'haver realitzat la lligadura.

- 2) La determinació del contingut d'aigua cerebral per gravimetria en rates amb insuficiència hepàtica aguda es va fer a les 6 hores (n=6), a l'estat de precoma (n=6) i l'estat de coma (n=6) així com en rates controls (n=6).
- 3) La permeabilitat de la barrera hematoencefàlica en rates amb insuficiència hepàtica aguda es va estudiar a l'estat de precoma (n=5) i coma (n=6) i es va comparar els resultats amb un grup de rates control (n=6).

5.5. Resultats

Les rates amb insuficiència hepàtica aguda mostren una disminució progressiva del coeficient de difusió aparent en totes les regions cerebrals que s'han estudiat. Es va fer un promig de tots els coeficients de difusió en les diferents regions. Aquest promig decreix el 14% a l'estat de precoma i fins al 20% en l'estat de coma. Aquests canvis indiquen un increment d'aigua a l'espai intracel·lular que també es va corroborar mitjançant l'estudi de gravimetria (coma: $82.4 \pm 0.3\%$ comparat amb les rates control: $81.6 \pm 0.3\%$; $p=0.0001$). A més l'increment d'aigua augmentava a mesura que progressava la insuficiència hepàtica.

En l'estudi de la permeabilitat de la barrera hematoencefàlica amb ^{14}C -sucrosa, un metabòlit de baix pes molecular, s'ha vist que la constant de transferència es manté en valors semblants als de les rates control. Això fa evident que no existeix un trencament o interrupció de la barrera hematoencefàlica en la insuficiència hepàtica aguda i confirma el mecanisme citotòxic de l'edema.

El metabolisme cerebral també es veu alterat, s'observa un gran increment dels pics de la glutamina (6 hores: 540%, precoma: 851%, coma: 1086%) i del lactat (6 hores: 166%, precoma: 998%, coma: 3293%). A més amb l'estudi del metabolisme 'ex vivo' s'ha confirmat que aquest lactat s'ha sintetitzat 'de novo'.

5.6. Resultats addicionals de l'estudi

5.6.1. Anàlisi metabonòmic

Es va realitzar un anàlisi metabonòmic de tots els metabòlits obtinguts en els espectres mitjançant un anàlisi de components principals. Aquest anàlisi permet veure com es comporten totes les variables d'una manera global.

En l'anàlisi de components principals realitzat d'una manera no supervisada es va veure que eren necessaris 17 components principals per explicar la variabilitat de les dades. Per un nivell de confiança del 95% només calien els 8 primers components principals i aquests explicaven el 62% de variabilitat de les dades. Els dos primers components amb més importància d'acord amb les regles de validació creuada eren el primer i el tercer component principal i, individualment, explicaven un 32% i un 22% de la variabilitat, respectivament. En aquest anàlisi es va comprovar que totes les rates control tenen un mateix perfil metabòlic. A més existeix una clara separació entre els perfils metabòlics de les rates control, les rates amb anastomosi portocava i els diferents estats de les rates amb insuficiència hepàtica aguda. Per tal de realitzar un model de predicció, es va fer un anàlisi supervisat separant les variables per classes. Aquestes classes corresponien a tipus de rata que s'havia analitzat. Realitzant aquest anàlisi supervisat es veu que la capacitat de predicció del model és del 64% (Figura 5.1).

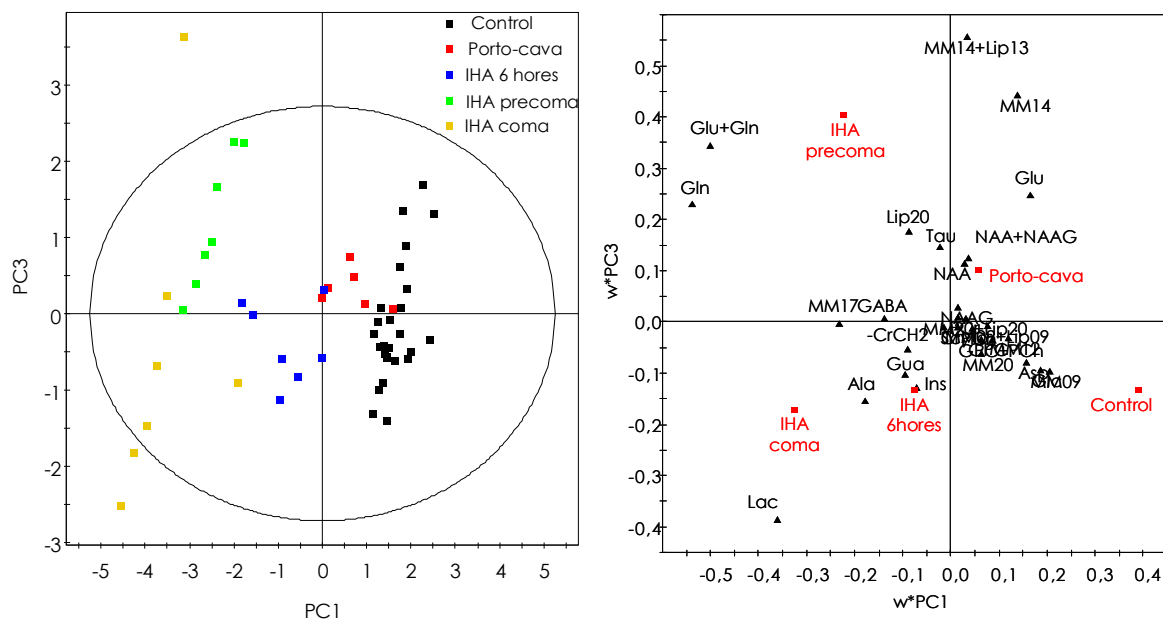


Figura 5.1 Anàlisi discriminant de components principals de l'espectre de rates control, rates amb anastomosi portocava i rates amb insuficiència hepàtica aguda (IHA) a diferents estats (a les 6 hores, a l'estat de precoma i l'estat de coma)(esquerra). El pes de cada variable en cada component (dreta).

Si s'analitzen les dades amb més detall es veu que els pics dels lípids i les macromolècules són els més variables inclús en les rates control. Si es torna a analitzar les dades sense tenir en compte aquests pics s'observa que 6 components principals són capaços de explicar el 75% de la variància de les dades amb una precisió del 56% i un interval de confiança del 95%.

En aquest cas, els dos primers components són els que tenen més importància d'acord amb les regles de validació creuada i individualment explicaven un 27% i un 17% de la variabilitat, respectivament. Al realitzar l'anàlisi supervisat de les dades s'obté un model de predicció amb una capacitat de predicció del 71% (Figura 5.2).

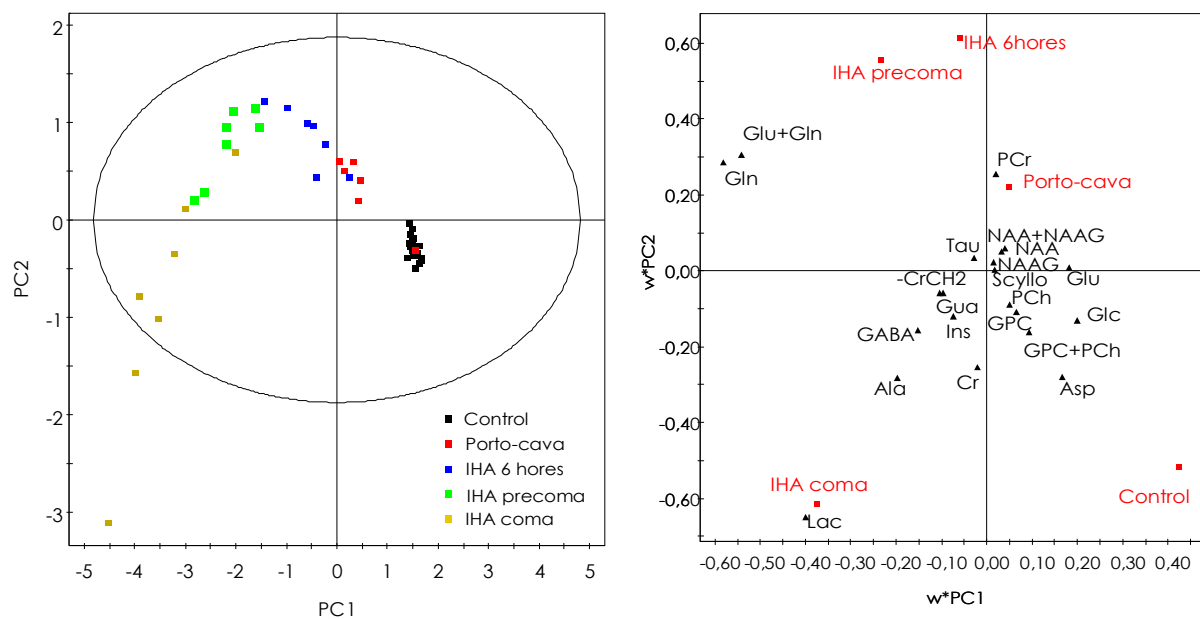


Figura 5.2 Anàlisi discriminant de components principals de l'espectre de rates control, rates amb anastomosi portocava i rates amb insuficiència hepàtica aguda (IHA) a diferents estats (a les 6 hores, a l'estat de precoma i l'estat de coma)(esquerra). El pes de cada variable en cada component (dreta).

L'anàlisi de l'espectre per components principals pot ser una eina útil per a realitzar models de diagnòstic a partir de l'espectroscòpia d'un pacient (Figura 5.3).

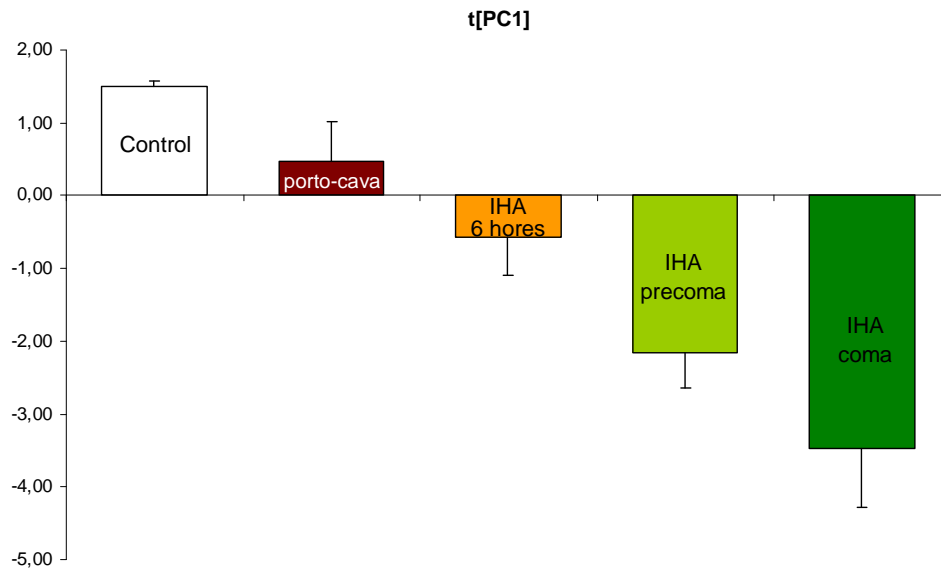


Figura 5.3 Classificació del grau de la insuficiència hepàtica aguda segons la variància del primer component principal de rates control, rates amb anastomosi portocava i rates amb insuficiència hepàtica aguda (IHA).

5.6.2. Espectroscòpia amb carboni 13

En un altre grup d'animals amb insuficiència hepàtica aguda es va realitzar un estudi d'espectroscòpia amb carboni 13. Al cap de 12 hores d'haver realitzat la lligadura de l'artèria hepàtica es va inocular 200mg/kg de glucosa marcada amb carboni 13 per via intraperitoneal per enriquir la proporció de carboni 13 en els metabòlits. Al cap de 20 minuts es van sacrificar els animals i es van separar diferents teixits (cervell, múscul i sang arterial) per fer una extracció dels metabòlits (procediment descrit en materials i mètodes) i realitzar l'espectroscòpia.

Només es van observar pics en l'espectroscòpia de carboni 13 en el cervell. El que es va detectar és un augment significatiu de la síntesi 'de novo' del lactat ($P < 0.001$) i de la glutamina via piruvat deshidrogenasa (Gln 4; $P = 0.024$) i via piruvat carboxilasa (Gln 2; $P = 0.024$) (Figura 5.4).

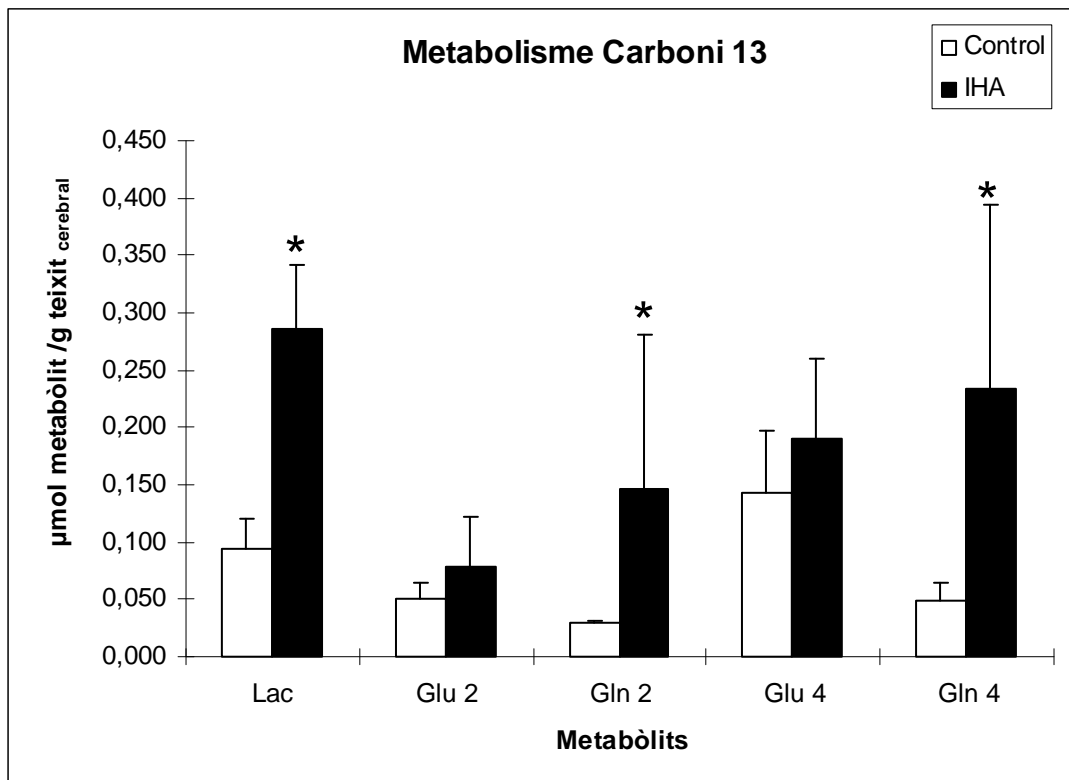


Figura 5.4 Concentració dels metabòlits marcats amb carboni 13 de teixit cerebral, normalitzades pel gram de teixit, de rates amb insuficiència hepàtica aguda (IHA) i de rates control. Metabòlits: Glu, glutamat; Gln, glutamina; Lac, lactat. *P<0.050

5.7. Article original

Chavarria L, Oria M, Romero-Gimenez J, Alonso J, Lope-Piedrafita S, Cordoba J. **Diffusion tensor imaging supports the cytotoxic origin of brain edema in a rat model of acute liver failure.** *Gastroenterology*. 2010; 138(4):1566-73.

Diffusion Tensor Imaging Supports the Cytotoxic Origin of Brain Edema in a Rat Model of Acute Liver Failure

LAIA CHAVARRIA,^{*,†,§} MARC ORIA,^{*,†,§} JORDI ROMERO-GIMENEZ,^{*} JULI ALONSO,^{†,‡} SILVIA LOPE-PIEDRAFITA,[§] and JUAN CORDOBA^{*,†,§}

^{*}Liver Unit, Hospital Vall Hebron, Barcelona, Spain; [†]Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBEREHD), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain; [‡]Departament Medicina, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain; [§]Magnetic Resonance Unit, Hospital Vall Hebron, Barcelona, Spain; [¶]Servei de Resonància Magnètica Nuclear, Universitat Autònoma de Barcelona, Spain

BACKGROUND & AIMS: Brain edema is a severe complication of acute liver failure (ALF) that has been related to ammonia concentrations. Two mechanisms have been proposed in the pathogenesis: vasogenic edema that is secondary to the breakdown of the blood-brain barrier and cytotoxic edema caused by ammonia metabolites in astrocytes. **METHODS:** We applied magnetic resonance techniques to assess the intracellular or extracellular distribution of brain water and metabolites in a rat model of devascularized ALF. The brain water content was assessed by gravimetry and blood-brain barrier permeability was determined from the transfer constant of ¹⁴C-labeled sucrose. **RESULTS:** Rats with ALF had a progressive decrease in the apparent diffusion coefficient (ADC) in all brain regions. The average decrease in ADC was significant in precoma (–14%) and coma stages (–20%). These changes, which indicate an increase of the intracellular water compartment, were followed by a significant increase in total brain water (coma 82.4% ± 0.3% vs sham 81.6% ± 0.3%; *P* = .0001). Brain concentrations of glutamine (6 hours, 540%; precoma, 851%; coma, 1086%) and lactate (6 hours, 166%; precoma, 998%; coma, 3293%) showed a marked increase in ALF that paralleled the decrease in ADC and neurologic outcome. In contrast, the transfer constant of ¹⁴C-sucrose was unaltered. **CONCLUSIONS:** The pathogenesis of brain edema in an experimental model of ALF involves a cytotoxic mechanism: the metabolism of ammonia in astrocytes induces an increase of glutamine and lactate that appears to mediate cellular swelling. Therapeutic measures should focus on removing ammonia and improving brain energy metabolism.

Keywords: Hepatic Encephalopathy; In Vivo; Diffusion; Gravimetry; Blood-Brain Barrier.

Brain edema is a severe complication of acute liver failure (ALF).¹ The pathogenesis has been related to the effects of ammonia in the brain, possibly exacerbated by inflammatory mediators and abnormalities in cerebral blood flow.² Two major mechanisms can explain the increase of brain water³: cytotoxic edema or vasogenic edema. Studies in experimental models have documented

an increase in brain water and swelling of astrocytes, supporting a cytotoxic mechanism, where most of the water accumulates in the intracellular compartment. The specific location in astrocytes has been explained by the exclusive presence in these cells of glutamine synthetase, which metabolizes ammonia to glutamine. The rise of glutamine can induce an osmotic imbalance, partially compensated by the release of ions and organic osmolytes, such as myo-inositol.⁴ Alternatively, ammonia or glutamine may induce injury to the mitochondria, through the generation of reactive oxygen species and protein tyrosine nitration,⁵ leading to energy failure and cytotoxic edema.

Studies in patients with cirrhosis have also provided data supporting the notion that liver failure causes an increase in brain water.⁶ However, according to the results of water diffusivity obtained by brain magnetic resonance (MR), most of the water accumulates in the extracellular compartment, challenging the cytotoxic hypothesis.⁷ Furthermore, one study that used a toxic model in mice has found breakdown of the blood-brain barrier (BBB).⁸ Modulation of water influx requires clarification of the state of the BBB, which in many studies shows an increase in the pinocytotic activity and a swollen endothelium, but seems structurally intact.⁹ Administration of saline or mannitol infusion decreases intracranial pressure, an effect that may result from cerebral vasoconstriction or by restoration of the osmotic pressure gradient, which requires a normally functioning BBB. A better understanding of the mechanisms that intervene in the pathogenesis of brain edema in ALF is a critical step to design appropriate therapeutic measures.

The aim of our study was to investigate the mechanisms involved in the generation of brain edema in a

Abbreviations used in this paper: ADC, apparent diffusion coefficient; ALF, acute liver failure; ANOVA, analysis of variance; BBB, blood-brain barrier; Glu/Cr, ratio of glutamate to creatinine; GPC + PCh/Cr, ratio of choline derivatives to creatinine; HAL, hepatic artery ligation; MR, magnetic resonance; PCA, portocaval anastomosis; TE, echo time; TR, repetition time.

© 2010 by the AGA Institute
0016-5085/10/\$36.00
doi:10.1053/j.gastro.2009.10.003

well-characterized model in the rat with the help of *in vivo* MR. We applied diffusion-weighted imaging to measure water motion in the brain and calculated the apparent diffusion coefficient (ADC). A rise in ADC represents an increase in the movement of water molecules, as occurs when water motion is not restricted by cell membranes.¹⁰ Accordingly, extracellular edema is associated with an increase in ADC, whereas intracellular edema causes a decrease in ADC. We assessed BBB permeability to ¹⁴C-sucrose, a small molecule that has no specific BBB carrier, to corroborate the cytotoxic or vasogenic origin of brain edema. We also applied MR spectroscopy to study the relation between changes in brain water compartments and metabolic abnormalities caused by liver failure.

Materials and Methods

Animal Models

This study was performed in Sprague-Dawley male rats (250–300 g; Harlan, Udine, Italy). Animals were housed in polycarbonate cages under standard laboratory conditions: a 12/12 hours light/dark cycle, a constant temperature of 22°C ± 2°C, and a relative humidity of approximately 50%. Standard food (A04; Panlab, Barcelona, Spain) and water were available *ad libitum*. All procedures were performed in accordance with Spanish legislation and approved by the Catalan Animal Research Committee in the facilities of Institut de Recerca, Hospital Universitari Vall d'Hebron.

Portocaval anastomosis. The portocaval anastomosis (PCA) was performed according to the guidelines of Lee and Fisher¹¹ under isoflurane anesthesia. The PCA was constructed under aseptic conditions with the use of a continuous suture technique (7/0 Prolene suture) with the aid of a microscope. The surgery time was fewer than 15 minutes. Sham-operated rats underwent a similar intervention without vein section and had the portal vein clamped for 15 minutes.

Acute liver failure. The ALF was induced by PCA, and 24 hours after this surgery (to ensure the success of the operation) animals were subjected to hepatic artery ligation (HAL). All the surgeries were performed under anesthesia (isoflurane). The mortality of surgery was 9% for PCA and 19% for HAL. These animals had a predictable course reaching precoma stage (defined as a loss of righting reflex) at approximately 11 hours after HAL and coma stage (defined as loss of corneal reflex) at approximately 14 hours after HAL. Sham-operated rats underwent 2 interventions, a sham PCA, as described above, and a second laparotomy without hepatic artery ligation.

During the experiments, animal body temperature was kept stable at 37.0°C ± 0.5°C with the aid of heating pads, and glucose concentration was kept above 100 mg/mL with the help of a blood glucose test (GlucoCard; A. Menarini Diagnostics S.r.l., Firenze, Italy). Below this

concentration, the animals were supplemented with a dose (0.5–1.5 mL) of a solution of 10% glucose (Glucosado 10%; Fresenius Kabi, Bad Homburg, Germany).

Experimental Design

The experimental design consisted in 3 experiments: (1) MR study, (2) brain water assessment by gravimetry, and (3) the study of BBB permeability.

The MR study was subdivided in 2 experiments (A and B). The goal of experiment A was to assess the effect of PCA, and the goal of experiment B was to assess the effects of ALF. Experiment A was performed on PCA rats (*n* = 6) and sham-operated controls (*n* = 6) 24 hours after surgery. Each control rat was examined just after finishing the acquisition of MR examination in PCA rats, to have similar MR conditions. In Experiment B, each ALF rat (*n* = 7) was assessed repeatedly 6 hours after HAL, at precoma stage and at coma stage. Each one of the control rats was assessed repeatedly just after the ALF rat counterpart at parallel times since the sham intervention (6 hours, 11 ± 2 hours and 14 ± 2 hours).

Brain water assessment by gravimetry was performed in a group of ALF rats and sham-operated controls (*n* = 6). ALF rats were studied at 6 hours after surgery (*n* = 6), precoma stage (*n* = 6), and coma stage (*n* = 6).

The study of BBB permeability was performed in a group of ALF rats at precoma stage (*n* = 5) and at coma stage (*n* = 6) and in a group of sham-operated rats (*n* = 6).

MR Experiments

¹H-MR studies were performed in a 7 T Bruker BioSpec 70/30 USR (Bruker BioSpin GmbH, Karlsruhe, Germany) equipped with a mini-imaging gradient set (400 mT/m), a linearly polarized transmitter volume coil (72 mm inner diameter), and a dedicated rat brain circularly polarized receive surface coil. All MR data were acquired and processed on a Linux computer with the use of Paravision 4.0 software (Bruker BioSpin GmbH, Karlsruhe, Germany).

The animal was inside the MR spectrometer lying on a bed equipped with a fixation system (tooth-bar and ear-plugs) to avoid motion artifacts and a tube that continuously provided the anesthetic (2% isoflurane in oxygen at 1 L/min) during a period of approximately 40 minutes. After this period the animal was taken out and followed in a nearby room as described previously without receiving further anesthesia. Once the next stage was reached the animal was reintroduced into the magnet to repeat the acquisition of MR data. Isoflurane was re-administered as needed. Body temperature and respiration were continuously controlled with a small animal monitoring system (Model 1025; SA Instruments Inc, Stony Brook, NY).

Anatomical images. The anatomical images allow the localization of the regions of interest. The stud-

ied regions were visual cortex, sensorimotor cortex, motor cortex, hippocampus, thalamus, hypothalamus, caudate-putamen, globus pallidus, and nucleus accumbens. The images were obtained with the use of rapid acquisition relaxation-enhanced sequence (TR/TEeff/ETL 4000 milliseconds/36 milliseconds/8) in axial (13 slices), sagittal (9 slices), and coronal (6 slices) planes. Imaging parameters for these images were repetition time (TR) of 4000 milliseconds, echo spacing of 12 milliseconds, effective echo time (TEeff) of 36 milliseconds, echo train length of 8, slice thickness of 1 mm, acquisition matrix of 256×256 , and a field view of $35 \text{ mm} \times 35 \text{ mm}$. These orthogonal planes were used as reference images.

T2 map. To obtain T2 maps, T2-weighted images at variable TE values were acquired with the use of a multislice multiecho sequence (TE/TR = 10–120 milliseconds/2000 milliseconds) in 13 continuous slices with 1-mm thickness, an acquisition matrix of 128×128 , and a field of view of $35 \text{ mm} \times 35 \text{ mm}$.

Apparent diffusion coefficient map. Diffusion tensor imaging was carried out with the use of a segmented diffusion-weighted echo-planar sequence (TR/TE = 200 milliseconds/35 milliseconds; number of shots = 4 milliseconds) with identical geometry as in T2 map. Diffusion-weighted images were acquired along 20 diffusion directions and 4 b values ($b = 0, 200, 600, 1000 \text{ s/mm}^2$, $\Delta/\delta = 20 \text{ milliseconds}/4 \text{ milliseconds}$) to obtain ADC as the trace of the estimated diffusion tensor. An average of the ADC of all measured regions was calculated and termed brain-ADC.

In vivo ^1H spectroscopy. Localized ^1H spectroscopy was obtained with the use of a point-resolved spectroscopy sequence was preceded by a variable pulse power and optimized relaxation delays sequence for global water suppression in a voxel size of $6.5 \text{ mm} \times 6.5 \text{ mm} \times 6.5 \text{ mm}$ with the following parameters: a spectral bandwidth of 4000 Hz, 4096 points, TE of 12 milliseconds, TR of 2.5 seconds, and 64 scans. The voxel was located above the pituitary gland and caudal to the olfactory bulb and included gray and white matter (Figure 1). Chemical shifts were referenced to creatine at 3.02 ppm. Metabolites were quantified automatically (ratios compared with creatine) with the use of LCModel software (Stephen Provencher Inc, Oakville, ON, Canada).¹²



Figure 1. Localization of the voxel of MR spectroscopy in 3 orthogonal planes (axial, sagittal, and coronal).

The LCModel software performs an automatic quantification of the in vivo spectra by reference spectra of rat brain built by phantoms of each metabolite.

Brain Water Measurement

Cerebral water content of ALF rats ($n = 6$) was measured by a gravimetric method that used a bromobenzene-kerosene gradient density calibrated with sulfate potassium. Percentage of water in tissue was calculated as described in Marmarou et al.¹³ Briefly, a gradient of a mixture of bromobenzene and kerosene was built in a 100-mL graduated cylinder. Thirty minutes later, standards of sulphate potassium were immersed to get a calibrated curve. The animals were decapitated, and their brains were removed and placed into a dry plaque. Then, brain samples from frontal cortex were cut with a volume of approximately 1 mm^3 and were immersed into the calibrated gradient density. After 2 minutes of immersion the specific gravity was determined by the calibrated curve obtained with sulphate potassium. The cerebral water content was computed by using 2 tissue-specific constants (m_{tissue} , b_{tissue}) that have been determined by immersion of samples of dry solid tissue (Equation 1). This method permitted a resolution in gray matter of 0.2% per graduate that was suited for the study of brain edema.

$$\% \text{ g H}_2\text{O/g tissue} = (m_{\text{tissue}}/\text{specific gravity}) - b_{\text{tissue}} \quad (1)$$

Measurement of BBB Permeability

Animals received a bolus of $25 \mu\text{Ci}$ [^3H] sucrose (GE Healthcare UK Limited, Amersham) by intravenous injection. After the injection, $100 \mu\text{L}$ of femoral arterial blood samples (via catheter) were withdrawn every 5 minutes during the next 30 minutes and collected into separated heparinized tubes. After 30 minutes, brain microvasculature was cleared of blood by perfusion of 100 mL saline with 1% heparin (Heparin sodica Chiesi; Chiesi Farmaceutici S.p.A, Parma, Italy) for an 8- to 10-minute period. After this period, the animals were decapitated, and their brains were removed and cleared of meninges. Weighted samples (approximately 100 mg) of frontoparietal cortex were homogenized with a buffer (a mixture of 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 5 mM CaCl_2 , 1% Triton X-100, 0.05% Brij35, and 0.02% NaN_3). Homogenized tissue ($100 \mu\text{L}$) and plasma ($50 \mu\text{L}$) obtained from blood samples were transferred in vials with scintillation cocktail (PerkinElmer, Shelton, CT) for liquid scintillation counting (LS 6500 Liquid Scintillation Counting Systems, Beckman Coulter, Fullerton, CA).¹⁴ The concentration of the tracer was determined in parenchyma (C_{paren} ; in dpm/g) and plasma (C_{plasma} ; in dpm/mL) to compute the transfer constant (K_i) that was calculated from the mathematical relationship (Equa-

April 2010

DTI AND CYTOTOXIC ORIGIN OF BRAIN EDEMA IN ALF 1569

tion 2) based on a 2-compartment (plasma and brain) model,¹⁵

$$K_i = \frac{C_{paren}}{\int_{0 \text{ min}}^{30 \text{ min}} C_{plasma} \cdot dt} \quad (2)$$

Statistical Analysis

Significant differences between intergroup data (PCA or ALF and sham) were verified with the Student's *t* test or 1-way analysis of variance (ANOVA), and the comparisons for continuous variables of intragroup data (6 hours, precoma and coma) were analyzed with 1-way ANOVA for repeated measures or Friedman ANOVA on ranks. *P* values < .05 were considered statistically significant. All the statistical analysis was performed with Sigma Stat package (SPSS Inc, Chicago, IL).

Results

MR Experiments

Experiment A: PCA rats. PCA rats did not show any change either in T2 or ADC values in all the studied regions (data not shown). However, the metabolic profile obtained by MR-spectroscopy was significantly altered (Figure 2): myoinositol and choline derivatives decreased (ratio of myoinositol to creatine: PCA, 0.750 ± 0.121, versus sham, 0.908 ± 0.111, *P* = .040; ratio of choline derivatives to creatine [GPC + PCh/Cr]: PCA, 0.134 ±

0.0013, versus sham, 0.219 ± 0.009, *P* < .001), whereas glutamine and lactate increased (ratio of glutamine to creatine: PCA, 1.248 ± 0.161, versus sham, 0.294 ± 0.057, *P* < .001; ratio of lactate to creatine: PCA, 0.202 ± 0.056, versus sham, 0.104 ± 0.035, *P* = .005). No changes were observed in glutamate (ratio of glutamate to creatine [Glu/Cr]) and taurine (ratio of taurine to creatine) (Figure 3).

Experiment B: ALF rats. ALF rats did not show any change in T2 but did show a decrease in ADC in all regions (Table 1). Compared with sham-operated controls the brain-ADC in ALF was 8% lower after 6 hours (*P* = .053), 14% lower at precoma (*P* = .030), and 20% lower at coma stage (*P* < .001) (Figure 4). In the group of ALF rats the differences between stages did not reach statistical significance for brain-ADC. However, ADC in the thalamus and hypothalamus was significantly lower at the coma stage than at precoma and after 6 hours (Table 1).

MR spectroscopy data (Figures 2 and 3) showed that glutamate in ALF was lower than in sham rats at 6 hours (Glu/Cr: ALF, 1.053 ± 0.087, versus sham, 1.353 ± 0.059; *P* < .001), precoma (Glu/Cr: ALF, 1.210 ± 0.080, versus sham, 1.338 ± 0.088; *P* = .014), and coma (Glu/Cr: ALF, 0.909 ± 0.158, versus sham, 1.345 ± 0.044; *P* < .001). Choline derivatives had decreased compared with sham rats at 6 hours (GPC + PCh/Cr: ALF, 0.122 ± 0.018, versus sham, 0.216 ± 0.015; *P* < .001), at precoma (GPC + PCh/Cr: ALF, 0.137 ± 0.012, versus sham, 0.209 ± 0.020; *P* < .001), and coma (GPC + PCh/Cr: ALF, 0.134 ± 0.017,

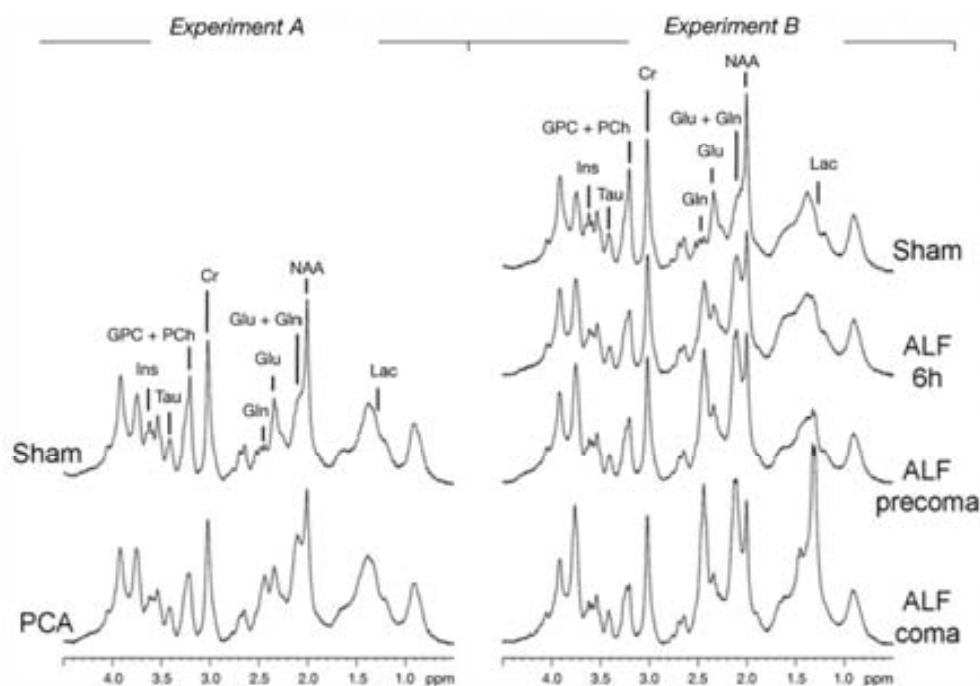


Figure 2. Representative MR spectra of sham, PCA, and ALF rats (6 hours, precoma, coma). Ins indicates myoinositol; Tau, taurine; GPC + PCh, choline derivatives; Cr, creatine; Gln, glutamine; Glu, glutamate; NAA, *N*-acetylaspartate; Lac, lactate.

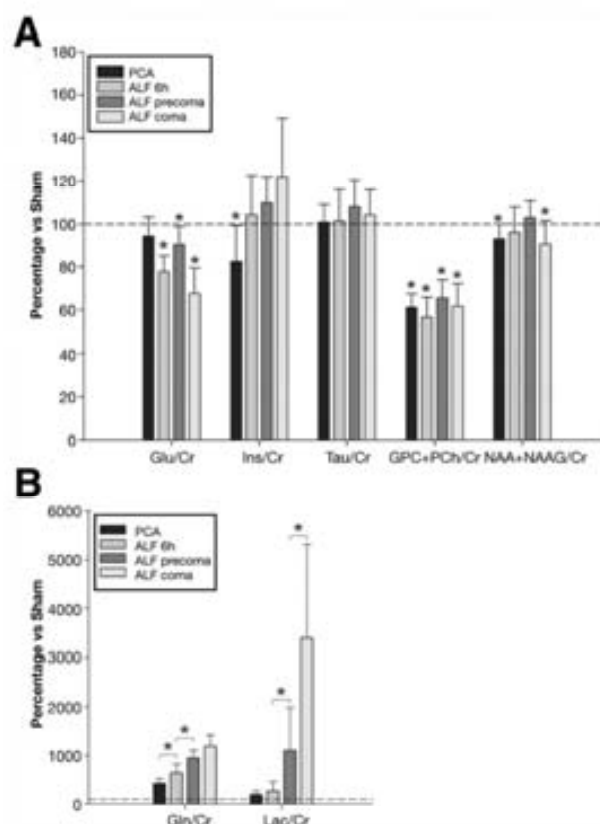


Figure 3. Quantification of brain metabolites obtained by MR spectroscopy in PCA and ALF rats. The results are expressed as the percentage of variation compared with sham-operated controls. The dotted line indicates sham levels. To ease the representation, the figure is split in 2 charts (A, B). Glu/Cr indicates, the ratio of glutamate to creatine; Ins/Cr, ratio of myoinositol to creatine; Tau/Cr, ratio of taurine to creatine; GPC + PCh/Cr, ratio of choline derivatives to creatine; NAA + NAAG/Cr, ratio of *N*-acetylaspartate and *N*-acetylglutarate to creatine; Gln/Cr, ratio of glutamine to creatine; Lac/Cr, ratio of lactate to creatine. (B) All data were significantly higher than the sham-operated controls ($P < .05$).

versus sham, 0.217 ± 0.024 ; $P < .001$). Taurine, myoinositol, *N*-acetylaspartate, and *N*-acetylglutarate remained unaltered (Figure 3A); except for the ratio of *N*-acetylaspartate and *N*-acetylglutarate to creatine that was decreased at the coma stage.

Glutamine increased progressively in ALF (6 hours, 1.838 ± 0.496 ; precoma, 2.886 ± 0.221 ; coma, 3.207 ± 0.295) compared with sham rats (6 hours, 0.287 ± 0.031 ; precoma, 0.303 ± 0.045 ; coma, 0.270 ± 0.047). Values at precoma and at coma in ALF were higher than after 6 hours, but there were no significant differences between precoma and coma. Lactate showed a marked increase in ALF from 6 hours (0.278 ± 0.171) to precoma (0.885 ± 0.554) and coma (2.584 ± 1.043). Differences were statistically significant between stages and compared with sham values (6 hours, 0.105 ± 0.047 ; precoma, 0.081 ± 0.041 ; coma, 0.076 ± 0.030) (Figure 3B).

Brain Water

Gravimetric studies showed that there was a gradual increase in the brain water content (Figure 5), and it was significant at the coma stage ($P = .0001$).

BBB Permeability

The transfer constant for ^{14}C -sucrose remained unaltered in ALF at the precoma and coma stages compared with sham (Figure 6).

Discussion

The study shows a decrease in the ADC in an experimental model of ALF in which the development of brain edema can be shown. This observation is in accordance with a cytotoxic origin of brain edema that is supported by the lack of increase in the BBB permeability to ^{14}C -sucrose.

No MR techniques are easily available to quantify brain water in vivo. In their absence, diffusion-weighted imaging has been used to investigate different experimental situations that are accompanied with brain edema. The interpretation of the data provided by this method in some situations has been difficult, because of the complexity of some processes that include injury to the tissue and combined cytotoxic and vasogenic edema.¹⁶ ADC is a parameter obtained by MR to estimate water motion that has been shown to be decreased in experimental situations in which water accumulates in the intracellular compartment. ADC is decreased secondarily to sodium pump failure in the first moments of ischemic stroke and to osmotic imbalance in hyponatremia.¹⁰ In our study we show a decrease in ADC in rats with ALF, which became evident at the precoma and coma stages. The decrease in ADC was even more pronounced at the coma stage in some regions. These changes evolved in parallel with an increase in brain water that was shown by gravimetry and was significant at the coma stage. The best explanation is an initial increase in the proportion of water in the intracellular compartment that later caused an increase in the amount of water in the whole tissue.

ADC did not decrease in rats with portocaval anastomosis. These animals exhibit mild behavioral abnormalities, and for this reason they are considered a model of minimal hepatic encephalopathy. Neuropathologic studies have shown disturbances of astrocytes, such as Alzheimer type 2 astrocytosis, which has been attributed to an increase in the intracellular concentration of glutamine. The rise of glutamine may be sufficient to trigger an impairment of neurologic function¹⁷ but not to cause a net increase in brain water. Brain edema has only been shown when these rats are challenged with an additional bolus of ammonia. The explanation for the lack of increase in brain water is that small osmotic changes, especially if not accompanied by energy failure,¹⁸ can be

Table 1. ADC Values of all Brain Regions in ALF or Sham-Operated Controls

ADC ($\times 10^{-4}$ mm ² /s)	6 hours		Precoma (11 hours)		Coma (14 hours)	
	Sham	ALF	Sham	ALF	Sham	ALF
Visual cortex	7.991 \pm 0.589	7.443 \pm 0.506	8.517 \pm 1.181	7.603 \pm 0.734	8.431 \pm 0.989	6.839 \pm 0.897 ^a
Motor cortex	8.052 \pm 0.605	7.426 \pm 0.593	8.714 \pm 1.419	7.333 \pm 0.495 ^a	8.140 \pm 0.516	6.578 \pm 0.887 ^a
Sensorimotor cortex	7.863 \pm 0.536	7.228 \pm 0.551	8.487 \pm 1.228	7.190 \pm 0.448 ^a	7.977 \pm 0.385	6.410 \pm 0.708 ^a
Thalamus	7.932 \pm 0.438	7.306 \pm 0.738	8.559 \pm 1.255	7.294 \pm 0.622 ^a	8.261 \pm 0.570	5.959 \pm 0.963 ^{a,b}
Hippocampus	8.218 \pm 0.480	7.597 \pm 0.623	8.783 \pm 1.189	7.689 \pm 0.641	8.531 \pm 0.96	6.664 \pm 0.964 ^a
Hypothalamus	8.331 \pm 0.502	7.632 \pm 0.766	8.924 \pm 1.254	7.544 \pm 0.634 ^a	8.495 \pm 0.479	5.796 \pm 0.864 ^{a,b}
Caudate-putamen	7.753 \pm 0.629	7.140 \pm 0.631	8.307 \pm 1.188	7.092 \pm 0.364 ^a	7.826 \pm 0.419	6.756 \pm 0.805 ^a
Globus pallidus	7.938 \pm 0.623	7.161 \pm 1.031	8.330 \pm 1.188	7.309 \pm 0.399	8.077 \pm 0.342	6.690 \pm 0.903 ^a
Nucleus accumbens	8.003 \pm 0.677	7.080 \pm 0.482 ^a	8.316 \pm 0.868	7.224 \pm 0.458 ^a	8.010 \pm 0.368	6.842 \pm 0.607 ^a

Values are means \pm standard deviations.

^a $P < .050$ for intergroup data (Student *t* test).

^b $P < .050$ for intragroup data (ANOVA for repeating measures).

compensated by the release of ions and organic osmolytes to the extracellular compartment. In accordance with this hypothesis, we observed in the MR spectrum of PCA an increase in glutamine and a decrease in the peaks of myoinositol and choline derivatives. The lack of decrease in ADC suggests that this response is sufficient to avoid an increase in the intracellular water compartment.

Many factors are present in ALF that in other clinical circumstances participate in the generation of brain edema, such as inflammatory mediators, circulatory instability, or hypoxia.¹⁹ However, the most important factor appears to be ammonia, which causes brain edema in multiple experimental preparations²⁰ and in human beings with acute hyperammonemia.²¹ The effects of ammonia are directed to astrocytes, which are the cells that are abnormal in neuropathologic studies and swell in cultures.²² We observed a homogeneous behavior of ADC across all the examined regions that is compatible with

an increase of water in astrocytes. A prior study in a rat model of acute ammonia intoxication that performed MR after an intraperitoneal injection found an increase in ADC in 4 regions (hippocampus, caudate/putamen, cerebellar cortex and substantia nigra) and a decrease in ADC in one region (hypothalamus), without changes in the other 11 regions that were examined.²³ The investigators interpreted changes in ADC as cytotoxic and vasogenic edema. However, a direct toxic effect of ammonia on brain and secondary changes in ADC cannot be excluded, because it has been observed with some drugs.²⁴ Brain edema, which was not assessed in this study, usually becomes evident after at least 3 hours of continuous ammonia infusion.⁴

Brain edema and intracranial hypertension have been documented in ALF and chronic liver failure,²⁵ but the

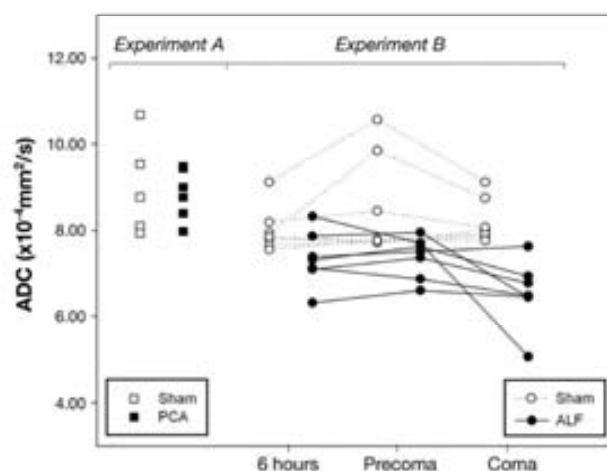


Figure 4. Brain ADC (averaged ADC of all measured regions) in PCA rats and sham controls (experiment A) and in ALF rats and sham controls at different stages (experiment B). ADC values of ALF rats at the precoma and coma stages are significantly lower than the sham values ($P < .050$).

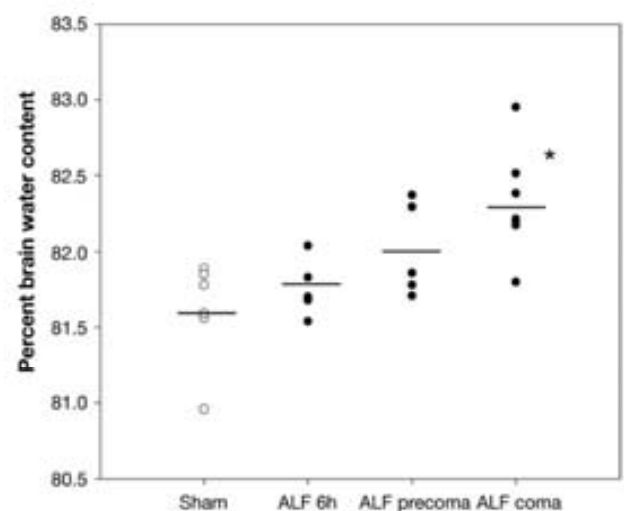


Figure 5. Percentage of cerebral water content quantified by gravimetry in sham rats (81.6% \pm 0.3%), all rats with ALF at 6 hours (81.8% \pm 0.2%), precoma (82.0% \pm 0.3%), and coma (82.3% \pm 0.4%). Brain water was significantly higher at the coma stage ($*P < .050$, ANOVA) followed by Holm-Sidak pairwise comparisons.

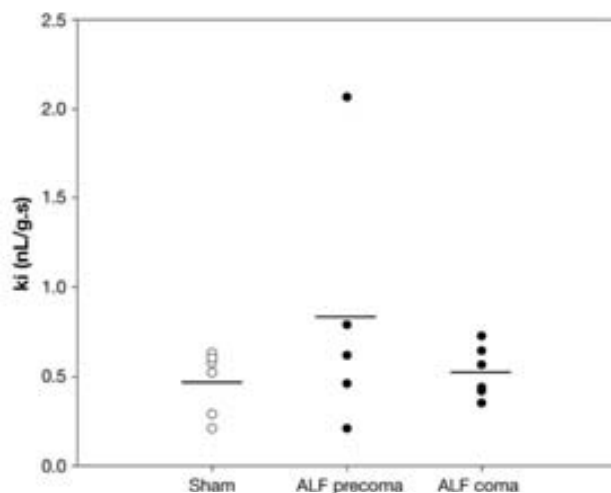


Figure 6. Transfer constant for ^{14}C -sucrose (K_i) in sham rats and rats with ALF at the precoma and coma stages. No significant differences were observed between the groups.

mechanisms and the consequences of brain edema appear to be different in both situations. In patients with cirrhosis and a stable clinical condition, ADC has been repeatedly shown to be increased,⁷ whereas a limited number of studies in patients with ALF shows a decrease in ADC.²⁶ Ultrastructural examination of brain capillaries obtained from patients dying of ALF has shown that the intercellular tight junctions between capillary endothelial cells were intact.⁹ However, endothelial cells showed increased vacuolization that could indicate increased passage of substances across a morphologically conserved BBB. Functional studies, which can only be performed in experimental preparations, have provided conflicting results^{8,27}; some can be explained by an inadequate control of some variables, such as body temperature. In our study, we used the transfer coefficient to sucrose as an indicator of the integrity of the BBB. This is a widely used method that in experimental models of stroke gives K_i values >12 and >5 times higher than control.¹⁴ In our hands, the permeability to sucrose was not impaired, neither when there was an increase of water in the intracellular compartment (precoma) nor a rise in total brain water (coma). Thus, although a combination of cytotoxic and vasogenic mechanisms has been proposed, according to our data the main process that causes brain edema in ALF is cytotoxic. Future studies would be necessary to elucidate the role of vasogenic mechanisms in chronic liver failure.

The abnormalities of brain metabolites that are detected by MR spectroscopy in ALF are probably caused by the exposure of the brain to ammonia. As in other studies, we observed a marked increase in brain glutamine and lactate, which correspond to *de novo* synthesis of these metabolites.²⁸ Our *in vivo* approach allowed us to examine the same animal at different stages and to relate

changes in these metabolites to the intracellular accumulation of water. In ALF rats at initial stage (6 hours) there was an increase in glutamine and lactate that progressed in precoma, when water accumulated in the intracellular compartment (significant decrease in ADC). The change from the precoma to the coma stage was accompanied by a marked rise in lactate (>3 times) and a net increase in brain water without a significant increase in glutamine. This course is similar to what has been described in patients with ALF that underwent monitoring of lactate by microdialysis in which it was observed that surges of high intracranial pressure were always preceded by an increase in lactate.²⁹ Our findings support the hypothesis of brain energetic impairment secondary to ammonia metabolism in the induction of brain edema. The increase of lactate may be an indicator of impending energy failure secondary to injury to the mitochondria.²² However, the lack of decrease of high energy phosphate compounds³⁰ is contrary to this interpretation. Alternatively, lactate may have been generated aerobically by excessive glutamatergic activation³¹ and could directly cause astrocyte swelling.³²

Notably, the accumulation of water in the intracellular compartment appears to initiate at an early stage. Although differences were not statistically significant, there is a clear trend for a lower ADC after 6 hours. At this stage the rat did not exhibit apparent signs of encephalopathy. However, neurophysiologic studies have shown neuronal dysfunction in this model at this stage.³³ The increase in intracellular water and neurophysiologic disturbances coincide with an increase in glutamine and lactate, supporting an important role for these metabolites in the pathogenesis of astrocyte swelling and hepatic encephalopathy. Most of the changes of the other metabolites detected by MR spectroscopy were mild ($<20\%$). The decrease in glutamate and *N*-acetylaspartate in ALF are well described.³⁴ The former has been explained by substrate consumption secondary to glutamine synthesis and the latter by an effect of energy failure.²⁸ An osmotic compensatory response to astrocyte swelling may be reflected in a decrease in choline-containing compounds and myoinositol.⁴ As in clinical reports,³⁵ the latter was probably not observed in rats with HAL because of artifacts in the spectrum caused by the marked rise in the peaks of glutamine.

In conclusion, the development of brain edema in experimental ALF is in accordance with a cytotoxic mechanism. Similar findings to those obtained in this study have been observed in human studies. Therefore, these results validate the rat model of liver devascularization for the study of brain edema in ALF. Lactate could have a key role in cellular swelling secondary to impending energy failure or to excessive glutamatergic activation. Therapeutic measures should focus on removing ammonia and improving brain energy metabolism.

References

- Cordoba J, Blei AT. Brain edema and hepatic encephalopathy. *Semin Liver Dis* 1996;16(3):271-280.
- Blei AT, Larsen FS. Pathophysiology of cerebral edema in fulminant hepatic failure. *J Hepatol* 1999;31(4):771-776.
- Loubinoux I, Volk A, Borredon J, et al. Spreading of vasogenic edema and cytotoxic edema assessed by quantitative diffusion and T2 magnetic resonance imaging. *Stroke* 1997;28(2):419-426.
- Cordoba J, Gottstein J, Blei AT. Glutamine, myo-inositol, and organic brain osmolytes after portocaval anastomosis in the rat: implications for ammonia-induced brain edema. *Hepatology* 1996;24(4):919-923.
- Haussinger D, Schliess F. Pathogenetic mechanisms of hepatic encephalopathy. *Gut* 2008;57(8):1156-1165.
- 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;35(5):598-604.
- Lodi R, Tonon C, Stracciari A, et al. Diffusion MRI shows increased water apparent diffusion coefficient in the brains of cirrhotics. *Neurology* 2004;62(5):762-766.
- Nguyen JH, Yamamoto S, Steers J, et al. Matrix metalloproteinase-9 contributes to brain extravasation and edema in fulminant hepatic failure mice. *J Hepatol* 2006;44(6):1105-1114.
- Kato M, Hughes RD, Keays RT, Williams R. Electron microscopic study of brain capillaries in cerebral edema from fulminant hepatic failure. *Hepatology* 1992;15(6):1060-1066.
- Pierpaoli C, Righini A, Linfante I, Tao-Cheng JH, Alger JR, Di Chiro G. Histopathologic correlates of abnormal water diffusion in cerebral ischemia: diffusion-weighted MR imaging and light and electron microscopic study. *Radiology* 1993;189(2):439-448.
- Lee SH, Fisher B. Portacaval shunt in the rat. *Surgery* 1961;50:668-672.
- Provencher SW. Estimation of metabolite concentrations from localized in vivo proton NMR spectra. *Magn Reson Med* 1993;30(6):672-679.
- Marmarou A, Poll W, Shulman K, Bhagavan H. A simple gravimetric technique for measurement of cerebral edema. *J Neurosurg* 1978;49(4):530-537.
- Preston E, Webster J, Small D. Characteristics of sustained blood-brain barrier opening and tissue injury in a model for focal trauma in the rat. *J Neurotrauma* 2001;18(1):83-92.
- Ohno K, Pettigrew KD, Rapoport SI. Lower limits of cerebrovascular permeability to nonelectrolytes in the conscious rat. *Am J Physiol* 1978;235(3):H299-H307.
- Albers GW. Diffusion-weighted MRI for evaluation of acute stroke. *Neurology* 1998;51(3 Suppl 3):S47-S49.
- Mans AM, DeJoseph MR, Hawkins RA. Metabolic abnormalities and grade of encephalopathy in acute hepatic failure. *J Neurochem* 1994;63(5):1829-1838.
- Bjerring PN, Hauerberg J, Frederiksen HJ, et al. Cerebral glutamine concentration and lactate-pyruvate ratio in patients with acute liver failure. *Neurocrit Care* 2008;9(1):3-7.
- Bartynski WS, Boardman JF, Zeigler ZR, Shaddock RK, Lister J. Posterior reversible encephalopathy syndrome in infection, sepsis, and shock. *AJNR Am J Neuroradiol* 2006;27(10):2179-2190.
- Takahashi H, Koehler RC, Brusilow SW, Traystman RJ. Glutamine synthetase inhibition prevents cerebral oedema during hyperammonemia. *Acta Neurochir Suppl (Wien)* 1990;51:346-347.
- Brusilow SW. Urea cycle disorders: clinical paradigm of hyperammonemic encephalopathy. *Prog Liver Dis* 1995;13:293-309.
- Norenberg MD, Rao KV, Jayakumar AR. Mechanisms of ammonia-induced astrocyte swelling. *Metab Brain Dis* 2005;20(4):303-318.
- Cauli O, Lopez-Larrubia P, Rodrigues TB, Cerdan S, Felipe V. Magnetic resonance analysis of the effects of acute ammonia intoxication on rat brain. Role of NMDA receptors. *J Neurochem* 2007;103(4):1334-1343.
- Haykin ME, Gorman M, van Hoff J, Fulbright RK, Baehring JM. Diffusion-weighted MRI correlates of subacute methotrexate-related neurotoxicity. *J Neurooncol* 2006;76(2):153-157.
- Donovan JP, Schafer DF, Shaw BW Jr, Sorrell MF. Cerebral oedema and increased intracranial pressure in chronic liver disease. *Lancet* 1998;351(9104):719-721.
- Saksena S, Rai V, Saraswat VA, et al. Cerebral diffusion tensor imaging and in vivo proton magnetic resonance spectroscopy in patients with fulminant hepatic failure. *J Gastroenterol Hepatol* 2008;23(7 Pt 2):e1111-e1119.
- Traber PG, Dal Canto M, Ganger DR, Blei AT. Electron microscopic evaluation of brain edema in rabbits with galactosamine-induced fulminant hepatic failure: ultrastructure and integrity of the blood-brain barrier. *Hepatology* 1987;7(6):1272-1277.
- Chatauret N, Zwingmann C, Rose C, Leibfritz D, Butterworth RF. Effects of hypothermia on brain glucose metabolism in acute liver failure: a H/C-nuclear magnetic resonance study. *Gastroenterology* 2003;125(3):815-824.
- Tofteng F, Jorgensen L, Hansen BA, Ott P, Kondrup J, Larsen FS. Cerebral microdialysis in patients with fulminant hepatic failure. *Hepatology* 2002;36(6):1333-1340.
- Frioleto R, Colombo JP, Lazeyras F, et al. In vivo 31P NMR spectroscopy of energy rich phosphates in the brain of the hyperammonemic rat. *Biochem Biophys Res Commun* 1989;159(2):815-820.
- Pellerin L, Bouzier-Sore AK, Aubert A, et al. Activity-dependent regulation of energy metabolism by astrocytes: an update. *Glia* 2007;55(12):1251-1262.
- Staub F, Peters J, Kempinski O, Schneider GH, Schurer L, Baethmann A. Swelling of glial cells in lactic acidosis and by glutamate: significance of Cl(-)-transport. *Brain Res* 1993;610(1):69-74.
- Oria M. Monitoring motor evoked potentials in awake rats are a good tool to assess hepatic encephalopathy. *Liver Int* 2008;28(5):745 Abstract.
- Barba I, Chatauret N, Garcia-Dorado D, Cordoba J. A 1H nuclear magnetic resonance-based metabolomic approach for grading hepatic encephalopathy and monitoring the effects of therapeutic hypothermia in rats. *Liver Int* 2008;28(8):1141-1148.
- McConnell JR, Antonson DL, Ong CS, et al. Proton spectroscopy of brain glutamine in acute liver failure. *Hepatology* 1995;22(1):69-74.

Received July 22, 2009. Accepted October 7, 2009.

Reprint requests

Address requests for reprints to: Juan Córdoba, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Passeig Vall d'Hebron 119-129, 08035 Barcelona, Spain. e-mail: jcordoba@vhebron.net; fax: (34) 932746068.

Conflicts of interest

The authors disclose no conflicts

Funding

This project was supported by grant PI080698. CIBEREHD is supported by Instituto de Salud Carlos III.

ESTUDI 2

6. ESTUDI 2

Anàlisi biexponencial de les imatges del tensor de difusió del cervell en pacients amb cirrosi abans i després del transplantament hepàtic.

6.1. Introducció

En els estudis del tensor de difusió en cervell realitzats en pacients amb cirrosi s'ha observat un increment del coeficient de difusió de les molècules d'aigua que pot correspondre a la presència d'edema cerebral.

6.2. Objectius

Estudiar l'edema cerebral en pacients amb cirrosi i sense encefalopatia hepàtica mitjançant un anàlisi biexponencial del senyal de difusió i establir-ne l'evolució després del transplantament hepàtic. Analitzar si l'encefalopatia hepàtica mínima tenia algun efecte en l'edema cerebral.

6.3. Materials i mètodes

En aquest estudi clínic es van reclutar 41 pacients amb cirrosi que estaven estables en el moment de l'estudi i en la llista de transplantament hepàtic. Els resultats es van comparar amb un grup control de persones sanes (n=16). També es va valorar l'efecte de l'encefalopatia hepàtica mínima en l'edema cerebral. Un any després del transplantament es va tornar a avaluar un subgrup de pacients (24 individus) per establir l'estat de l'edema cerebral.

Per fer aquests estudis de l'edema cerebral es van adquirir imatges de difusió per RM on es van estudiar dues regions de substància blanca: la via corticoespinal i la substància blanca parietal. Per tal d'esbrinar el tipus de mecanisme implicat en l'edema cerebral es va fer un tractament de les imatges utilitzant una aproximació biexponencial. D'aquesta manera, es podien obtenir dos paràmetres que permetien avaluar de forma més acurada el mecanisme de formació de l'edema (vasogènic/citotòxic).

6.4. Resultats

En pacients amb cirrosi es va trobar un augment del coeficient de difusió i una disminució del factor d'anisotropia en el component ràpid de l'aproximació biexponencial. Aquests paràmetres són compatibles amb un mecanisme vasogènic de l'edema i a més es normalitzen després del tractament (transplantament hepàtic).

En la via corticoespinal s'observa el mateix comportament que en la regió de la substància blanca parietal però, a més, un augment del coeficient de difusió en el component lent de l'aproximació biexponencial. Aquest paràmetre s'associa a un mecanisme citotòxic de l'edema. A més després del tractament les alteracions en aquesta regió persisteixen.

Tanmateix, no es va trobar cap alteració associada a la presència d'encefalopatia hepàtica mínima.

6.5. Article original

Chavarria L, Alonso J, García-Martínez R, Aymerich FX, Huerga E, Jacas C, Vargas V, Cordoba J, Rovira A. **Biexponential Analysis of Diffusion-Tensor Imaging of the Brain in Patients with Cirrhosis before and after Liver Transplantation.** AJNR Am J Neuroradiol. 2011; 32(8):1510-7.

ORIGINAL RESEARCH

L. Chavarria
J. Alonso
R. Garcia-Martinez
F.X. Aymerich
E. Huerga
C. Jacas
V. Vargas
J. Cordoba
A. Rovira



Biexponential Analysis of Diffusion-Tensor Imaging of the Brain in Patients with Cirrhosis before and after Liver Transplantation

BACKGROUND AND PURPOSE: DTI has shown increased MD of water molecules in the brain of patients with cirrhosis, consistent with low-grade edema. This study further characterizes this edema by using biexponential analysis of DTI data, a technique that may differentiate cytotoxic and vasogenic edema.

MATERIALS AND METHODS: A total of 41 patients with cirrhosis awaiting liver transplantation and 16 healthy controls were studied by DTI by using a single-shot echo-planar technique with 11 b-values (range, 0–7500 s/mm²) and 6 noncollinear directions. Measurements were fitted to biexponential function to determine MD and FA for the fast and slow diffusion components. Regions of interest were selected in the parietal white matter and corticospinal tract. The assessment was repeated 1 year after liver transplantation in 24 of these patients.

RESULTS: In parietal white matter, patients with cirrhosis showed an increase in fast MD and a decrease in fast FA that normalized after liver transplantation. In the corticospinal tract, there was an increase in fast and slow MD that normalized after transplantation, and a decrease in FA that persisted posttransplantation. There was no association of DTI parameters with minimal HE (*n* = 12).

CONCLUSIONS: Biexponential analysis of DTI supports the presence of edema in the brain of patients with cirrhosis that reverts after transplantation. In parietal white matter, the increase in brain water was mainly located in the interstitial compartment, while the corticospinal tract showed a mixed pattern (intra- and extracellular). In addition, the findings on posttransplantation were consistent with microstructural damage along the corticospinal tract.

ABBREVIATIONS: ADC = apparent diffusion coefficient; DTI = diffusion tensor imaging; DWI = diffusion-weighted imaging; FA = fractional anisotropy; HCV = hepatitis C virus; HE = hepatic encephalopathy; MD = mean diffusivity

DWI is a noninvasive technique that examines the microscopic random translational motion of water molecules in a fluid system driven by their internal thermal energy.¹ In the central nervous system, diffusion is influenced by the microstructural components of tissue, including cell membranes and organelles. Hence, the diffusion coefficient of biologic tis-

sues measured by DWI is lower than the diffusion coefficient in free water; this is called the ADC.² In clinical practice, DWI is of great value for assessing patients with cerebral ischemia,³ and it may be possible to extend the use of this technique to a wide variety of other neurologic conditions.

DTI provides more detailed information of the movement of water molecules.⁴ White matter tracts are aligned on the scale of an MR image pixel, and the ADC value is sensitive to the direction of the diffusion-sensitizing gradient. Diffusion measurements can give information about the size, shape, integrity, and geometry of white matter tracts.⁵ A measure of diffusion that does not depend on the orientation of the structures examined is provided by the MD. 3D characterization of diffusion can be obtained in terms of a tensor, a 3 × 3 matrix that accounts for the correlation existing between molecular displacements along orthogonal directions.⁶ From the DTI data, it is possible to derive anisotropy indexes, such as FA, which represent a measure of intravoxel fiber coherence in clinical DWI.

Diffusion sensitization is often carried out by using a b-value of 1000 s/mm². The signal-intensity attenuation resulting from water self-diffusion in vivo follows a monoexponential function with this b-value.⁷ However, it has been shown that when b-values above 1000 s/mm² are used, the signal-intensity attenuation is better fitted to a biexponential function.^{8,9} Different models have been proposed to explain the nonmonoexponential behavior of the water signal intensity at high b-values.¹⁰ Some of these models try to associate this

Received November 16, 2010; accepted December 26.

From the Liver Unit (L.C., R.G.-M., V.V., J.C.), Neuropsychology Unit (C.J.), and Magnetic Resonance Unit (D.I., Department of Radiology, (J.A., F.X.A., E.H., C.J., A.R.), Hospital Vall Hebron, Barcelona, Spain; Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (L.C., J.A., C.J., V.V., J.C.), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain; Departament de Medicina (L.C., R.G.-M., V.V., J.C.), Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Spain; and Departament d'Enginyeria de Sistemes, Automàtica i Informàtica Industrial (F.X.A.), Universitat Politècnica de Catalunya, Barcelona, Spain.

This work was supported by a grant from Instituto de Salud Carlos III (PIS P107/064) and P108/0698), Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas is supported by Instituto de Salud Carlos III. Rita Garcia-Martinez is the recipient of a Fondo de Investigación Sanitaria grant, CM07/00109.

Paper previously presented at: Asociación Española para el estudio del Hígado, February 20–22, 2008; Madrid, Spain; Annual Meeting of the European Society of Neuroradiology, September 18–21, 2008; Cracovia, Poland; 13th International Symposium on Hepatic Encephalopathy and Nitrogen Metabolism Symposium, April 28–May 1, 2008; Padova, Italy; and XXX Congreso Nacional de la Sociedad Española de Radiología Médica, May 23–27, 2008; Sevilla, Spain.

Please address correspondence to Alex Rovira, MD, Unitat de Resonància Magnètica Vall Hebron, Hospital Universitari Vall d'Hebron (Soterrani-1), Passeig Vall d'Hebron 119–129, 08035 Barcelona, Spain; e-mail: alex.rovira@idi-cat.org



Indicates open access to non-subscribers at www.ajnr.org

<http://dx.doi.org/10.3174/ajnr.A2533>

behavior with extracellular and intracellular compartments. An alternative model recently proposed suggests that the biexponential model assumes an exchange of water between 2 pools, known as the "slow" and "fast" diffusion pools. According to this model, the slow diffusion pool comprises water that interacts by electrostatic forces with the proteins, cytoskeleton, and membranes of the cell, whereas the fast diffusion pool consists of the remaining water in the intracellular or extracellular space.¹¹ Although the exact pathophysiologic meaning is not known, several works dealing with the existence of cytotoxic or vasogenic edema show different behavior of the variables associated with the biexponential model.

HE is a complication of acute and chronic liver failure that has been associated with a rise in brain water.¹² The development of brain edema may be explained by an increase in blood-brain barrier permeability that leads predominantly to extracellular edema (vasogenic) or to accumulation of water in the astrocytes due to osmotic mechanisms or oxidative stress (cytotoxic). In experimental models of acute liver failure, DTI shows a decrease in MD, which is in accordance with a cytotoxic mechanism.¹³ In contrast, studies in patients with chronic liver failure show an increase in MD, which has been interpreted as a rise of water in the extracellular compartment.^{14,15} Furthermore, the outcome of ADC following HE has been interpreted as a mixed pattern of brain edema.¹⁶

The aim of this study was to analyze brain white matter changes by biexponential analysis of diffusion tensor data in patients with cirrhosis and chronic liver failure to further characterize the presence of edema in these patients. The regions that were selected correspond to those that have been identified as abnormal in previous studies (parietal white matter and the corticospinal tract).^{17,18} The results were analyzed in relation to the presence of cognitive disturbances (minimal HE), and the study was repeated in a group of patients after successful liver transplantation. In addition, to assess the usefulness of biexponential analysis, we compared the results with those obtained with a monoexponential analysis, by using an extended range of b-values.

Materials and Methods

Patient Characteristics

Consecutive patients with cirrhosis undergoing evaluation for liver transplantation at our institution were invited to participate in the study. Forty-one patients without overt signs of HE were included, and 24 of them were studied again 1 year (358 ± 47 days) after liver transplantation (Table 1). Patients with a history of alcohol abuse were abstinent for a period of at least 6 months before the study. All patients underwent the standard assessment of liver function and comorbidities with the determination of clinical and biochemical parameters. The severity of liver failure was estimated with the Child-Pugh score (range, 5–15): mild (Child-Pugh A, 5–6), moderate (Child-Pugh B, 7–10), and severe (Child-Pugh C, 11–15).

All participants (except 3 patients for logistic reasons) completed a battery of neuropsychological tests. The tests assessed memory (Auditory Verbal Learning Memory Test), attention, speed of information processing (Trail A, Symbol Digit Test), psychomotor function (Grooved Pegboard), executive function (Controlled Oral Word Association Test), and visuospatial function (Hooper Visual Organization Test, Judgment of Line Orientation test). The scores for each

Table 1: Clinical characteristics of patients with cirrhosis included in the baseline and longitudinal study, prior to liver transplantation

	Baseline Study	Longitudinal Study
No.	41	24
Age (yr)	56 ± 9	54 ± 9
Male/female	32/9	18/6
Etiology		
HCV	17	12
Alcohol	13	8
HCV + alcohol	6	0
Other	5	4
HE		
Previous episodes	23	12
Minimal encephalopathy	12	8
Child-Pugh A/B/C	11/19/11	4/13/7
Biochemical parameters		
Bilirubin (mg/dL)	3.2 ± 3.5	3.7 ± 4.1
Albumin (mg/dL)	3.1 ± 0.6	3.1 ± 0.5
Creatinine (mg/dL)	0.9 ± 0.3	0.9 ± 0.3
Sodium (mg/dL)	136.1 ± 3.5	135.5 ± 3.8
Prothrombin activity (%)	1.9 ± 0.8	1.9 ± 0.8

test were transformed into *T* values and were adjusted by age, sex, and educational level, as described by Mínguez et al.¹⁹ Patients with ≥ 2 test values below 2 SDs of the mean ($T < 30$) were diagnosed as having minimal HE.²⁰

Sixteen healthy volunteers (6 men/10 women; age, 53 ± 7 years of age) were recruited to form a control group and underwent MR imaging to obtain normal values. None had any history of neurologic illness, alcohol or drug abuse, or liver disease.

The study was approved by the ethics committee of our institution, and informed consent was obtained from participants before they were included in the protocol.

MR Imaging Protocol

MR imaging was performed on a 1.5T Symphony Quantum Maestro Class scanner (Siemens, Erlangen, Germany) equipped with a circular polarized receiver head array coil, with the body coil acting as a transmitter.

The conventional MR imaging protocol included proton attenuation and T2-weighted fast spin-echo (TR/TE/acquisitions/echo-train length, 3550 ms/14–86 ms/1/5) and T1-weighted spin-echo (TR/TE/acquisitions, 650 ms/17 ms/1) sequences. A total of 46 contiguous transverse sections with a thickness of 3 mm, a pixel size of approximately 1×1 mm, an FOV of 250 mm, and an acquisition matrix of 256×256 were used to obtain images.

DTIs were acquired by using a single-shot echo-planar sequence (TR/TE/acquisitions, 1100 ms/145 ms/10) with gradients applied in 6 noncollinear directions and 11 b-values (range, 0–7500 s/mm²). Images were obtained in 5 axial sections centered about 2 cm above the bicommissural line with a section thickness of 4 mm and an intersection gap of 2 mm, an FOV of 250 mm, and an acquisition matrix of 64×64 , which gives an in-plane resolution of 3.9×3.9 mm. Acquisition time of the DTI sequence was 11 minutes 14 seconds.

MR Imaging Analysis

DTI data were analyzed on a Linux Sun Fire X4100 (Sun Microsystems, Santa Clara, California) server with two 2.4-GHz dual-core Opteron processors (AMD, Sunnyvale, California) and 4 GB of RAM by using in-house software written in C programming language. Briefly, after the images were interpolated to 128×128 by using a

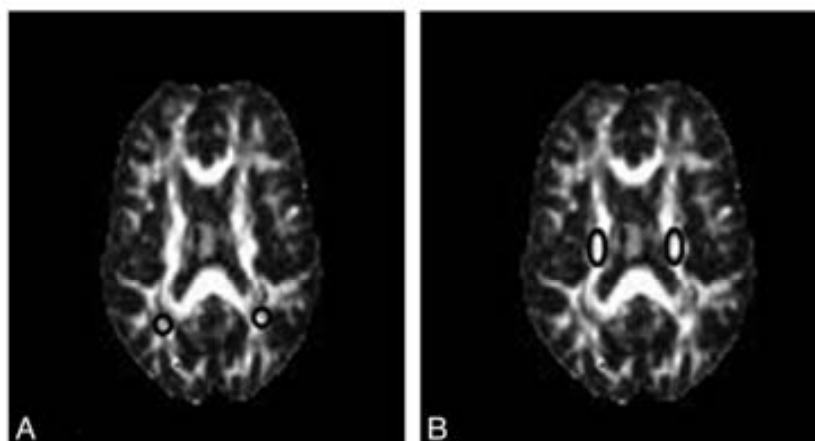


Fig 1. The 4 different supratentorial locations identified in an axial section of FA maps used in the biexponential analysis. A, Regions of interest of parietal white matter. B, Regions of interest of corticospinal tract.

high-resolution cubic spline function, noise reduction was performed by using an algorithm based on the scheme described by Gudbjartsson and Patz²¹ and distortion was corrected considering maximization of mutual information²² between each gradient image and the non-diffusion-sensitized image ($b = 0 \text{ s/mm}^2$) for each section by using the Nelder and Mead simplex algorithm.²³

The analysis was made from regions of interest within the corticospinal tract and parietal white matter. Regions of interest (10–15 pixels) were delineated by using a MRICRO viewer (<http://www.sph.sc.edu/comd/rorden/mricro.html>)²⁴ by visual inspection of the non-diffusion-sensitized images and FA maps for each section. Four different supratentorial locations were then identified in each axial section (Fig 1).

Brain signal-intensity decay was studied on the basis of a monoexponential and biexponential fitting approach, by using 11 b-values from 0–7500 s/mm^2 .

Monoexponential fitting was obtained according to the following expression:

$$1) \quad S = S_0 e^{-\sum_{i=1}^3 \sum_{j=1}^6 b_{ij} D_{ij}}$$

where S is the b-dependent signal intensity in the image, S_0 is the signal intensity in absence of diffusion sensitization, b_{ij} is the i, j th component of the diffusion-weighting b-matrix, D_{ij} is the i, j th component of the diffusion tensor, and $i, j = x, y, z$.

The nonlinear equation system obtained from equation 1, with the 11 b-values and 6 gradient directions, was solved by fitting S_0 and D_{ij} by using Lourakis' implementation²⁵ of the Levenberg-Marquardt optimization algorithm. Next, the diffusion tensor was diagonalized to obtain eigenvalues and eigenvectors. The eigenvalues were then used to compute the FA and MD with the following expressions:

$$2) \quad FA = \frac{1}{\sqrt{2}} \sqrt{\frac{(\lambda_1 - \lambda_2)^2 + (\lambda_2 - \lambda_3)^2 + (\lambda_1 - \lambda_3)^2}{\lambda_1^2 + \lambda_2^2 + \lambda_3^2}}$$

$$3) \quad MD = \frac{\lambda_1 + \lambda_2 + \lambda_3}{3}$$

The biexponential model contemplated the fast and slow water diffusion components as follows:

$$4) \quad S = S_0^{fast} e^{-\sum_{i=1}^3 \sum_{j=1}^6 b_{ij} D_{ij}^{fast}} + S_0^{slow} e^{-\sum_{i=1}^3 \sum_{j=1}^6 b_{ij} D_{ij}^{slow}}$$

where S is the b-dependent signal intensity in the image; S_0^{fast} and S_0^{slow} are the signal intensities (T2-weighted) in the absence of diffusion sensitization, corresponding to fast and slow components, respectively; b_{ij} is the i, j th component of the diffusion-weighting b-matrix; D_{ij}^{fast} and D_{ij}^{slow} are the i, j th components of the diffusion tensor associated with fast and slow components, respectively; and $i, j = x, y, z$.

As in monoexponential analysis, the nonlinear equation system obtained from equation 4 was solved by fitting the parameters S_0^{fast} , S_0^{slow} , D_{ij}^{fast} , and D_{ij}^{slow} . Eigenvalues and eigenvectors for both components were then obtained by diagonalization of the fast and slow diffusion tensor components. FA, relative signal intensity components (fr_{fast} and fr_{slow}), and MD were computed from the eigenvalues for each component as follows:

$$5) \quad fr_{fast} = 100 \frac{S_0^{fast}}{S_0^{fast} + S_0^{slow}}$$

$$6) \quad fr_{slow} = 100 \frac{S_0^{slow}}{S_0^{fast} + S_0^{slow}}$$

$$7) \quad MD_{fast} = \frac{\lambda_1^{fast} + \lambda_2^{fast} + \lambda_3^{fast}}{3}$$

$$8) \quad MD_{slow} = \frac{\lambda_1^{slow} + \lambda_2^{slow} + \lambda_3^{slow}}{3}$$

$$9) \quad FA_{fast} = \frac{1}{\sqrt{2}} \sqrt{\frac{(\lambda_1^{fast} - \lambda_2^{fast})^2 + (\lambda_2^{fast} - \lambda_3^{fast})^2 + (\lambda_1^{fast} - \lambda_3^{fast})^2}{\lambda_1^{fast^2} + \lambda_2^{fast^2} + \lambda_3^{fast^2}}}$$

$$10) \quad FA_{slow} = \frac{1}{\sqrt{2}} \sqrt{\frac{(\lambda_1^{slow} - \lambda_2^{slow})^2 + (\lambda_2^{slow} - \lambda_3^{slow})^2 + (\lambda_1^{slow} - \lambda_3^{slow})^2}{\lambda_1^{slow^2} + \lambda_2^{slow^2} + \lambda_3^{slow^2}}}$$

Statistical Analysis

Values are expressed as the mean \pm SD. Significant differences between intergroup data were verified with the Mann-Whitney U test, and comparisons between continuous variables were carried out with the Wilcoxon W test. P values $< .050$ were considered statistically significant. All statistical analyses were performed with the Statistical Package for the Social Sciences, Version 11.5 software (SPSS, Chicago, Illinois).

Results

In the parietal white matter of patients with cirrhosis, DTI with biexponential fitting detected an increase in the MD for fast diffusion, which returned to normal after liver transplantation (controls: $1251 \pm 48 \mu\text{m}^2/\text{s}$ versus posttransplantation: $1250 \pm 52 \mu\text{m}^2/\text{s}$; $P = .863$) (Fig 2A). In addition, patients with cirrhosis showed a decrease in FA that increased after liver transplantation (Fig 3A). There was a trend to a similar pattern in the MD and FA for slow diffusion (Figs 2B and 3B), but significant differences were only found in the slow FA before and after liver transplantation. In the monoexponential fitting for MD (Fig 2C) and FA (Fig 3C), significant differences were also found only for FA before and after transplantation.

In the corticospinal tract of patients with cirrhosis, an MD increase was observed for both fast (Fig 4A) and slow diffusion (Fig 4B). The FA exhibited a significant decrease only in the fast FA (Fig 5A). However, after liver transplantation, only the fast MD returned to normal (Fig 4A) (controls: $1190 \pm 8 \mu\text{m}^2/\text{s}$ versus posttransplantation: $1218 \pm 48 \mu\text{m}^2/\text{s}$; $P = .127$). A persistent decrease was seen in the fast component of FA (controls: 0.545 ± 0.044 versus posttransplantation: 0.490 ± 0.054 ; $P = .001$) (Fig 5A). The monoexponential fitting also showed an increase in MD (Fig 4C) with a decrease in FA (Fig 5C).

There were no changes in the relative signal intensity in the parietal white matter for fast (cirrhosis pretransplant: 66.9 ± 2.7 versus controls: 68.5 ± 1.0 ; $P = .972$) or slow diffusion (cirrhosis pretransplant: 33.6 ± 1.0 versus controls: 33.1 ± 2.7 ; $P = .972$) and in the corticospinal tract for fast (cirrhosis pretransplant 71.2 ± 1.7 versus controls: 72.1 ± 3.4 ; $P = .477$) or slow diffusion (cirrhosis pretransplant: 28.8 ± 3.2 versus controls: 27.8 ± 3.4 ; $P = .477$).

The changes in the DTI parameters of the brain in patients with cirrhosis did not relate to impairment on neuropsychological testing. Patients with minimal HE showed values similar to those of patients with normal psychometric test results (Table 2). There was no correlation between DTI parameters, Child-Pugh scores, and biochemical parameters (albumin, sodium, bilirubin, and prothrombin levels).

Discussion

In this study, MR imaging signs consistent with brain edema were present in the white matter of patients with cirrhosis. DTI and biexponential fitting found an increase in the fast MD values in the parietal white matter and corticospinal tract. These results are consistent with those of previous studies, in which DWI¹⁵ or DTI¹⁴ with monoexponential fitting was used; thus, they support the concept that the increased brain water in cirrhosis is mainly extracellular. These observations contrast with a recent hypothesis suggesting that the brain edema in acute liver failure has a cytotoxic origin.¹³

The exact physiologic meaning of the fast and slow components of diffusion is still under discussion.¹⁰ The idea that the slow diffusion component measures the intracellular space and the fast diffusion component, the extracellular space lacks confirmatory data. The volume fractions obtained from biexponential analysis of water signal-intensity decay ($F_{\text{slow}} \sim 0.33$; $F_{\text{fast}} \sim 0.67$) do not correspond to the physiologic volume fractions of the extra- and intracellular compartments ($F_{\text{intra}} \sim 0.80$; $F_{\text{extra}} \sim 0.20$).^{9,26} A more recent theory has

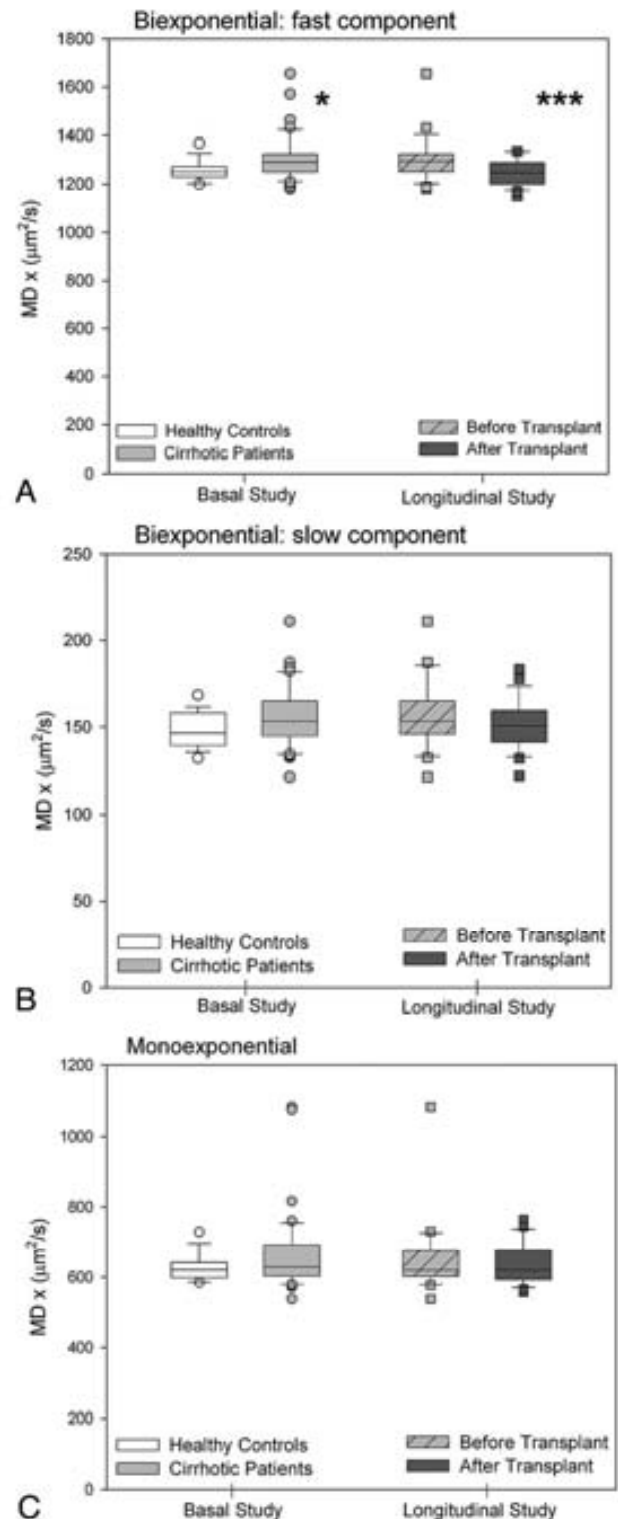


Fig 2. MD values (square micrometers per second) of parietal white matter by using biexponential fitting. **A.** Fast component. **B.** Slow component. **C.** Monoexponential fitting in patients with cirrhosis ($n = 41$) compared with controls ($n = 16$) and in the subgroup of patients with cirrhosis who underwent liver transplantation ($n = 24$, before and after liver transplantation). Single asterisk indicates $P < .050$; and triple asterisk, $P < .001$ between cirrhosis and controls (Mann-Whitney U) and in paired comparisons of patients with cirrhosis before and after liver transplantation (Wilcoxon W).

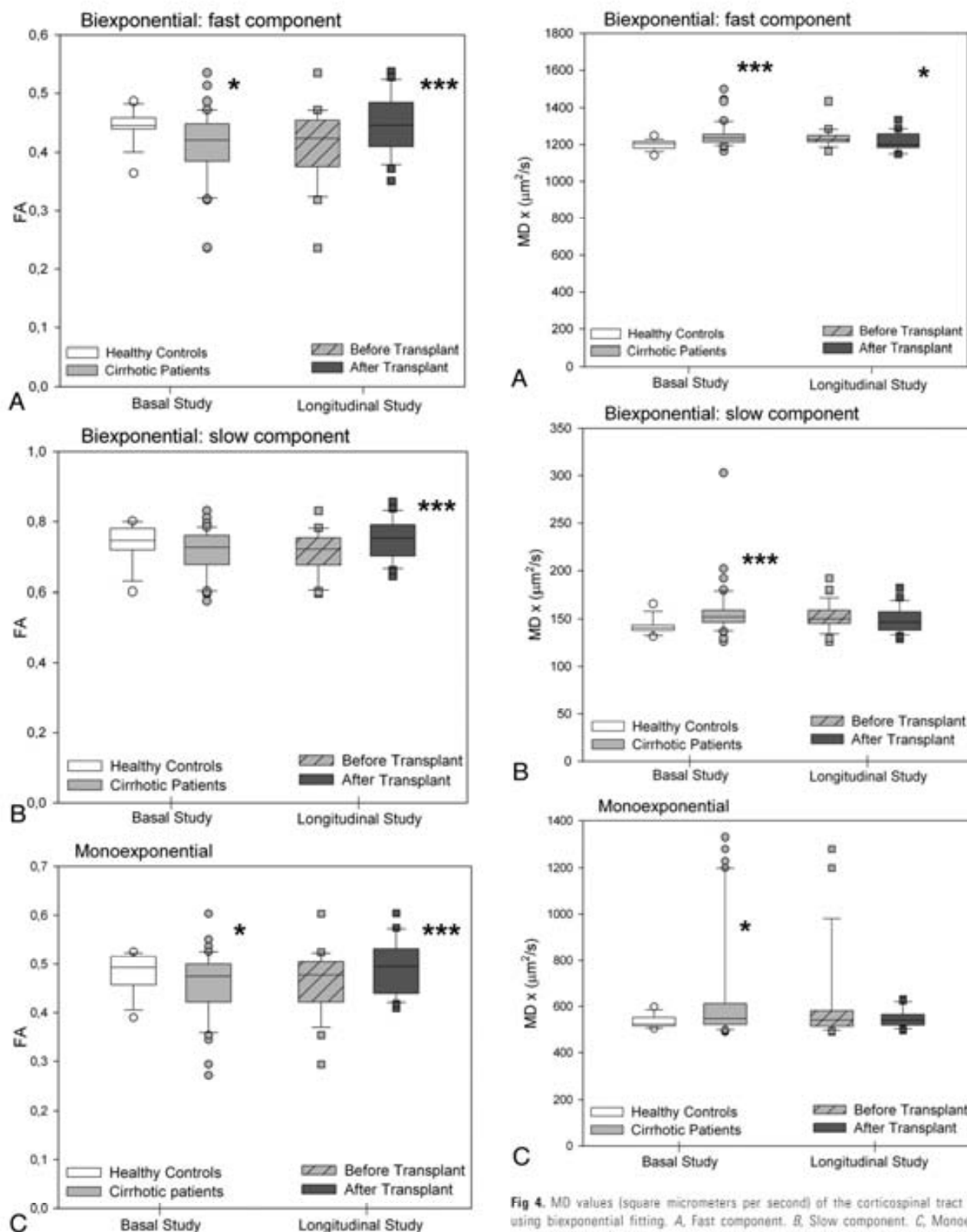


Fig 3. FA values (ratio) of parietal white matter by using biexponential fitting. **A.** Fast component. **B.** Slow component. **C.** Monoexponential fitting in patients with cirrhosis ($n = 41$) compared with controls ($n = 16$) and in the subgroup of patients with cirrhosis who underwent liver transplantation ($n = 24$, before and after liver transplantation). Single asterisk indicates $P < .050$; and triple asterisk, $P < .001$ between cirrhosis and controls (Mann-Whitney U) and in paired comparisons of patients with cirrhosis before and after liver transplantation (Wilcoxon W).

Fig 4. MD values (square micrometers per second) of the corticospinal tract by using biexponential fitting. **A.** Fast component. **B.** Slow component. **C.** Monoexponential fitting in patients with cirrhosis ($n = 41$) compared with controls ($n = 16$) and in the subgroup of patients with cirrhosis who underwent liver transplantation ($n = 24$, before and after liver transplantation). Single asterisk indicates $P < .050$; and triple asterisk, $P < .001$ between cirrhosis and controls (Mann-Whitney U) and in paired comparisons of patients with cirrhosis before and after liver transplantation (Wilcoxon W).

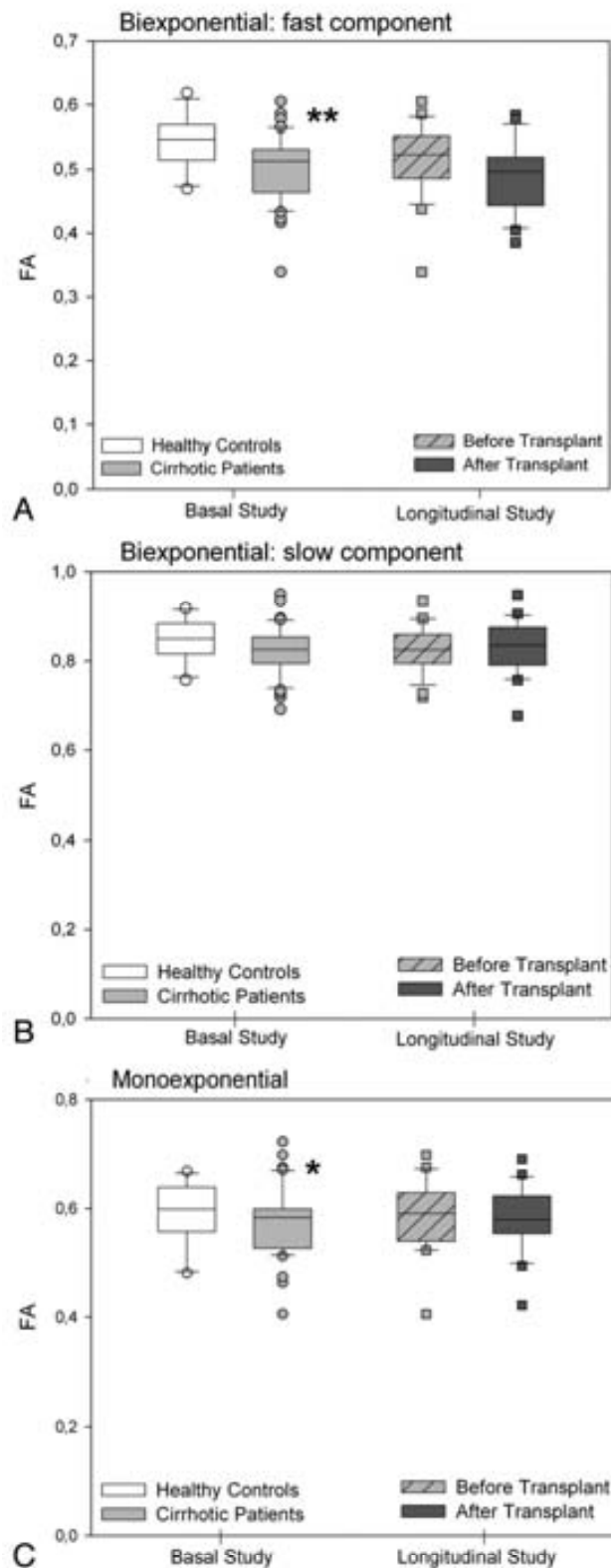


Fig 5. FA values (ratio) of the corticospinal tract by using a biexponential fitting. **A.** Fast component. **B.** Slow component. **C.** Monoexponential fitting in patients with cirrhosis ($n = 41$) compared with controls ($n = 16$) and in the subgroup of patients with cirrhosis who underwent liver transplantation ($n = 24$, before and after liver transplantation). Single asterisk indicates $P < .050$; and double asterisks, $P < .010$, between cirrhosis and controls (Mann-Whitney U) and in paired comparisons of patients with cirrhosis before and after liver transplantation (Wilcoxon W).

suggested that the 2 components could correspond to 2 differently structured water pools rather than to specific extracellular and intracellular water compartments.¹¹ Despite this controversy, we decided to perform a DTI study over a large range of b -values to investigate whether biexponential analysis could potentially differentiate the cytotoxic or vasogenic nature of the edema. This idea was based on previous studies showing that cytotoxic edema, a feature of the early phase of ischemic stroke, causes an increase in the slow MD,²⁷ whereas vasogenic edema, typically present surrounding brain tumors, causes an increase in the fast MD.²⁸

The observation of a fast MD increase that returned to normal after liver transplantation supports the concept that the increased water content was mainly located in the interstitial compartment. The decreased FA in white matter, which occurred parallel to the MD increase, likely represents less restricted movement of water molecules, a typical feature of extracellular edema.²⁸ Liver transplantation restores liver function and results in resolution of brain edema. In accordance, FA in parietal white matter DTI normalized following transplantation.

Brain edema is a well-recognized complication of acute liver failure related to ammonia-induced astrocyte swelling that can cause intracranial hypertension and death.^{29,30} In recent years, MR imaging techniques have documented low-grade brain edema in patients with chronic liver failure.³¹ This observation led to the proposal that encephalopathy in cirrhosis is the clinical manifestation of neuronal dysfunction secondary to astrocyte swelling.³² In support of this hypothesis, quantitative cerebral water-content mapping found an increase in total brain water in patients with HE.¹² However, the characteristics of brain edema in cirrhosis appear to differ from those of edema in acute liver failure. Our observations and those of previous studies^{14,15} in cirrhosis support a water increase in the interstitial compartment, which could be explained by greater blood-brain barrier permeability, secondary to chronic inflammation and cytokine activation.³³ The increased permeability could result in low-grade interstitial brain edema, which would not affect neuronal function because it is located extracellularly. This could be the reason why we found no differences in the fast MD between patients with and without minimal HE. The absence of differences in MR imaging parameters in these patients has been observed in previous studies by using magnetization transfer imaging,¹⁷ DWI,¹⁵ and DTI.¹⁴

Episodes of HE are usually related to a precipitating factor that causes acute hyperammonemia. In acute liver failure, persistent elevation of ammonia concentration above $200 \mu\text{mol/L}$ leads to brain edema and intracranial hypertension.³⁴ It is plausible that the precipitating factor of episodic encephalopathy would induce superimposed swelling of astrocytes and cytotoxic edema. This is supported by the observation of an MD decrease in patients with acute-on-chronic liver failure.³⁵ Thus, a better explanation of what occurs during episodes of HE is the presence of mixed edema,¹⁶ consisting of chronic vasogenic edema secondary to cirrhosis and superimposed acute cytotoxic edema secondary to hyperammonemic decompensation.

An additional finding in our study is the differing pattern observed in the parietal white matter and corticospinal tract.

Table 2: Biexponential analysis of DTI in patients with cirrhosis according to the presence of minimal HE*

	Parietal White Matter		Corticospinal Tract	
	Normal Psychometric Test Results	Minimal HE	Normal Psychometric Test Results	Minimal HE
Fast component				
MD · 10 ⁻⁴ (mm ² /s)	12.97 ± 0.69	13.00 ± 1.14	12.46 ± 0.64	12.49 ± 0.61
FA	0.42 ± 0.06	0.41 ± 0.06	0.51 ± 0.05	0.49 ± 0.06
Slow component				
MD · 10 ⁻⁴ (mm ² /s)	1.56 ± 0.15	1.53 ± 0.22	1.58 ± 0.32	1.52 ± 0.13
FA	0.72 ± 0.06	0.72 ± 0.05	0.83 ± 0.05	0.81 ± 0.06

* P < .05.

Regional differences on MR imaging have been reported for T1-³⁶ and T2-weighted imaging,¹⁸ and for DWI.¹⁴ In a previous study by using fluid attenuated inversion recovery imaging, we found an increased T2 signal intensity in the corticospinal tract in approximately 25% of patients with cirrhosis. This abnormality, which is associated with functional impairment detected by neurophysiologic methods, probably corresponds to the same pathogenic syndrome as hepatic myelopathy,³⁷ but to a lesser extent. In comparison with the parietal white matter, the corticospinal tract showed an increase in fast and slow MD, which suggests coexistence of extracellular and intracellular edema. The higher vulnerability of this tract to the putative toxins that cause HE has been explained by higher energy requirements that may lead to long-term effects.³⁸ FA of the corticospinal tract did not change after liver transplantation, despite MD normalization. The persistent isotropy (lower FA) in the corticospinal tract probably relates to microscopic structural changes, such as those caused by demyelination.³⁹ Myelin loss can explain the persistent functional derangement after liver transplantation in patients with well-defined hepatic myelopathy³⁷ and in those with T2 hyperintensity along the corticospinal tract.³⁸

One important result of our study is that introduction of a biexponential analysis-enabled detection of MD and FA changes that monoexponential analysis did not show, as can be seen in Figs 1–4. Thus, in addition to providing information that could be pathophysiologically relevant, biexponential analysis enables detection of changes in the water pools that escape monoexponential study. Application of this method to other pathologic conditions, such as ischemia or demyelinating disorders, could be useful for assessing the extent of tissue damage.

The current study has several limitations that should be taken into consideration in the interpretation of the results. The MR imaging method (biexponential analysis of DTI) has the previously discussed differences between physiologic and measured volume fractions. Although statistically significant, the intensity of changes in DTI parameters before and after liver transplantation was low (approximately 2%). Thus, it may be difficult to show differences in studies with limited numbers of patients or multiple comorbidities. Cognitive function is influenced by several factors that are present before and after liver transplantation, and some of these may not have been adequately recognized in the study. The diagnosis of minimal HE is based on demonstration of cognitive disturbance in the absence of other causes, but several factors could have participated in the deterioration seen on neuropsychological tests before liver transplantation. Immunosuppressors,

which are necessary after liver transplantation, may cause white matter lesions.⁴⁰ We did not observe signs of neurotoxicity attributable to immunosuppressors, but a possible role in the outcome after liver transplantation cannot be completely ruled out because it is not possible to control for their effect.

Conclusions

Biexponential analysis supports the existence of different patterns of edema in the brains of patients with cirrhosis, likely an extracellular pattern in the parietal white matter and a mixed pattern along the corticospinal tract. The edema is reversible with liver transplantation, but some microstructural damage may persist along the corticospinal tract, as is suggested by the evolution of FA. Biexponential analysis of diffusion tensor data is a powerful method for studying the pathogenesis of brain edema in cirrhosis, which may be useful for diagnosing brain injury in other conditions.

Disclosures: Alex Rovira, Speaker Bureau: Bayer-Schering, Biogen, Bracco, Teva. Consultant: Parxel.

References

- LeBihan D, Breton E, Lallemand D, et al. MR imaging of intravoxel incoherent motions: application to diffusion and perfusion in neurologic disorders. *Radiology* 1986;161:401–07
- LeBihan D, Mangin JF, Poupon C, et al. Diffusion tensor imaging: concepts and applications. *J Magn Reson Imaging* 2001;13:534–46
- Warach S, Dashe JF, Edelman RR. Clinical outcome in ischemic stroke predicted by early diffusion-weighted and perfusion magnetic resonance imaging: a preliminary analysis. *J Cereb Blood Flow Metab* 1996;16:53–59
- Alexander AL, Lee JE, Lazar M, et al. Diffusion tensor imaging of the brain. *Neurotherapeutics* 2007;4:316–29
- Pierpaoli C, Jezzard P, Basser PJ, et al. Diffusion tensor MR imaging of the human brain. *Radiology* 1996;201:637–48
- Basser PJ, Pierpaoli C. Microstructural and physiological features of tissues elucidated by quantitative-diffusion-tensor MRI. *J Magn Reson B* 1996;111:209–19
- Farrell JA, Smith SA, Gordon-Lipkin EM, et al. High b-value q-space diffusion-weighted MRI of the human cervical spinal cord in vivo: feasibility and application to multiple sclerosis. *Magn Reson Med* 2008;59:1079–89
- Clark CA, LeBihan D. Water diffusion compartmentation and anisotropy at high b values in the human brain. *Magn Reson Med* 2000;44:852–59
- Niendorf T, Dijkhuizen RM, Norris DG, et al. Biexponential diffusion attenuation in various states of brain tissue: implications for diffusion-weighted imaging. *Magn Reson Med* 1996;36:847–57
- Mulkern RV, Haker SJ, Maier SE. On high b diffusion imaging in the human brain: ruminations and experimental insights. *Magn Reson Imaging* 2009;27:1151–62
- LeBihan D. The 'wet mind': water and functional neuroimaging. *Phys Med Biol* 2007;52:R57–90. Epub 2007 Mar 9
- Shah NJ, Neeb H, Kircheis G, et al. Quantitative cerebral water content mapping in hepatic encephalopathy. *Neuroimage* 2008;41:706–17
- Chavarria L, Oria M, Romero-Gimenez J, et al. Diffusion tensor imaging supports the cytotoxic origin of brain edema in a rat model of acute liver failure. *Gastroenterology* 2010;138:1566–73
- Kale RA, Gupta RK, Saraswat VA, et al. Demonstration of interstitial cerebral

- edema with diffusion tensor MR imaging in type C hepatic encephalopathy. *Hepatology* 2006;43:698–706
15. Lodi R, Tonon C, Stracciari A, et al. Diffusion MRI shows increased water apparent diffusion coefficient in the brains of cirrhotics. *Neurology* 2004;62:762–66
 16. Poveda MJ, Bernabeu A, Concepcion L, et al. Brain edema dynamics in patients with overt hepatic encephalopathy: a magnetic resonance imaging study. *Neuroimage* 2010;52:481–87
 17. 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;35:598–604
 18. Rovira A, Cordoba J, Sanpedro F, et al. Normalization of T2 signal abnormalities in hemispheric white matter with liver transplant. *Neurology* 2002;59:335–41
 19. Minguez B, Garcia-Pagan JC, Bosch J, et al. Noncirrhotic portal vein thrombosis exhibits neuropsychological and MR changes consistent with minimal hepatic encephalopathy. *Hepatology* 2006;43:707–14
 20. Ingraham LJ, Aiken CB. An empirical approach to determining criteria for abnormality in test batteries with multiple measures. *Neuropsychology* 1996;10:120–24
 21. Gudbjartsson H, Patz S. The Rician distribution of noisy MRI data. *Magn Reson Med* 1995;34:910–14
 22. Maes F, Collignon A, Vandermeulen D, et al. Multimodality image registration by maximization of mutual information. *IEEE Trans Med Imaging* 1997;16:187–98
 23. Nelder JA, Mead R. A simplex method for function minimization. *The Computer Journal* 1965;7:308–13
 24. Rorden C, Brett M. Stereotaxic display of brain lesions. *Behav Neurol* 2000;12:191–200
 25. Lourakis MIA. Levmar: Levenberg-Marquardt nonlinear least squares algorithms in C/C++. <http://www.ccs.forth.gr/~lourakis/levmar/>. 2004. Accessed January 31, 2005
 26. Mulkern RV, Gudbjartsson H, Westin CF, et al. Multi-component apparent diffusion coefficients in human brain. *NMR Biomed* 1999;12:51–62
 27. Brugieres P, Thomas P, Maraval A, et al. Water diffusion compartmentation at high b values in ischemic human brain. *AJNR Am J Neuroradiol* 2004;25:692–98
 28. Schwarz A, Ursprung Z, Berente Z, et al. In vivo brain edema classification: new insight offered by large b-value diffusion-weighted MR imaging. *J Magn Reson Imaging* 2007;25:26–31
 29. Cordoba J, Blei AT. Brain edema and hepatic encephalopathy. *Semin Liver Dis* 1996;16:271–80
 30. Larsen FS, Wendon J. Brain edema in liver failure: basic physiologic principles and management. *Liver Transpl* 2002;8:983–89
 31. Rovira A, Cordoba J, Raguer N, et al. Magnetic resonance imaging measurement of brain edema in patients with liver disease: resolution after transplantation. *Curr Opin Neurol* 2002;15:731–37
 32. Haussinger D, Schliess F. Astrocyte swelling and protein tyrosine nitration in hepatic encephalopathy. *Neurochem Int* 2005;47:64–70
 33. Chastre A, Jiang W, Desjardins P, et al. Ammonia and proinflammatory cytokines modify expression of genes coding for astrocytic proteins implicated in brain edema in acute liver failure. *Metab Brain Dis* 2010;25:17–21
 34. Tofteng F, Hauerberg J, Hansen BA, et al. Persistent arterial hyperammonemia increases the concentration of glutamine and alanine in the brain and correlates with intracranial pressure in patients with fulminant hepatic failure. *J Cereb Blood Flow Metab* 2006;26:21–27
 35. Nath K, Saraswat VA, Krishna YR, et al. Quantification of cerebral edema on diffusion tensor imaging in acute-on-chronic liver failure. *NMR Biomed* 2008;21:713–22
 36. Shah NJ, Neeb H, Zaitsev M, et al. Quantitative T1 mapping of hepatic encephalopathy using magnetic resonance imaging. *Hepatology* 2003;38:1219–26
 37. Weissenborn K, Tietge UJ, Bokemeyer M, et al. Liver transplantation improves hepatic myelopathy: evidence by three cases. *Gastroenterology* 2003;124:346–51
 38. Cordoba J, Raguer N, Flavia M, et al. T2 hyperintensity along the cortico-spinal tract in cirrhosis relates to functional abnormalities. *Hepatology* 2003;38:1026–33
 39. Schneider JF, Il'yasov KA, Boltshauser E, et al. Diffusion tensor imaging in cases of adrenoleukodystrophy: preliminary experience as a marker for early demyelination? *AJNR Am J Neuroradiol* 2003;24:819–24
 40. Wijldicks EF. Neurotoxicity of immunosuppressive drugs. *Liver Transpl* 2001; 7:937–42



ESTUDI 3

7. ESTUDI 3

Estudi de RM cerebral en pacients amb cirrosi i amb EH.

7.1. Introducció

L'EH és un desordre cerebral amb implicacions que van des de alteracions lleus de la funció cognitiva fins a un coma profund. L'EH es diagnostica per exclusió d'altres malalties neurològiques. Es creu que l'amoníac, l'edema cerebral i el metabolisme energètic són els possibles factors implicats en la patogènesi de l'EH. S'ha utilitzat la RM per avaluar les alteracions cerebrals associades a l'EH.

7.2. Objectius

Obtenir informació sobre els factors que intervenen en la patogènesi de l'EH. Per això es van analitzar les alteracions produïdes per l'edema cerebral en pacients amb cirrosi durant un episodi d'EH i es seguirà la seva evolució després de la recuperació de l'EH. També es valoraran els canvis en el metabolisme cerebral abans i després de l'episodi EH. Finalment s'estudiaran les lesions de leucaraïosis d'aquest pacients.

7.3. Materials i mètodes

En aquest estudi es van reclutar 18 pacients cirròtics amb EH i es van comparar amb un grup de control de persones sanes (n=8). Sis setmanes després de l'episodi agut es va tornar a avaluar els pacients (14 individus ja que es van perdre 2 pacients i es van morir 2 més durant el seguiment).

Es varen obtenir imatges potenciades en T2 amb una seqüència FLAIR per veure les lesions focals en substància blanca, imatges de difusió per observar la mobilitat de l'aigua en dues regions: la via corticoespinal i la substància blanca parietal i relacionar els canvis amb la presència d'edema i un espectre en la regió de substància blanca parietal per veure les alteracions metabòliques durant l'EH.

7.4. Resultats

Els pacients amb cirrosi i EH presenten un augment de la glutamina cerebral i una disminució de la colina. Aquest augment del pic de glutamina es correlaciona amb

els nivells d'amoní plasmàtic i amb el grau d'EH ($r = 0,622$, $p = 0,006$). A més existeix un augment del coeficient de difusió aparent al cervell que disminueix després de la recuperació de l'episodi d'EH. Aquests resultats són compatibles amb un augment d'aigua a l'espai extracel·lular (edema vasogènic) però no s'observa una correlació entre el coeficient de difusió i el grau d'EH. Aquests pacients són propensos a tenir lesions leucariòtiques i l'àrea d'aquestes lesions disminueix significativament després de l'episodi d'EH.

7.5. Article original

Chavarria L, Alonso J, García-Martínez R, Simón-Talero M, Ventura-Cots M, Torrens M, Vargas V, Rovira A, Cordoba J. **Brain glutamine assessed by magnetic resonance spectroscopy in episodic hepatic encephalopathy.** [Enviat per a publicació].

Title: Brain glutamine assessed by magnetic resonance spectroscopy in episodic hepatic encephalopathy

Authors:

Laia Chavarria^{1,2,3}, Juli Alonso^{2,4}, Rita García-Martínez¹, Macarena Simón-Talero^{1,3}, Meritxell Ventura-Cots^{1,3}, Clara Ramírez⁵, Maria Torrens¹, Víctor Vargas^{1,2,3}, Alex Rovira⁴, Juan Cordoba^{1,2,3}

Affiliations:

1. Liver Unit, Hospital Vall d'Hebron, Barcelona, Spain
2. Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBEREHD), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain
3. Departament de Medicina, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Spain
4. Magnetic Resonance Unit (IDI), Department of Radiology, Hospital d'Vall Hebron, Barcelona, Spain
5. Biochemistry Unit, Hospital Vall d'Hebron, Barcelona, Spain

Author addresses:

Laia Chavarria: lchavarria@vhir.org

Juli Alonso: julialonso@idi-cat.org

Rita García-Martínez: humrita77@yahoo.es

Macarena Simón-Talero: ms-talero@hotmail.com

Meritxell Ventura: txell.ventura.cots@gmail.com

Clara Ramirez: clramirez@vhebron.net

Maria Torrens: mariacadaques@hotmail.com

Víctor Vargas: vvargas@vhebron.net

Alex Rovira: alex.rovira@idi-cat.org

Joan Córdoba: jcordoba@vhebron.net

Contact Information:

Juan Córdoba Cardona
Hospital Universitari Vall d'Hebron
Passeig Vall d'Hebron 119-129
08035 Barcelona, Spain
Email: jcordoba@vhebron.net
Tel: +34 932476140
Fax: +34 932476068

Disclosures

Nothing to disclose

Keywords:

Acute hepatic encephalopathy, spectroscopy, glutamine, blood-brain-barrier

Grant Support:

This project was supported by grant from Instituto de Salud Carlos III (FIS PI07/0641 and PI08/0698). CIBEREHD is supported by *Instituto de Salud Carlos III*. Rita García-Martínez is the recipient of grant CM07/00109.

Abbreviation Key:

HE: hepatic encephalopathy

MR: magnetic resonance

ADC: apparent diffusion coefficient

FLAIR: fluid attenuated inversion recovery

TR: repetition time

TE: echo time

TI: inversion time

TF: turbo factor

Ins: myo-inositol

Glx: glutamine and glutamate

Gln: glutamine

Glu: glutamate

NAA: N-acetylaspartate

Cr: creatine

ABSTRACT

Background and aims: Proton magnetic resonance (MR) spectroscopy (1H-MRS) and diffusion-weighted imaging have shown abnormalities that could be useful for the diagnosis of hepatic encephalopathy (HE). However, most MR studies have been performed in minimal HE and have not reassessed the same patient after the recovery of HE. Furthermore, these studies have been performed on 1.5T MR magnets, which lacked enough resolution to assess glutamine. For these reasons, we designed a study to investigate the disturbances of brain water and metabolites and relate them to the outcome of HE using a 3T-MR scanner.

Methods: Cirrhotic patients with overt signs of HE (n=18) at the time of admission (grade I-II: n=6, grade III-IV: n=12) and a group of healthy voluntaries (n=8) underwent brain MR that was repeated at six weeks (n=14).

Results: Brain glutamine was high at baseline (Gln/Cr: 2.40 ± 0.78 vs 0.22 ± 0.08 , $P < 0.001$), decreased during follow-up (1.55 ± 0.55 , $P = 0.028$), related to the severity of HE ($r = 0.62$; $P = 0.006$) and correlated to plasma ammonia ($r = 0.513$, $P = 0.006$). During HE, patients exhibited high apparent diffusion coefficient, and focal white matter lesions compatible with vasogenic edema. However, apparent diffusion coefficient values did not correlate to the grade of HE.

Conclusions: Brain glutamine assessed by 1H-MRS could be a good biomarker for the assessment of HE. The increase of water in HE is likely limited to the extracellular compartment suggesting vasogenic edema secondary to disturbances in the blood-brain-barrier. However, the pathogenesis of HE does not seem to be directly imputable to brain edema.

INTRODUCTION

Hepatic encephalopathy (HE) is a common complication of cirrhosis that covers a wide range of neurological complications, from subtle cognitive deficits (minimal HE) to deep coma (1). The diagnosis is based on the exclusion of alternative neurological disorders. However, in clinical practice this may be difficult, due to high number of comorbidities present in patients with cirrhosis (2). For this reason, it would be useful to develop accurate markers for the diagnosis of HE. Proton magnetic resonance (MR) spectroscopy (1-H MRS) and diffusion-weighted MR imaging have shown a series of brain metabolic abnormalities and changes in the amount and distribution of water that could be useful for this purpose. The metabolic fingerprint observed on 1-H-MRS obtained in 1.5 T

equipments is characterized by an increase in the Glx peak, which includes glutamate and glutamine, and a decrease in myo-inositol and choline derivatives (3-5). This pattern has been attributed to the induction of elevated intracellular osmolality and the compensatory release of organic osmolytes (myo-inositol and glycerophosphocholine) during the metabolism of ammonia into glutamine in the astrocyte.

Current hypothesis on the pathogenesis of HE are focused on the impairment of astrocyte function (6), which determines the integrity of the blood-brain-barrier, the concentration of neurotransmitters in the synaptic cleft and the energetic supply to the neuron. Dysfunction of the astrocyte may be secondary to swelling induced by multiple factors present in liver

failure (e.g. hyponatremia, ammonia, cytokines) (7). Water quantification has demonstrated a trend towards higher proportion of water in the white matter in overt HE (grade I-II) (8), which can explain disturbances in magnetization transfer ratio found in cirrhosis (3;9). However, contrary to what should be expected from the hypothesis of edema secondary to astrocyte swelling, MR data in cirrhosis show an increase of water in the extracellular compartment (10). It is plausible that the pathogenesis of brain edema depends on the temporal pattern of liver injury. Experimentally induced hyper-acute liver failure causes intracellular brain swelling (low ADC) without injuring the blood-brain-barrier (11), but sub-acute models are characterized by a mixed pattern of cytotoxic (intracellular) and vasogenic (extracellular) edema (12). A similar ADC pattern has been observed in patients with acute liver failure (cytotoxic edema) (13) and acute-on-chronic liver failure (mixed vasogenic and cytotoxic edema) (14).

The majority of episodes of HE develop in patients with cirrhosis. However, most MR studies have been performed in patients with minimal HE and few studies have controlled for individual variables by reassessing the same patient after the recovery of HE (15). Furthermore, these studies have been performed on 1.5T magnets, which lack enough resolution to separate glutamine and glutamate peaks (figure 1 supplementary material).

The aim of the study was to investigate the disturbances of brain water and metabolites and relate them to the course of HE. MR was performed with a 3T-scanner, which allows assessing brain glutamine (16), a key factor in ammonia-related neurotoxicity (17). These findings could support current pathogenic

hypothesis and may be useful for developing diagnostic biomarkers. In addition, we assessed the concentration of astroglial protein S100 beta, which is known to indicate glial injury and related blood-brain-barrier dysfunction (18;19).

MATERIAL AND METHODS

Design

The study consisted in a prospective assessment of clinical and brain MR characteristics of a group of patients with cirrhosis that were admitted to the hospital because of an episode of overt HE (n=19). The patients were clinically stable, without manifestations of neurological impairment before the episode of HE (within 5 days before admission). The MR study was performed during the first 5 days of admission (one patient did not tolerate MR and was excluded from the study). All patients underwent daily biochemical analysis, clinical evaluation and assessment of the grade of HE (twice a day) until MR exam. The study was repeated after six weeks (± 1 week) in 14 patients (2 patients died, and 2 patients rejected the second MR) of who 2 exhibited HE grade 1 in the follow-up. The Ethics Committee of Hospital Universitari Vall d'Hebron approved the study and an informed consent was obtained from participants (first by next of kin and later confirmed by the patient).

Patient characteristics

The study included eighteen patients that showed at admission signs of overt HE (grade II [n=6], grade III [n=10] and grade IV [n=2]). All of them exhibited typical clinical and biochemical parameters of cirrhosis (table 1). They were treated according to a standard protocol that included the correction of precipitating factors, the administration of intravenous solutions and

initiation of oral intake when possible. The precipitant factors corresponded to infection (n=5), hyponatremia (serum sodium < 130 mEq/L, n=6) and diuretic-induced dehydration (n=9). All the patients received lactulose (through rectal, nasogastric or oral route) and rifaximin 600 mg bid (nasogastric or oral route). Many of them showed an improvement of HE during the first days of admission. For this reason, the grades of HE were lower at the time of MR exam: 7 patients recovered consciousness and did not show HE, 8 patients exhibited low-grade HE (grade I-II) and 3 patients high-grade HE (grade III-IV). Eight healthy voluntaries (4 male, 4 female), age-matched (57±8 years) with patients were evaluated as control group.

S100 beta

The serum S100 beta protein levels were measured using an electrochemiluminescence immunoassay (ECLIA) intended for use on Elecsys immunoassay system (Roche Diagnostics, Switzerland). This test lasts around 18 minutes and requires a minimum sample of serum of 20µL. The results of the concentration of S100 beta are given in micrograms per litre (µg/L). The immunoassay is unaffected by icterus (bilirubin < 25mg/dL) and hemolysis (hemoglobin < 1g/dL). The eighteen patients had bilirubin levels below the limits of interference; however, two of them were hemolytic samples and were not considered for analysis of S100 beta.

MR protocol

MR data were acquired using a 3.0Tesla scanner (MAGNETOM Trio, Siemens, Erlangen, Germany) equipped with a 32 channel circular polarized receiver head array coil.

The following conventional MR sequences were obtained in each subject: 1) Transverse proton density and T2-weighted fast spin-echo (repetition time [TR] /echo time [TE]/echo train length/acquisitions/ turbo factor [TF] 2900 ms /19 -87 ms/16/2/6) and 2) T2 fast-FLAIR (TR /TE /inversion time [TI] / echo train length/acquisitions/TF 9000 ms/93 ms/2500 ms/12 /1/16). For both sequences, 46 interleaved contiguous axial sections were acquired with a 3-mm section thickness covering the whole brain, 256 x 256 matrix, and 250 x 250 mm field of view, giving an in-plane spatial resolution of approximately 1 x 1 mm.

Diffusion-weighted imaging (DWI) imaging was obtained in the axial and coronal planes with four b values of 0, 500, 1000 and 2000 s/mm² along all three orthogonal axes; with 5 mm slice thickness, 1.5 mm intersection gap, 230-250 mm field of view and 128x128 matrix, covering the whole brain. To minimize the effects of diffusion anisotropy, DW data were automatically processed to yield standard isotropic DWI imaging. From all the DWI sequences, we calculated the apparent diffusion coefficient (ADC) maps.

DWI was acquired in the transverse plane using a single-shot echo-planar sequence (TR/TE/acquisitions 4000ms/93ms/6) with gradients applied in all three orthogonal axes and with four b-values (range 0-3000s/mm²). Images were obtained with a slice thickness of 4mm, an interslice gap of 2mm, a field of view of 250mm, and an acquisition matrix of 128x128, covering the whole brain (28 slices). To minimize the effects of diffusion anisotropy, DWI data were automatically processed to yield standard isotropic DWI. From all the DWI

sequences the ADC maps were calculated using NUMARIS4 software syngo version B15 (Siemens, Erlangen, Germany).

Proton MR spectroscopy (1H-MRS) was performed from a volume of interest localized at the parietal-occipital region (with higher predominance of white matter) and defined by a cube of 20mm side containing mainly white matter. A 90°-180°-180° spin-echo-based pulse sequence was used (TR /TE /acquisitions 3000ms /30ms /80). For water suppression, a chemical shift selective Gaussian pulse was applied. A total of 1024 data points were collected over a bandwidth of 1200Hz.

MR analysis

All proton-density/T2 fast spin-echo and fast T2-FLAIR images obtained at baseline and follow-up scans were used to identify focal lesions on hemispheric white matter. All lesions with at least 3mm in diameter were manually marked on fast-FLAIR MR hard copies. Then, lesions were outlined on the computer image to compute the lesion volume using the Jim image analysis package (version 5.0, Xinapse Systems Ltd, Northants, UK, www.xinapse.com).

ADC values (in $\mu\text{m}^2/\text{s}$) were calculated from the ADC maps in two regions (parietal subcortical white matter and corticospinal tract) identified in six consecutive slices, along the white matter in or around the corticospinal tract in each hemisphere, following a line that connected the subcortical precentral white matter and the posterior limb of the internal capsule (20).

Spectra were analyzed using LCModel software v6.2-4A (Stephen Provencher Inc, Oakville, ON, Canada) to quantify automatically the

metabolites (ratios compared to creatine [Cr]) (21). Glutamine, glutamate, compounds of NAA (N-acetylaspartate and N-acetylaspartyl-glutamate), choline derivatives (glycerophosphorylcholine and phosphorylcholine) and myo-inositol were analyzed by fitting a linear combination of a basis set of metabolite model spectra to the data (LCModel). The basis set was simulated using the GAMMA library.

Statistical analysis

The statistical analysis was performed with Sigma Stat package (SPSS Inc, Chicago, USA). Values are expressed as the mean \pm standard deviation. Significant differences between intergroup data were verified with the Student's t-test, Mann-Whitney U test or ANOVA. ANOVA test were followed by all pairwise multiple comparison procedures (Holm-Sidak method or Dunn's Method). The comparisons between baseline and follow-up variables were carried out with the paired Student's t-test or Wilcoxon W test. The correlations between parameters were performed with Pearson or Spearman's correlation. P-values <0.050 were considered statistically significant.

RESULTS

The metabolic profiles obtained on 1H-MRS were abnormal in patients with cirrhosis compared to controls: a) glutamine was higher (Gln/Cr: 2.40 ± 0.78 vs 0.22 ± 0.08 , $P < 0.001$) and b) myo-inositol and choline derivatives were lower (Ins/Cr: 0.14 ± 0.07 vs 0.66 ± 0.07 , $P < 0.001$; Cho/Cr: 0.20 ± 0.04 vs 0.26 ± 0.03 , $P = 0.002$). However, glutamate and N-acetylaspartate were not significantly different (Glu/Cr: 1.10 ± 0.20 vs 1.06 ± 0.08 , $P = 0.157$ and NAA/Cr: 1.77 ± 0.02 vs 1.64 ± 0.08 , $P = 0.92$). The peak of glutamine

increased significantly in relation to the severity of HE at the day of the MR exam ($P=0.038$), while the peak of choline derivatives exhibited a decrease ($P=0.048$) (figure 1). There was a positive correlation between glutamine/creatine ratio and HE grade ($r=0.608$, $P=0.007$) (figure 2). During the follow-up the peak of glutamine decreased $\sim 36\%$ in those patients that recovered from the episode of HE (from 2.42 ± 0.65 to 1.55 ± 0.55 , $P=0.028$). In contrast, glutamine remained stable in those patients that were admitted to the hospital showing HE, but exhibited normal mental status at MR assessment (baseline: 2.03 ± 0.65 , six weeks: 1.94 ± 0.66 , $P = 0.663$) (figure 3). Brain glutamine correlated to blood ammonia in the group of 14 patients with baseline and follow-up data ($r=0.526$, $P=0.004$, $n=28$). Myo-inositol increased in the follow-up but there was not any relation with the severity of HE. Other metabolites (glutamate, choline and N-acetylaspartate) remained stable.

DWI showed that ADC values were higher in the corticospinal tract ($804\pm 66 \mu\text{m}^2/\text{s}$ vs $707\pm 29 \mu\text{m}^2/\text{s}$; $P < 0.001$) and in the parietal white matter ($895\pm 67 \mu\text{m}^2/\text{s}$ vs: $798\pm 57 \mu\text{m}^2/\text{s}$; $P = 0.005$) of patients with cirrhosis than in controls. The increase in ADC values tended to be higher in relation to the severity of HE (figure 4), reaching statistical significance in the corticospinal tract ($P = 0.006$). In the follow-up, ADC values (in the twelve patients who recovered from the HE episode) exhibited a significant decrease in the corticospinal tract (from $780\pm 44 \mu\text{m}^2/\text{s}$ to $758\pm 44 \mu\text{m}^2/\text{s}$, $P=0.025$) and in the parietal white matter (from $884\pm 54 \mu\text{m}^2/\text{s}$ to $842\pm 38 \mu\text{m}^2/\text{s}$, $P=0.016$) (figure 5). The ADC values in the follow-up did not differ from controls in parietal white matter, but

persisted slightly elevated in the corticospinal tract.

Fifteen patients exhibited T2 focal lesions in the hemispheric white matter, of whom nine were reevaluated after HE resolution. The lesion volume diminished after the episode of HE ($P=0.039$) (figure 6). The comparison between precipitating factors and MR parameters at baseline showed that ADC values in parietal white matter were higher in dehydration (no-dehydrated= $861\pm 44 \mu\text{m}^2/\text{s}$ vs dehydrated= $928\pm 70 \mu\text{m}^2/\text{s}$; $P=0.027$). In addition, myo-inositol/creatine ratio was lower in patients with hyponatremia (0.092 ± 0.05 vs 0.16 ± 0.07 ; $P=0.031$)

The concentration of serum S100 beta correlated at baseline with the grade of HE ($r=0.584$, $P=0.018$, $n=16$) (figure 7), but was not associated with other clinical or MR variables.

DISCUSSION

The study shows abnormalities in the amount of several brain metabolites and in the distribution of water in brain compartments in episodic HE. Some of these MR abnormalities appear to be of pathogenic relevance and may be useful for the diagnosis of HE. Baseline glutamine was higher in relation to the severity of HE and during follow-up decreased in those that exhibited an improvement of HE. In contrast, glutamine remained stable in those that did not change the grade of HE. These data are the first clinical evidence in support of a pathogenic role of glutamine in HE, because they were obtained by a direct assessment, instead of using Glx, and established an association between the severity of clinical manifestations and the degree of glutamine increase.

Glutamine was classically considered an inert amino acid, but has been proposed to be toxic to the astrocyte through acting as a carrier of ammonia to the interior of the mitochondria (17). Alternatively, it may be simply an indicator of the exposure of the brain to ammonia, which may be the key factor in the development of HE. A recent study in an *in vitro*-neuronal network model supports direct alterations in neuronal activity caused by ammonia (22). Previous studies have found an increase in the peak of Glx (23) or glutamine (24) in overt HE. However, a recent study that included 9 patients that underwent repeated MR assessment at five days did not find an association between the severity of HE and Glx (15). Irrespective of its role in the pathogenesis of HE, the assessment of glutamine by MR-spectroscopy could be a useful biomarker in the diagnosis of difficult cases. Cirrhotic patients may develop non-hepatic encephalopathy secondary to small vessel cerebrovascular disease or Alzheimer's disease; MR-spectroscopy can help in the diagnosis of these cases. In our study, the evolution of HE was closely related to the evolution of brain glutamine. For this reason, alternative diagnosis to HE should be suspected in those cases that show discrepancies between the evolution of brain glutamine and neurological manifestations.

The most important mechanism by which brain glutamine has been proposed to originate HE is by inducing astrocyte swelling and impairing its function (25). The observation of a decrease in ADC in patients with acute liver failure supports this interpretation. However, MR studies in patients with cirrhosis have consistently found signs of increased extracellular water, instead of

intracellular (10;26). Furthermore, it has been shown that an acute oral ammonia load in cirrhotic patients induces a rise in the ADC (27). These findings are contrary to the hypothesis that the severity of HE is directly caused by astrocyte swelling.

Our data show the lack of relationship between neurological manifestations and the distribution of water between the intracellular and extracellular compartment. We found an increase in the ADC that represents an expansion of the extracellular compartment that returned to normal in the follow-up in parietal white matter. Similarly to a previous study that assessed ADC in the corticospinal tract before and after liver transplant, ADC did not completely normalize in this region after recovery of HE (28), which can be explained by persisting neurological damage (mild hepatic myelopathy) (29).

ADC was higher in patients with signs of body dehydration. This finding may be explained by the inhibition of water transport across cellular membranes caused by diuretics (30). Interestingly, diuretics are a frequent factor associated to episodic HE, to which no mechanistic explanation has been found. The correlation between myo-inositol and hyponatremia seen in our and other studies (31) is an additional sign of the disturbance of brain water distribution. However, we could not relate ADC values nor myo-inositol to the severity of HE, suggesting that HE cannot simply be attributed to brain edema, as has been shown in experimental models (32).

Our findings are not contrary to the participation of the astrocyte in the pathogenesis of HE. One

possible explanation to reconcile our data with signs of glial injury seen in HE is the participation of the astrocyte in the blood-brain-barrier. White matter lesions in T2-weighted images compatible with small-vessel cerebrovascular disease were observed in an important proportion of our patients (33). Recent studies have shown that these lesions are probably indicative of higher permeability of the blood-brain-barrier (34;35). It is plausible that during HE, ammonia or glutamine cause an impairment of the astrocyte function, as supported by the association between the severity of HE and an increase in serum S100 beta. Astrocyte dysfunction could have two effects that are not directly related: vasogenic brain edema and neuronal dysfunction. Reversion of astrocyte dysfunction during follow-

up will lower brain edema and explain the decrease in the volume of white matter lesions (20;36) and normalization of ADC (25), but some sequels in neuronal function may persist (37).

In conclusion, MR spectroscopy supports a major role of brain glutamine in the pathogenesis of HE. Current clinically available equipments of higher magnetic field (3T) provide better resolution that may be useful in the diagnosis and monitoring of HE. In spite of the major role of the astrocyte, brain edema is mostly extracellular and does not appear to be directly responsible for the development of neurological manifestations. Studies on the pathogenesis of HE should avoid the use of water disturbances as a surrogate of neurological manifestations.

FIGURE 1

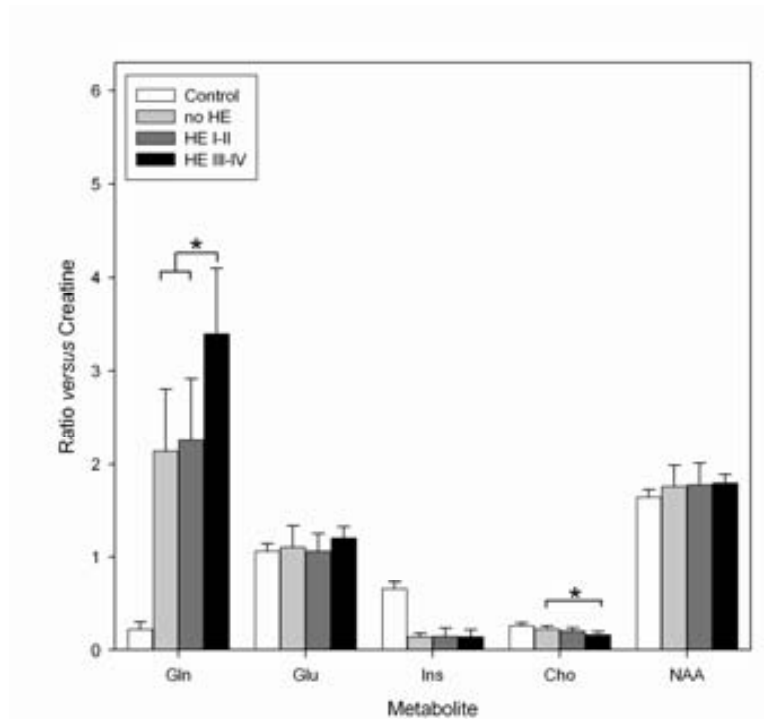


Figure 1: Metabolic alterations between patients with cirrhosis and HE (n=18) and controls subjects (n=8). Metabolites: Gln, glutamine; Glu, glutamate; Ins, myo-inositol; Cho, choline derivatives; and NAA, N-acetylaspartate. * P<0.050

FIGURE 2

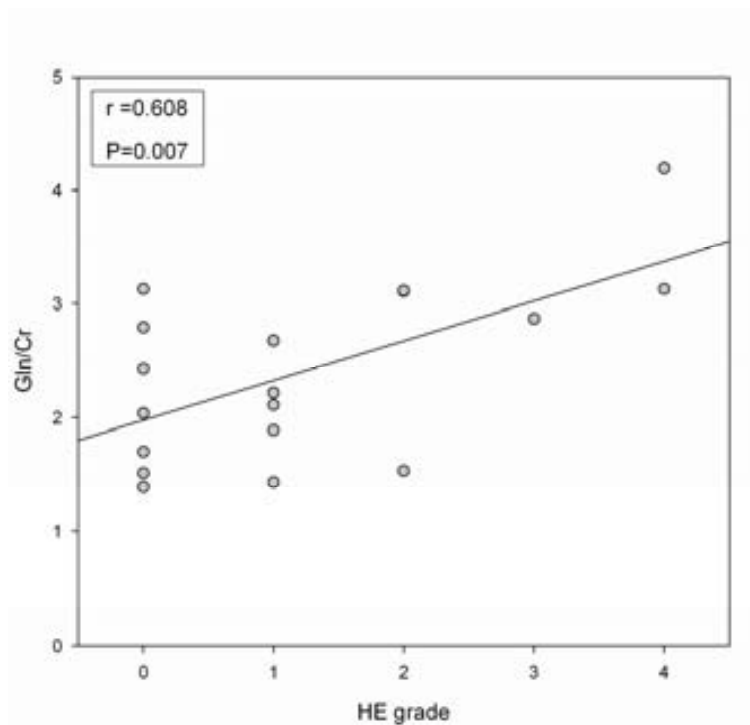


Figure 2: Correlation of baseline brain glutamine/creatinine ratio (Gln/Cr) and the grade of HE determined at the time of the RM exam

FIGURE 3

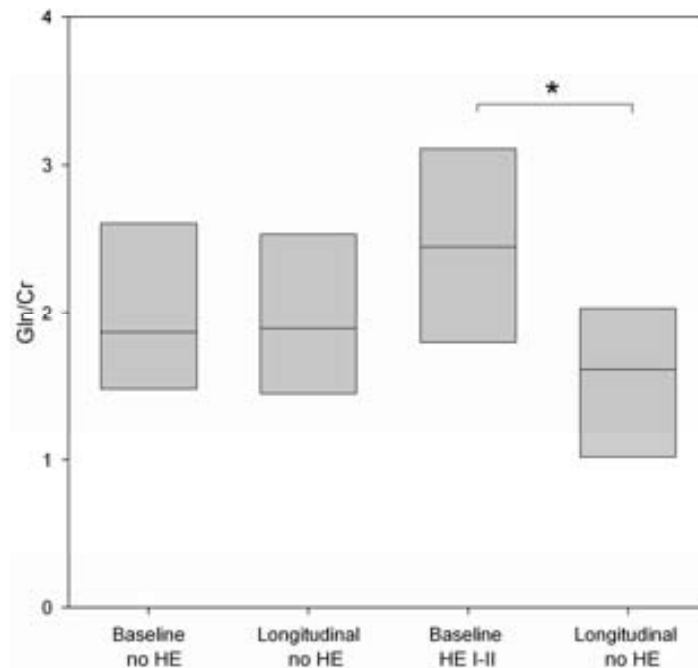


Figure 3: The follow-up of brain glutamine (Gln/Cr) in relation to the severity of HE at baseline. *P<0.050

FIGURE 4

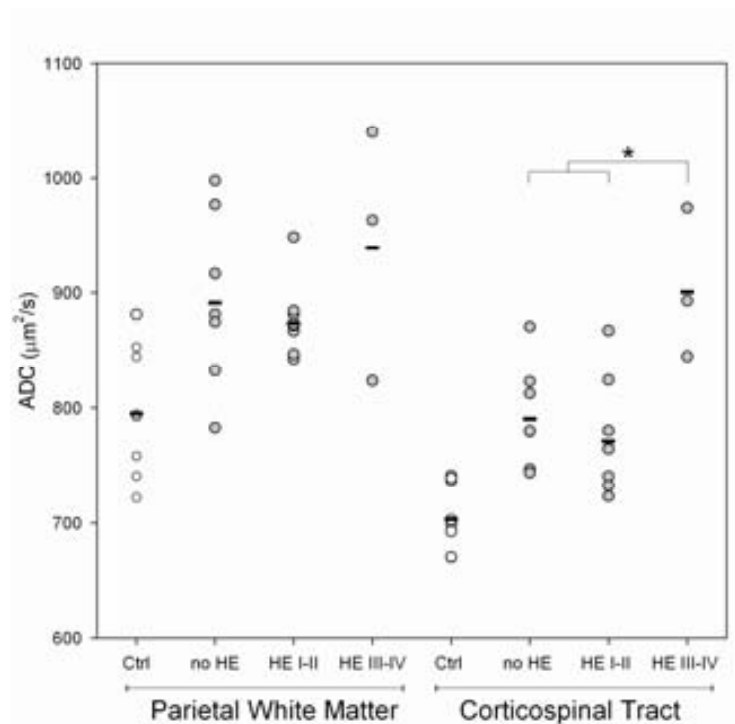


Figure 4: Apparent diffusion coefficient values (ADC, in $\mu\text{m}^2/\text{s}$) of patients with different degrees of HE (in grey, n=18) and controls (in white, n=8) in two different regions. The mean of each group is marked by a dash. *P<0.050

FIGURE 5

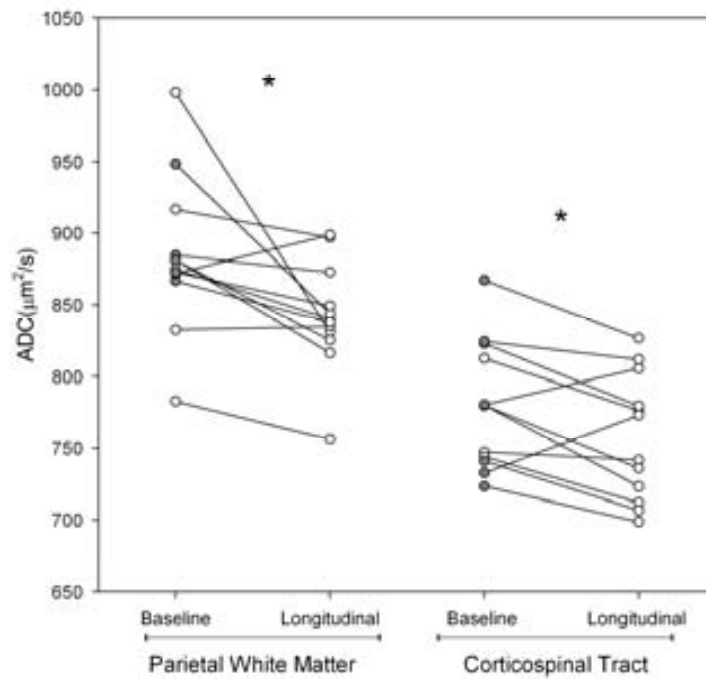


Figure 5: The follow-up of apparent diffusion coefficient values (ADC, in $\mu\text{m}^2/\text{s}$) of patients with cirrhosis (n=12) in two brain regions. At baseline study is differentiated the patients without HE (dots in white) and the patients with low-grade HE (grade I-II, dots in grey). * $P < 0.050$

FIGURE 6

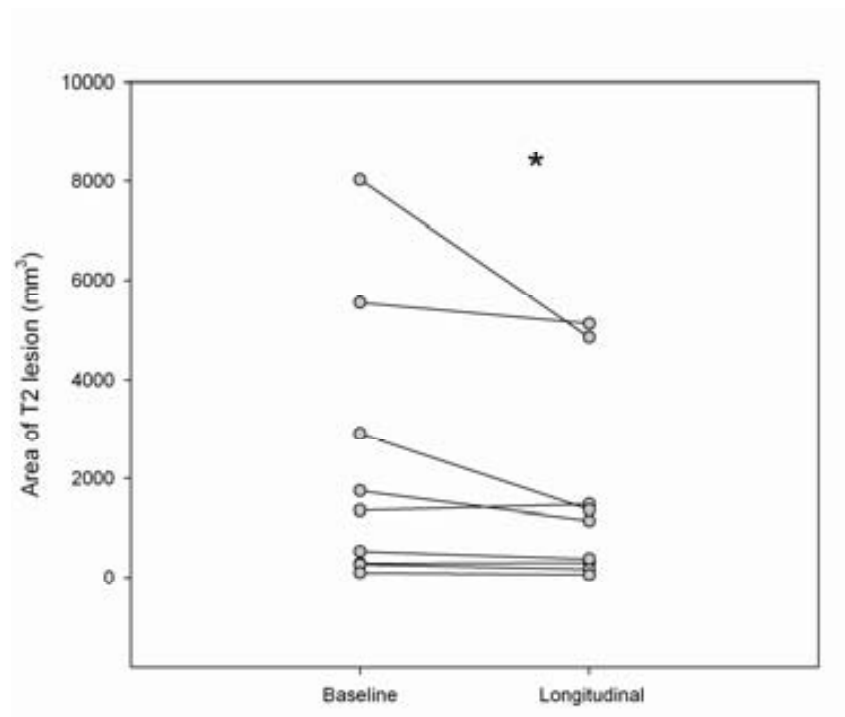


Figure 6: T2 lesions volume of cirrhotic patients with overt HE and the follow-up after the recovery of HE. * $P < 0.050$

FIGURE 7

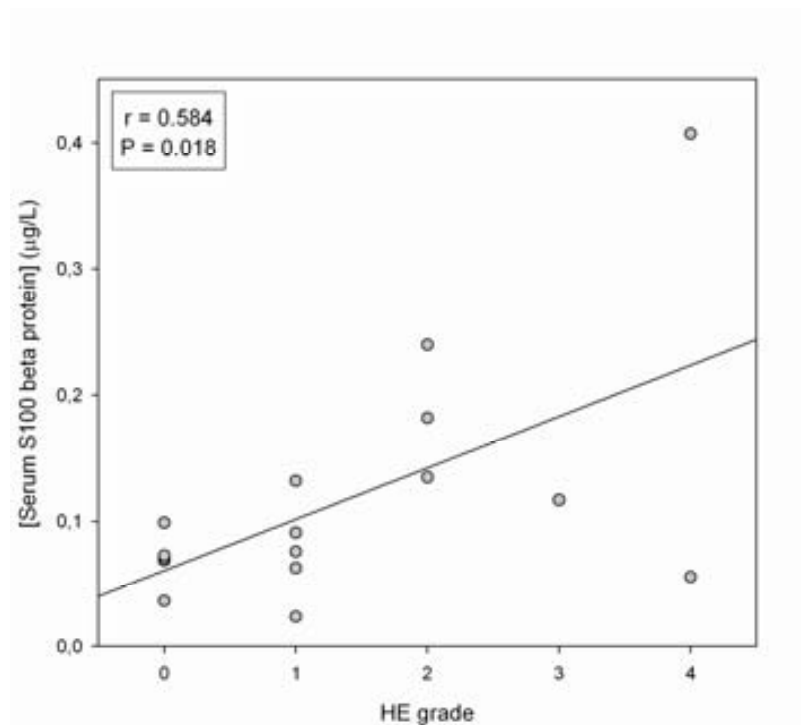


Figure 7: Correlation between the concentration of serum S100 beta protein levels and the grade of HE at the time of the RM exam.

SUPPLEMENTARY MATERIAL: FIGURE 1

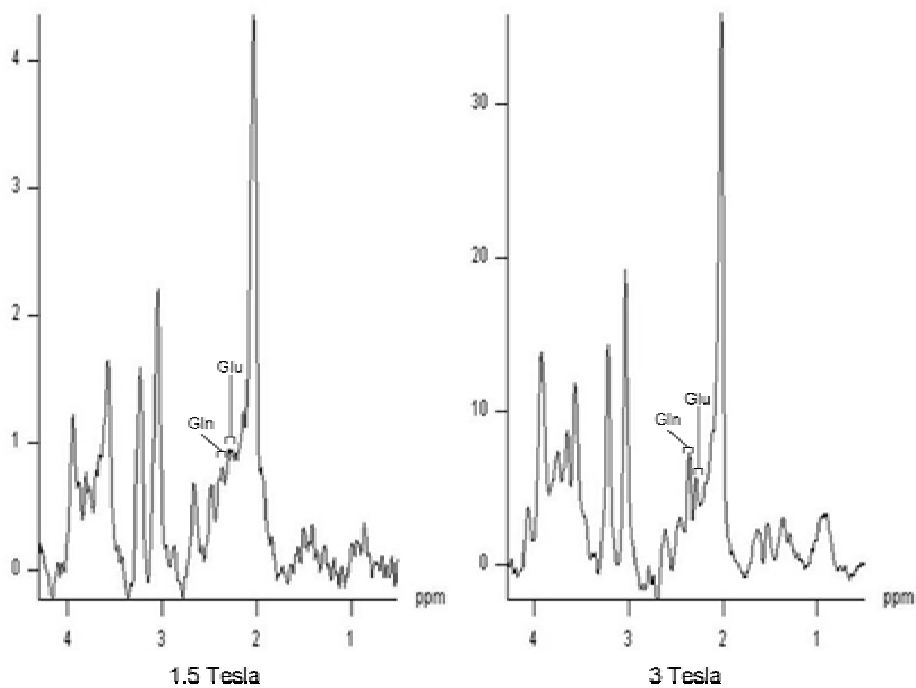


Figure 1: Improvement of the resolution of spectra in the region where are localized glutamine (Gln) and glutamate (Glu) peaks (2.05-3.05 ppm) according to the magnetic field (1.5 or 3 Tesla magnets).

Table 1: Clinical characteristics of cirrhotic patients with acute episode of HE (baseline) and six weeks after the episode of HE (longitudinal). The parameters have been determined within 6 hours of MR study.

Study	Baseline	Longitudinal
Number	18	14
Age (years)	60 ± 10	59 ± 11
Male/female	13/5	10/4
Etiology		
hepatitis C virus	2	1
Alcohol	8	5
hepatitis C virus + alcohol	3	2
Other	5	4
HE grade*		
0	7	12
I	5	2
II	3	0
III	1	0
IV	2	0
Child Pugh A/B/C	1/9/8	1/5/8
Biochemical parameters		
Prothrombin activity (%)	53.2 ± 13.9	64.0 ± 17.2
Sodium (mEq/L)	134.6 ± 6.3	136.3 ± 3.8
Potassium(mEq/L)	4.0 ± 0.6	4.4 ± 0.3
Creatinine (mg/dl)	1.1 ± 0.7	0.9 ± 0.3
Total bilirubin (mg/dl)	2.8 ± 1.0	2.2 ± 1.1
Conjugated bilirubin (mg/dl)	1.1 ± 0.4	0.9 ± 0.5
Albumin (g/dl)	3.3 ± 0.6	3.3 ± 0.4
Aspartate transaminase (UI/L)	58.6 ± 48.8	68.5 ± 59.3
Alanine transaminase (UI/L)	36.9 ± 32.3	47.7 ± 40.2
Alkaline phosphatase (UI/L)	118.8 ± 47.0	144.9 ± 74.1
gamma-Glutamyl transpeptidase (UI/L)	96.0 ± 79.1	110.2 ± 35.8
Plasma ammonia concentration (µM)	105.8 ± 53.5	89.5 ± 47.8

* West-Haven criteria

REFERENCES

- (1) Cordoba J, Minguez B. Hepatic encephalopathy. *Semin Liver Dis* 2008 February;28(1):70-80.
- (2) Rakoski MO, McCammon RJ, Piette JD, Iwashyna TJ, Marrero JA, Lok AS, Langa KM, Volk ML. Burden of cirrhosis on older Americans and their families: Analysis of the health and retirement study. *Hepatology* 2012 January;55(1):184-91.
- (3) Cordoba J, Alonso J, Rovira A, Jacas C, Sanpedro F, Castells L, Vargas V, Margarit C, Kulisevsky J, Esteban R, Guardia J. 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 November;35(5):598-604.
- (4) Tarasow E, Panasiuk A, Siergiejczyk L, Orzechowska-Bobkiewicz A, Lewszuk A, Walecki J, Prokopowicz D. MR and 1H MR spectroscopy of the brain in patients with liver cirrhosis and early stages of hepatic encephalopathy. *Hepatogastroenterology* 2003 November;50(54):2149-53.
- (5) Verma A, Saraswat VA, Radha KY, Nath K, Thomas MA, Gupta RK. In vivo 1H magnetic resonance spectroscopy-derived metabolite variations between acute-on-chronic liver failure and acute liver failure. *Liver Int* 2008 September;28(8):1095-103.
- (6) Norenberg MD. Astroglial dysfunction in hepatic encephalopathy. *Metab Brain Dis* 1998 December;13(4):319-35.
- (7) Palomero-Gallagher N, Bidmon HJ, Cremer M, Schleicher A, Kircheis G, Reifenberger G, Kostopoulos G, Haussinger D, Zilles K. Neurotransmitter receptor imbalances in motor cortex and basal ganglia in hepatic encephalopathy. *Cell Physiol Biochem* 2009;24(3-4):291-306.
- (8) Shah NJ, Neeb H, Kircheis G, Engels P, Haussinger D, Zilles K. Quantitative cerebral water content mapping in hepatic encephalopathy. *Neuroimage* 2008 July 1;41(3):706-17.
- (9) Miese FR, Wittsack HJ, Kircheis G, Holstein A, Mathys C, Modder U, Cohnen M. Voxel-based analyses of magnetization transfer imaging of the brain in hepatic encephalopathy. *World J Gastroenterol* 2009 November 7;15(41):5157-64.
- (10) Lodi R, Tonon C, Stracciari A, Weiger M, Camaggi V, Iotti S, Donati G, Guarino M, Bolondi L, Barbiroli B. Diffusion MRI shows increased water apparent diffusion coefficient in the brains of cirrhotics. *Neurology* 2004 March 9;62(5):762-6.
- (11) Chavarria L, Oria M, Romero-Gimenez J, Alonso J, Lope-Piedrafita S, Cordoba J. Diffusion tensor imaging supports the cytotoxic origin of brain edema in a rat model of acute liver failure. *Gastroenterology* 2010 April;138(4):1566-73.
- (12) Cauli O, Lopez-Larrubia P, Rodrigo R, Agusti A, Boix J, Nieto-Charques L, Cerdan S, Felipe V. Brain region-selective mechanisms contribute to the progression of cerebral alterations in acute liver failure in rats. *Gastroenterology* 2011 February;140(2):638-45.
- (13) Saksena S, Rai V, Saraswat VA, Rathore RS, Purwar A, Kumar M, Thomas MA, Gupta RK. Cerebral diffusion tensor imaging and in vivo proton magnetic resonance spectroscopy in patients with fulminant hepatic failure. *J Gastroenterol Hepatol* 2008 July;23(7 Pt 2):e111-e119.
- (14) Nath K, Saraswat VA, Krishna YR, Thomas MA, Rathore RK, Pandey CM, Gupta RK. Quantification of cerebral edema on diffusion tensor imaging in acute-on-chronic liver failure. *NMR Biomed* 2008 August;21(7):713-22.
- (15) Poveda MJ, Bernabeu A, Concepcion L, Roa E, de ME, Zapater P, Perez-Mateo M, Jover R. Brain edema dynamics in patients with overt hepatic

- encephalopathy A magnetic resonance imaging study. *Neuroimage* 2010 August 15;52(2):481-7.
- (16) Sawara K, Kato A, Yoshioka Y, Suzuki K. Brain glutamine and glutamate levels in patients with liver cirrhosis: assessed by 3.0-T MRS. *Hepatology* 2004 September;30(1):18-23.
- (17) Albrecht J, Norenberg MD. Glutamine: a Trojan horse in ammonia neurotoxicity. *Hepatology* 2006 October;44(4):788-94.
- (18) Kanner AA, Marchi N, Fazio V, Mayberg MR, Koltz MT, Siomin V, Stevens GH, Masaryk T, Aumayr B, Vogelbaum MA, Barnett GH, Janigro D. Serum S100beta: a noninvasive marker of blood-brain barrier function and brain lesions. *Cancer* 2003 June 1;97(11):2806-13.
- (19) Kapural M, Krizanac-Bengez L, Barnett G, Perl J, Masaryk T, Apollo D, Rasmussen P, Mayberg MR, Janigro D. Serum S-100beta as a possible marker of blood-brain barrier disruption. *Brain Res* 2002 June 14;940(1-2):102-4.
- (20) Rovira A, Cordoba J, Sanpedro F, Grive E, Rovira-Gols A, Alonso J. Normalization of T2 signal abnormalities in hemispheric white matter with liver transplant. *Neurology* 2002 August 13;59(3):335-41.
- (21) Provencher SW. Estimation of metabolite concentrations from localized in vivo proton NMR spectra. *Magn Reson Med* 1993 December;30(6):672-9.
- (22) Schwarz CS, Ferrea S, Quasthoff K, Walter J, Gorg B, Haussinger D, Schnitzler A, Hartung HP, Dihne M. Ammonium chloride influences in vitro-neuronal network activity. *Exp Neurol* 2012 March 7.
- (23) Ross BD, Jacobson S, Villamil F, Korula J, Kreis R, Ernst T, Shonk T, Moats RA. Subclinical hepatic encephalopathy: proton MR spectroscopic abnormalities. *Radiology* 1994 November;193(2):457-63.
- (24) Laubenberger J, Haussinger D, Bayer S, Gufler H, Hennig J, Langer M. Proton magnetic resonance spectroscopy of the brain in symptomatic and asymptomatic patients with liver cirrhosis. *Gastroenterology* 1997 May;112(5):1610-6.
- (25) 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 June;32(6):1035-8.
- (26) Kale RA, Gupta RK, Saraswat VA, Hasan KM, Trivedi R, Mishra AM, Ranjan P, Pandey CM, Narayana PA. Demonstration of interstitial cerebral edema with diffusion tensor MR imaging in type C hepatic encephalopathy. *Hepatology* 2006 April;43(4):698-706.
- (27) Mardini H, Smith FE, Record CO, Blamire AM. Magnetic resonance quantification of water and metabolites in the brain of cirrhotics following induced hyperammonaemia. *J Hepatol* 2011 June;54(6):1154-60.
- (28) Chavarria L, Alonso J, Garcia-Martinez R, Aymerich FX, Huerga E, Jacas C, Vargas V, Cordoba J, Rovira A. Biexponential analysis of diffusion-tensor imaging of the brain in patients with cirrhosis before and after liver transplantation. *AJNR Am J Neuroradiol* 2011 September;32(8):1510-7.
- (29) Weissenborn K, Tietge UJ, Bokemeyer M, Mohammadi B, Bode U, Manns MP, Caselitz M. Liver transplantation improves hepatic myelopathy: evidence by three cases. *Gastroenterology* 2003 February;124(2):346-51.
- (30) Jayakumar AR, Valdes V, Norenberg MD. The Na-K-Cl cotransporter in the brain edema of acute liver failure. *J Hepatol* 2011 February;54(2):272-8.
- (31) Guevara M, Baccaro ME, Torre A, Gomez-Anson B, Rios J, Torres F, Rami L, Monte-Rubio GC, Martin-Llahi M, Arroyo V, Gines P. Hyponatremia is a risk factor of hepatic encephalopathy in patients with cirrhosis: a prospective study with time-dependent analysis. *Am J Gastroenterol* 2009 June;104(6):1382-9.
- (32) Oria M, Chatauret N, Chavarria L, Romero-Gimenez J, Palenzuela L,

- Pardo-Yules B, Arranz JA, Bodega G, Raguer N, Cordoba J. Motor-evoked potentials in awake rats are a valid method of assessing hepatic encephalopathy and of studying its pathogenesis. *Hepatology* 2010 December;52(6):2077-85.
- (33) Minguez B, Rovira A, Alonso J, Cordoba J. Decrease in the volume of white matter lesions with improvement of hepatic encephalopathy. *AJNR Am J Neuroradiol* 2007 September;28(8):1499-500.
- (34) Fernandez-Cadenas I, Mendioroz M, Domingues-Montanari S, Del Rio-Espinola A, Delgado P, Ruiz A, Hernandez-Guillamon M, Giralt D, Chacon P, Navarro-Sobrino M, Ribo M, Molina CA, varez-Sabin J, Rosell A, Montaner J. Leukoaraiosis is associated with genes regulating blood-brain barrier homeostasis in ischaemic stroke patients. *Eur J Neurol* 2011 June;18(6):826-35.
- (35) Topakian R, Barrick TR, Howe FA, Markus HS. Blood-brain barrier permeability is increased in normal-appearing white matter in patients with lacunar stroke and leucoaraiosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2010 February;81(2):192-7.
- (36) Rovira A, Minguez B, Aymerich FX, Jacas C, Huerga E, Cordoba J, Alonso J. Decreased white matter lesion volume and improved cognitive function after liver transplantation. *Hepatology* 2007 November;46(5):1485-90.
- (37) Bajaj JS, Schubert CM, Heuman DM, Wade JB, Gibson DP, Topaz A, Saeian K, Hafeezullah M, Bell DE, Sterling RK, Stravitz RT, Luketic V, White MB, Sanyal AJ. Persistence of cognitive impairment after resolution of overt hepatic encephalopathy. *Gastroenterology* 2010 June;138(7):2332-40.

ESTUDI 4

8. ESTUDI 4

Estudi de l'edema cerebral en un model animal d'insuficiència hepàtica crònica secundària a la lligadura del conducte biliar.

8.1. Introducció

L'edema cerebral està present en els pacients amb cirrosi i la RM és utilitzada per avaluar aquest edema. Existeix un estudi de RM realitzat en un model experimental d'insuficiència hepàtica crònica induït amb toxines però en el que no s'observa els mateixos resultats obtinguts en els estudis clínics. Una possible limitació d'aquest estudi podria ser l'ús de toxines per generar el model experimental ja que aquestes toxines podrien alterar la integritat de la barrera hematoencefàlica.

8.2. Objectius

Estudiar l'edema cerebral en un model experimental d'insuficiència hepàtica crònica. Per tal d'evitar qualsevol interacció entre la barrera hematoencefàlica i les toxines, el model experimental elegit en aquest estudi és quirúrgic. També s'avaluaran les alteracions implicades en el metabolisme cerebral.

8.3. Materials i mètodes

Es va realitzar un estudi de RM per mesurar les alteracions de la mobilitat de l'aigua cerebral produïdes per la insuficiència hepàtica crònica. Aquest estudi es va realitzar en rates amb cirrosi secundària a la lligadura del conducte biliar.

Els experiments es van realitzar en 6 rates controls i en 8 rates cirròtiques a les 4, 5 i 6 setmanes de la lligadura del conducte biliar. A més, a la sisena setmana es va tornar a realitzar l'experiment de RM al cap de 3 hores d'haver inoculat lipopolisacàrids. L'injecció de lipopolisacàrids es va realitzar per tal de generar una descompensació aguda de la cirrosi.

També es va quantificar el contingut d'aigua cerebral per gravimetria en rates controls i rates a les 6 setmanes de la lligadura del conducte biliar; sense o amb inoculació de lipopolisacàrids (n=7 per cada grup).

8.4. Resultats

En l'espectroscòpia de RM es va observar un augment de la glutamina i una disminució de myo-inositol de les rates BDL a mesura que progressava la insuficiència hepàtica. La quantitat d'aigua cerebral en aquestes rates augmentava en el còrtex frontal i hi havia diferències significatives després de la inoculació de lipopolisacàrids. Però aquests canvis d'aigua no modificaven el coeficient de difusió aparent. Aquest resultat dona suport a la existència d'un edema mixte (vasogènic i citotòxic) en la insuficiència hepàtica crònica descompensada.

8.5. Article original

Chavarria L, Oria M, Romero-Giménez J, Alonso J, Lope-Piedrafita S, Cordoba J. **Magnetic resonance study in an experimental model of cirrhosis.** [Enviat per a publicació]

Title: Magnetic resonance supports a mixed origin of brain edema in experimental acute-on-chronic liver failure.

Authors:

Laia Chavarria^{1,2,3}, Marc Oria^{1,2,3}, Jordi Romero-Giménez¹, Juli Alonso^{2,4}, Silvia Lope-Piedrafita⁵, Juan Córdoba^{1,2,3}

Affiliations:

1. Liver Unit, Hospital Vall Hebron, Barcelona, Spain
2. Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBEREHD), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain
3. Departament Medicina. Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Spain.
4. Magnetic Resonance Unit, Hospital Vall Hebron, Barcelona, Spain.
5. SeRMN, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Spain.

E-mail addresses:

Laia Chavarria: ichavarria@ir.vhebron.net

Marc Oria: moria@ir.vhebron.net

Jordi Romero-Giménez: joromero@ir.vhebron.net

Juli Alonso: julialonso@idi-cat.org

Silvia Lope-Piedrafita. silvialope@uab.es

Juan Córdoba: jcordoba@vhebron.net

Financial Support:

This project was supported by grant from Instituto de Salud Carlos III (FIS PI08/0698). CIBEREHD is supported by Instituto de Salud Carlos III.

Disclosures

Nothing to disclose

Keyword:

Cirrhosis, bile duct ligation, diffusion imaging, proton spectroscopy, gravimetry

List of Abbreviations:

ADC: apparent diffusion coefficient

BDL: bile-duct ligation

LPS : lipopolysaccharide

TR: repetition time

TE: echo time

Ins: myo-inositol

Gln: glutamine

Glu: glutamate

NAA: N-acetylaspartate

Cr: creatine

Corresponding author:

Juan Córdoba

Hospital Universitari Vall d'Hebron

Passeig Vall d'Hebron 119-129

08035 Barcelona, Spain

Email: jcordoba@vhebron.net

Tel: +34 932476140

Fax: +34 932476068

ABSTRACT

Background & Aim: Brain edema is a complication of liver failure that can be reproduced in experimental models. In acute liver failure, the participation of cytotoxic mechanisms have been shown experimentally and clinically. In chronic liver failure, magnetic resonance (MR) studies suggest an important role for vasogenic mechanisms. The aim of the study was to investigate the MR characteristics of the brain in a rat model of acute-on-chronic liver failure.

Methods: Rats with bile duct ligation were studied at 4, 5 and 6 weeks and after superimposed administration of lipopolysaccharide. MR techniques were applied in vivo to assess brain metabolites and the intra or extracellular distribution of water. The brain water content was assessed by gravimetry.

Results: MR-spectroscopy showed an increase in brain glutamine and a decrease in myoinositol and choline in relation to the progression of liver disease. BDL rats showed a progressive and slight increase in the amount of cortical brain water that resulted significant after inoculation of LPS. These changes did not modify the apparent diffusion coefficient, supporting the mixed (vasogenic and cytotoxic) origin of brain edema in acute-on-chronic liver failure.

Conclusions: The mechanisms of brain edema development associated to acute-on-chronic liver failure relate to the temporal course of liver failure and to coexistent pro-inflammatory stimuli. MR supports the presence of cytotoxic and vasogenic mechanisms in the induction of brain edema in BDL rats exposed to LPS.

INTRODUCTION

Several disturbances of the brain have been described in liver failure. The two more prominent features are a decrease in the level of consciousness, which is referred to as hepatic encephalopathy, and an increase in the amount of brain water that can result in intracranial hypertension and death. Brain edema is well described in acute liver failure, clinically and experimentally (1) and is considered the consequence of acute hyperammonemia. Chronic liver failure and acute-on-chronic liver failure are by far much more common than acute liver failure and are also associated with hyperammonemia and neurological complications. However, the role of brain edema in these situations is controversial. Intracranial hypertension is seldom seen in cirrhosis and is restricted to severe HE (2). Recent data obtained in patients with cirrhosis and mild HE

using a sensitive method (quantitative water mapping) has demonstrated a slight increase of brain water in grey matter (3). These data suggest that brain edema is present in the whole spectrum of liver failure. The differences in the degree of edema between acute and chronic situations are probably explained by the severity of the acute insult and the chronic activation of compensatory mechanisms.

Edema has been attributed to the effects of a sudden rise in the concentration of glutamine in the astrocytes, via the metabolism of ammonia to glutamine. The increase in glutamine can cause a rise in intracellular osmolality or induce mitochondrial toxicity through the activation of the transition pore (4). The osmotic disturbances may be compensated to a certain extent by the release of organic osmolytes. However, once compensatory mechanisms are exhausted the

astrocyte swells, an effect that has been proposed to explain neuronal dysfunction and encephalopathy (5).

Magnetic resonance (MR) of the brain has been applied to experimental models of acute liver failure with the goal of understanding the pathogenesis of brain edema. In an ischemic model secondary to hepatic artery ligation, brain edema related to a decrease in the apparent diffusion coefficient (ADC), which is consistent with a cytotoxic mechanism. However, in galactosamine-induced acute liver failure, MR found signs of mixed (vasogenic and cytotoxic) brain edema that were related to the time since the induction of liver failure. A relationship between ADC and the time-course of liver injury has also been found when comparing different clinical situations (1).

The aim of the study was to investigate the mechanisms involved in brain edema in a model of acute-on-chronic liver failure in BDL rats with superimposed inflammation induced by lipopolysaccharide (LPS). We applied diffusion-weighted imaging to measure water motion in the brain, MR-spectroscopy to assess several metabolites and performed absolute water quantification by gravimetry.

MATERIALS & METHODS

Animal model

This study was performed in 200-250g Sprague-Dawley male rats (Harlan, Udine, Italy). Animals were housed in polycarbonate cages under standard laboratory conditions: a 12/12 hours light/dark cycle, a constant temperature of 22 ± 2 degrees Celsius and a relative humidity about 50%. Standard food (A04, Panlab, Barcelona, Spain) and water were available *ad libitum*. All

procedures were performed in accordance to Spanish legislation and approved by the Animal Research Committee in the facilities of *Institut de Recerca, Hospital Universitari Vall d'Hebron*. Rats underwent BDL under anesthesia (isoflurane). Briefly, bile duct was isolated from adjacent fat tissue and two ligations were implemented to interrupt the bile duct. Formalin solution was injected into the bile duct through a 30G needle, to preserve it and avoid the retention of bilis. These animals developed cirrhosis and ascites within 4-6 weeks of BDL. Rats received an intramuscular dose of vitamin K (0.1mL/kg) (Roche, Basel, Switzerland) at the end of surgery. Sham-operated rats underwent the same intervention without bile duct ligation. After the performance of MR, those rats that achieved week 6, received a dose of LPS (1mg/kg i.p.) of *Klebsiella Pneumoniae* (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) and underwent a second MR assessment 3 hours after the injection of LPS.

Experimental Design

The experimental design consisted in two experiments: a) magnetic resonance study and b) brain water assessment by gravimetry.

The magnetic resonance study was performed on BDL rats (n=8) and sham-operated controls (n=6) repeatedly at 4, 5 and 6 weeks after surgery and 3 hours after LPS administration. Although, all BDL rats achieved week 4, the posterior mortality was high: 70% achieved week 5 and 35% achieved week 6. Only the results at week 4 and week 5 of those rats that achieved week 6 were considered for analysis.

Brain water assessment by gravimetry was performed in four groups of animals at 6 weeks after ligation: BDL rats (n=7), BDL rats with LPS (n=7), Sham-operated controls (n=7) and Sham-

operated controls with LPS (n=7). Venous blood samples were extracted after MR assessment and at the time of sacrifice in rats that participated in the gravimetric measurement.

Magnetic Resonance Experiments

¹H-Magnetic resonance studies were performed in a 7T Bruker BioSpec 70/30 USR (Bruker BioSpin GmbH, Karlsruhe, Germany) equipped with a mini-imaging gradient set (400mT/m), a circular polarized transmitter whole body coil (72 mm diameter) and a circular polarized receiver rat head coil. All MR data were acquired and processed on a Linux computer using Paravision 4.0 software (Bruker BioSpin GmbH, Karlsruhe, Germany).

The animal laid inside the MR-spectrometer on a bed equipped with a fixation system (tooth-bar and ear-plugs) to avoid motion artifacts and a tube that continuously provided the anesthetic (2% isoflurane) during a period of about 40 minutes. Body temperature and respiration were continuously controlled with a small animal monitoring and gating system (Model 1025, SA Instruments, Inc., Stony Brook, NY, USA).

Anatomical images

The anatomical images allow the localization of the regions of interest. The studied regions were visual cortex, sensorimotor cortex, motor cortex, hippocampus, thalamus, hypothalamus, striatum and nucleus accumbens. The images were obtained using rapid acquisition relaxation-enhanced (RARE) sequence (TR/TE_{eff}/ETL 4000ms/36ms/8) in axial (13 slices), sagittal (9 slices) and coronal (6 slices) plans. These orthogonal plans were used as an image of reference with the following parameters: slice thickness of 1mm, an acquisition matrix of

256x256 mm and a field of view of 35mmx35mm.

T2-weighted map

T2-weighted image were also acquired using multi-slice multi-echo (MSME) sequence (TE/TR 10-120ms/2000ms) in 13 continuous slices with 1mm thickness, an acquisition matrix of 128x128 mm and a field of view of 35mmx35mm to obtain T2 maps.

Apparent Diffusion Coefficient map

DTI were acquired using an echo-planar sequence (TR/TE/Δ/δ 2000ms/35ms/20ms/4ms) with the identical geometry of T2 map along 20 diffusion directions and 4 b-values (range 0-1000 s/mm²) to obtain ADC maps.

In vivo ¹H spectroscopy

Localized ¹H spectroscopy were obtained using a point resolved spectroscopy (PRESS) sequence preceded by a variable pulse power and optimized relaxation delays (VAPOR) sequence for global water suppression in a voxel size of 6.5mmx6.5mmx6.5mm with the following parameters: a spectral bandwidth 4000Hz, 4096 points, TE 12 ms, TR 2.5 s and 64 scans. The voxel was located above the pituitary gland and caudal to olfactory bulb and included grey and white matter. Chemical shifts were referenced to creatine at 3.02 ppm. Metabolites were quantified automatically (ratios compared to creatine) using LCModel software (Stephen Provencher Incorporated, Oakville, Ontario, Canada) (6). The LCModel software performs an automatic quantification of the in vivo spectra by reference spectra of rat brain built by phantoms of each metabolite.

Brain Water Measurement

Cerebral water content of BDL rats (n=8) was measured by a gravimetric method using a bromobenzene-kerosene gradient density calibrated with sulfate potassium. Percentage of water in tissue was calculated as described in (7). Briefly, a gradient of a mixture of bromobenzene and kerosene was built in a 100 mL graduate cylinder. Thirty minutes later, standards of sulphate potassium were immersed to get a calibrated curve. The animals were decapitated and brain was removed into a dry plaque. Then brain samples from frontal cortex were cut with a volume about 1mm^3 and were immersed into calibrate gradient density. After 2 minutes of immersion the specific gravity (sp gr) was determined by the calibrated curve obtained with sulphate potassium. The cerebral water content was computed using two tissue-specific constants (m_{tissue} , b_{tissue}) that have been determined by immersion of samples of dry solid tissue [Eq.1]. This method permitted a resolution in gray matter of 0.2%/graduate that was suited for the study of brain edema.

$$\frac{\% \text{ g } H_2O}{\text{g tissue}} = \frac{m_{\text{tissue}}}{\text{sp gr}} - b_{\text{tissue}} \quad [1]$$

Statistical Analysis

The significant differences between data in MR experiments (BDL and sham rats) were verified with two-way ANOVA for repeated measures. The significant differences between data in gravimetry (BDL and sham rats) were confirmed with one-way ANOVA. P-values < 0.050 were considered statistically significant. All the statistical analysis was performed with Sigma Stat package (SPSS Inc Chicago, USA).

RESULTS

General features

BDL rats showed biochemical alterations that are typical of advanced liver failure (week 6: ALT 128 ± 96 IU/L, bilirubin 5 ± 2 mg/dL, urea 38 ± 20 mg/dL). Some of these alterations worsened after inoculation of LPS (ALT 126 ± 50 IU/L, bilirubin 5 ± 2 mg/dL, urea 73 ± 44 mg/dL).

MR Experiments

T2 values remained stable in all studied regions, showing similar results between BDL and sham rats (Table 1). Likewise, ADC values did not show differences between BDL and Sham rats in all the studied regions (Table 2).

In comparison to T2 and ADC, the metabolic profile obtained by spectroscopy differed between BDL and controls: glutamine and lactate were higher, while glutamate, choline and myoinositol were lower (Figure 1). These differences were related to the time course, as demonstrated by the presence of interaction in the two-way ANOVA between the duration of the model and the metabolites glutamine (Gln/Cr: $P=0.040$) and choline (Cho/Cr: $P<0.001$). NAA did not differ between BDL and controls and was stable during the evolution of the model.

Brain Water

Gravimetric studies (Figure 2) showed a progressive increase in the brain water content in the frontal cortex among the four groups (ANOVA, $P = 0.029$). All pair-wise multiple comparisons showed significant differences between the group of sham-operated and the group of BDL rats challenged with LPS injection.

DISCUSSION

Brain edema is a complication of liver failure that can lead to intracranial hypertension and death. The accumulation of brain water may be predominantly limited to the intracellular or the extracellular space. The former is secondary to cellular swelling, mostly present in astrocytes; while the latter occurs due to an increase in the permeability of the blood-brain-barrier. The results of the current study indicate that both elements are present in acute-on-chronic liver failure. We have shown an increase in the amount of brain water in BDL rats challenged with LPS. This model has been considered to correspond to an acute decompensation of chronic liver failure, because it combines sustained liver injury with the inflammatory response induced by LPS (8). Brain edema was not accompanied by changes in ADC, which indicates that it affects both, the intracellular and extracellular compartments. These results are in accordance with MR findings in patients with acute-on-chronic liver failure and support that the mechanisms that generate brain edema relate to the time course of liver failure.

The pathogenesis of brain edema in acute liver failure has been attributed to astrocyte swelling, due to neuropathological findings in patients, observations in cultures of astrocytes exposed to ammonia and results of MR studies in experimental models (9). In accordance with an intracellular increase of water, diffusion weighted imaging has shown a decrease in the ADC. However, the MR characteristics of brain water distribution in cirrhosis, by far the most common cause of chronic liver failure, are different to those of acute liver failure. Patients with chronic liver failure show a rise in ADC (10) that may be exacerbated after an ammonia load (11).

Studies of brain water distribution in patients with acute-on-chronic liver failure are similar to those of the current study and are better accounted for by mixed edema (12).

A possible explanation for our findings is the coexistence of cytotoxic and vasogenic mechanisms (13). During acute-on-chronic liver failure, there will be an initial cytotoxic injury to the astrocyte. This injury would be mediated by ammonia and glutamine, as suggested by results in patients with acute liver failure (14) and in animal models (15). Initially, a compensatory response will include the decrease in myoinositol and choline, as we show in 4-5 weeks old BDL rats and the activation of aquaporin-4, a water channel that has been shown to be activated in 4 week old BDL (16). Systemic mechanisms, such as inflammatory stimuli and oxidative stress injury, present in 6 week old BDL rats could lead to a further damage of the astrocyte, induce the genesis of lactate, as observed in our and other studies (17) and increase the permeability of blood-brain-barrier to water (18). This process may explain the lack of changes in ADC in BDL rats with acute-on-chronic liver failure.

One important consequence of our findings is that hepatic encephalopathy cannot be simply attributed to the consequences of astrocyte swelling. If this would be the case, neurological manifestations would be directly related to increased intracellular water and accordingly to a decrease in the ADC. Our results are in accordance to those of other authors that show differences in brain water distribution in relation to the time course of liver failure. The results suggest that there is a spectrum in the increase in brain water in liver failure that is

predominantly intracellular in acute liver failure, mixed in acute-on-chronic liver failure and extracellular in chronic liver failure.

In conclusion, the severity and time course of liver failure is critical in the pathogenesis of brain edema. BDL rats show a pattern of metabolic disturbances in the brain similar to cirrhotic patients with an increase in glutamine and a

decrease in myo-inositol and choline derivatives. These findings highlight the relevance of the duration of liver failure in the generation of brain edema and in the activation of compensatory mechanisms. Similarly to patients with acute-on-chronic liver failure, brain edema in BDL rats challenged with LPS, appears to involve cytotoxic and vasogenic mechanisms.

FIGURE 1

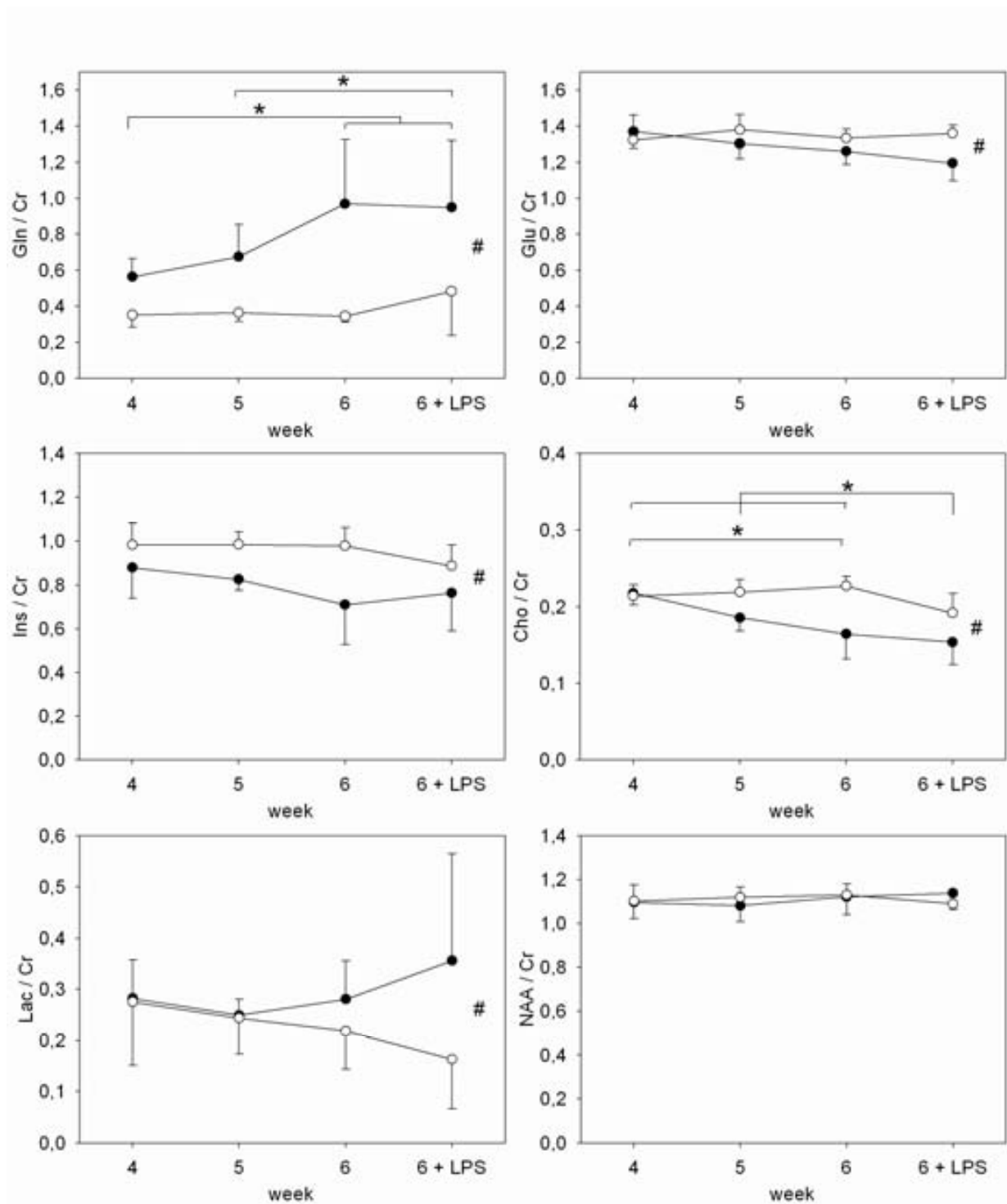


Figure 1: MR-spectroscopy of the brain in BDL (black) and sham rats (white) at repeated exams following surgery: 4, 5, 6 weeks (at baseline and 3 hours after LPS inoculation). Metabolites: Cr, creatine; Gln, glutamine; Glu, glutamate; Ins, myo-inositol; Lac, lactate; Cho, choline derivatives; NAA, N-acetylaspartate. Two-way repeated measures ANOVA followed by Dunn's Method or Holm-Sidak pairwise comparisons. (# $P < 0.050$ intergroup and * $P < 0.050$ intragroup).

FIGURE 2

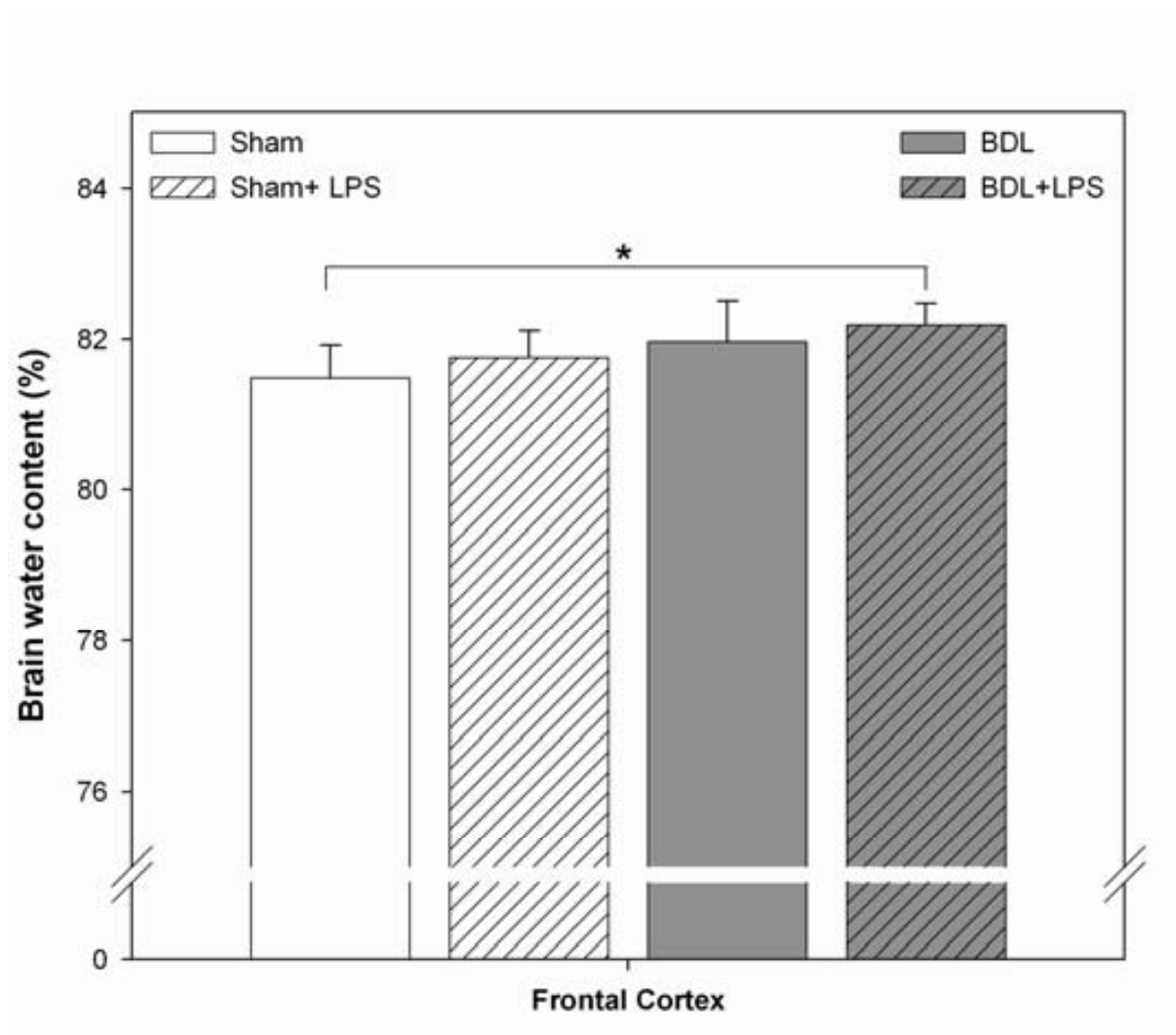


Figure 2: Percentage of cerebral water content quantified by gravimetry in sham rats and BDL rats at 6 weeks after surgery with or without LPS administration. One-way ANOVA followed by Dunn's Method or Holm–Sidak pairwise comparisons (* $P < .050$).

Table 1: T2 values of BDL and Sham rats at 4, 5 and 6 weeks after bile-duct ligation and at 6 weeks and 3 hours after Lipopolisacarides (LPS) inoculation

	T2 values (ms)								P [§]
	BDL				Sham				
	4	5	6	6 + LPS	4	5	6	6 + LPS	
Thalamus	45.0 ± 2.5	45.4 ± 2.9	45.2 ± 2.6	45.4 ± 2.6	45.3 ± 3.2	46.2 ± 3.7	45.1 ± 3.2	45.4 ± 3.1	0.443
Hypothalamus	48.9 ± 3.5	48.9 ± 3.9	48.9 ± 3.7	49.3 ± 3.7	49.9 ± 4.5	50.5 ± 5.1	49.7 ± 5.3	50.2 ± 4.6	0.815
Motor Cortex	49.2 ± 3.0	49.3 ± 3.3	50.2 ± 2.9	49.9 ± 3.0	49.9 ± 4.4	50.0 ± 4.5	50.6 ± 4.6	49.7 ± 4.2	0.500
Sensorial Cortex	47.9 ± 3.0	47.8 ± 3.3	48.6 ± 2.9	48.2 ± 3.0	48.0 ± 4.4	48.6 ± 4.5	48.5 ± 4.4	47.8 ± 4.2	0.282
Hippocampus	51.1 ± 3.0	51.0 ± 3.2	51.0 ± 3.1	50.8 ± 3.0	51.3 ± 3.4	51.6 ± 3.8	51.6 ± 3.7	51.0 ± 3.5	0.735
Striatum	48.2 ± 0.5	48.0 ± 0.5	47.7 ± 0.4	47.6 ± 0.5	48.5 ± 0.7	48.8 ± 0.3	48.6 ± 0.7	48.0 ± 0.5	0.847
Acumbens Nucleus	49.1 ± 3.0	49.2 ± 3.2	49.1 ± 3.0	48.2 ± 3.0	49.8 ± 3.6	50.6 ± 3.8	50.0 ± 3.7	49.6 ± 3.7	0.495
Substantia Nigra	47.4 ± 4.0	46.7 ± 3.2	47.3 ± 3.9	46.7 ± 3.7	46.8 ± 3.7	46.7 ± 4.2	47.0 ± 4.1	46.4 ± 3.4	0.964
Cerebellum	49.4 ± 3.4	49.1 ± 3.8	49.4 ± 3.4	49.4 ± 3.5	49.4 ± 4.1	50.4 ± 5.0	49.4 ± 4.3	49.3 ± 4.2	0.056
Brainstem	47.0 ± 3.4	47.7 ± 3.8	47.5 ± 3.4	46.9 ± 3.5	48.1 ± 4.1	48.9 ± 5.0	47.9 ± 4.3	47.8 ± 4.2	0.809

§ Two-ways repeated measures ANOVA

Table 2: Apparent diffusion coefficient (ADC) values of BDL and Sham rats, at 4, 5 and 6 weeks after bile-duct ligation and at 6 weeks and 3 hours after Lipopolisacarides (LPS) inoculation

	ADC values (µm ² /s)								P [§]
	BDL				Sham				
	4	5	6	6 + LPS	4	5	6	6 + LPS	
Thalamus	860 ± 36	920 ± 45	839 ± 36	841 ± 41	922 ± 48	875 ± 58	784 ± 41	827 ± 43	0.233
Hypothalamus	882 ± 44	941 ± 51	829 ± 49	832 ± 52	923 ± 96	903 ± 77	856 ± 92	863 ± 76	0.746
Motor Cortex	843 ± 73	870 ± 65	799 ± 71	833 ± 71	891 ± 64	909 ± 90	799 ± 74	824 ± 66	0.594
Sensorial Cortex	828 ± 68	855 ± 63	772 ± 65	813 ± 78	884 ± 68	881 ± 71	779 ± 58	812 ± 70	0.745
Hippocampus	867 ± 49	921 ± 48	818 ± 46	849 ± 50	946 ± 61	893 ± 70	823 ± 57	848 ± 62	0.454
Striatum	793 ± 42	830 ± 57	763 ± 41	804 ± 41	847 ± 129	834 ± 101	760 ± 28	754 ± 97	0.847
Acumbens Nucleus	821 ± 42	816 ± 43	709 ± 33	760 ± 39	841 ± 43	832 ± 51	653 ± 46	796 ± 39	0.885
Substantia Nigra	880 ± 55	948 ± 54	836 ± 45	863 ± 47	937 ± 71	886 ± 76	832 ± 54	839 ± 45	0.431
Cerebellum	772 ± 103	827 ± 99	666 ± 75	724 ± 83	877 ± 97	789 ± 100	749 ± 103	748 ± 94	0.261
Brainstem	989 ± 63	1051 ± 66	967 ± 62	1019 ± 69	986 ± 66	890 ± 73	851 ± 70	899 ± 57	0.241

§ Two-ways repeated measures ANOVA

REFERENCES

- (1) Chavarria L, Alonso J, Rovira A, Cordoba J. Neuroimaging in acute liver failure. *Neurochem Int* 2011 December;59(8):1175-80.
- (2) Donovan JP, Schafer DF, Shaw BW, Jr., Sorrell MF. Cerebral oedema and increased intracranial pressure in chronic liver disease. *Lancet* 1998 March 7;351(9104):719-21.
- (3) Shah NJ, Neeb H, Kircheis G, Engels P, Haussinger D, Zilles K. Quantitative cerebral water content mapping in hepatic encephalopathy. *Neuroimage* 2008 July 1;41(3):706-17.
- (4) Albrecht J, Norenberg MD. Glutamine: a Trojan horse in ammonia neurotoxicity. *Hepatology* 2006 October;44(4):788-94.
- (5) Warskulat U, Kreuels S, Muller HW, Haussinger D. Identification of osmosensitive and ammonia-regulated genes in rat astrocytes by Northern blotting and differential display reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *J Hepatol* 2001 September;35(3):358-66.
- (6) Provencher SW. Estimation of metabolite concentrations from localized in vivo proton NMR spectra. *Magn Reson Med* 1993 December;30(6):672-9.
- (7) Marmarou A, Poll W, Shulman K, Bhagavan H. A simple gravimetric technique for measurement of cerebral edema. *J Neurosurg* 1978 October;49(4):530-7.
- (8) Butterworth RF, Norenberg MD, Felipe V, Ferenci P, Albrecht J, Blei AT. Experimental models of hepatic encephalopathy: ISHEN guidelines. *Liver Int* 2009 July;29(6):783-8.
- (9) Cordoba J, Blei AT. Brain edema and hepatic encephalopathy. *Semin Liver Dis* 1996 August;16(3):271-80.
- (10) Lodi R, Tonon C, Stracciari A, Weiger M, Camaggi V, Iotti S, Donati G, Guarino M, Bolondi L, Barbiroli B. Diffusion MRI shows increased water apparent diffusion coefficient in the brains of cirrhotics. *Neurology* 2004 March 9;62(5):762-6.
- (11) Douglass A, Al MH, Record C. Amino acid challenge in patients with cirrhosis: a model for the assessment of treatments for hepatic encephalopathy. *J Hepatol* 2001 May;34(5):658-64.
- (12) Nath K, Saraswat VA, Krishna YR, Thomas MA, Rathore RK, Pandey CM, Gupta RK. Quantification of cerebral edema on diffusion tensor imaging in acute-on-chronic liver failure. *NMR Biomed* 2008 August;21(7):713-22.
- (13) Cauli O, Lopez-Larrubia P, Rodrigo R, Agusti A, Boix J, Nieto-Charques L, Cerdan S, Felipe V. Brain region-selective mechanisms contribute to the progression of cerebral alterations in acute liver failure in rats. *Gastroenterology* 2011 February;140(2):638-45.
- (14) Clemmesen JO, Larsen FS, Kondrup J, Hansen BA, Ott P. Cerebral herniation in patients with acute liver failure is correlated with arterial ammonia concentration. *Hepatology* 1999 March;29(3):648-53.
- (15) Chavarria L, Oria M, Romero-Gimenez J, Alonso J, Lope-Piedrafita S, Cordoba J. Diffusion tensor imaging supports the cytotoxic origin of brain edema in a rat model of acute liver failure. *Gastroenterology* 2010 April;138(4):1566-73.
- (16) Wright G, Soper R, Brooks HF, Stadlbauer V, Vairappan B, Davies NA, Andreola F, Hodges S, Moss RF, Davies DC, Jalan R. Role of aquaporin-4 in the development of brain oedema in liver failure. *J Hepatol* 2010 July;53(1):91-7.
- (17) Chatauret N, Zwingmann C, Rose C, Leibfritz D, Butterworth RF. Effects of hypothermia on brain glucose metabolism in acute liver failure: a H/C-nuclear magnetic resonance study. *Gastroenterology* 2003 September;125(3):815-24.
- (18) Bosoi CR, Yang X, Huynh J, Parent-Robitaille C, Jiang W, Tremblay M, Rose CF. Systemic oxidative stress is implicated in the pathogenesis of brain edema in rats with chronic liver failure. *Free Radic Biol Med* 2012 April 1;52(7):1228-35.

DISCUSSION

9. DISCUSSIÓ

L'edema cerebral és una greu complicació present en la insuficiència hepàtica tant crònica com aguda però encara no es sap amb certesa quin és el mecanisme que propicia l'increment d'aigua al cervell. El metabolisme cerebral també es veu alterat sobretot per un augment destacat de la glutamina. Es creu que aquests factors poden estar implicats en la patogènesis de l'EH.

9.1. Edema cerebral

En el primer estudi es va utilitzar un model quirúrgic d'insuficiència hepàtica aguda en el qual s'havia demostrat un increment d'aigua cerebral amb tècniques gravimètriques (60). Aquest model consistia en realitzar una anastomosi portocava i una posterior lligadura de l'artèria hepàtica. Un punt important de l'estudi era el fet que el model produís insuficiència hepàtica sense utilitzar cap toxina i d'aquesta manera evitar qualsevol alteració que podia causar la toxina en la barrera hematoencefàlica.

En l'estudi es pretenia caracteritzar l'edema cerebral de la insuficiència hepàtica aguda mitjançant tècniques de RM. Cal esmentar que no existeixen tècniques de RM que siguin fàcilment aplicables per obtenir una quantificació 'in vivo' de l'aigua cerebral. En la seva absència, les tècniques de difusió donen les eines útils per investigar l'edema cerebral, encara que a vegades la seva interpretació pot ser difícil a causa de la complexitat d'alguns processos com per exemple la lesió dels teixits o l'edema mixte (61).

En rates amb insuficiència hepàtica aguda es va observar que es produïa una disminució de l'ADC. Aquesta baixada d'ADC era homogènia en tot el cervell i es donava en totes les regions estudiades. Com ja s'ha comentat, l'ADC és un paràmetre de RM que permet estimar la dinàmica de l'aigua al cervell però que no serveix per quantificar l'aigua, per això es va quantificar l'aigua amb la tècnica gravimètrica.

El mal funcionament de la bomba de sodi en les fases inicials de la isquèmia cerebral (61) o al desequilibri osmòtic produït en una situació d'hiponatrèmia (41) causa un augment d'aigua a l'espai intracel·lular i produeix una baixada d'ADC. En

el nostre estudi, la disminució de l'ADC era més pronunciada a mesura que avançava la insuficiència hepàtica (estat de precoma i coma) i anava en paral·lel amb l'increment de l'aigua cerebral, mesurat per gravimetria. Això indicava que l'edema cerebral en la insuficiència hepàtica aguda es deu a un mecanisme citotòxic.

Aquestes observacions es van reafirmar amb l'estudi de la permeabilitat de la barrera hematoencefàlica. La integritat de la barrera hematoencefàlica es va avaluar amb el coeficient de transferència de la sucrosa marcada amb carboni-14. Aquest mètode està àmpliament utilitzat en models experimentals d'isquèmia. En una situació d'isquèmia s'observa un augment del coeficient de transferència d'unes cinc vegades superior al observat en animals controls (62). En el nostre estudi la permeabilitat de la sucrosa no es veu alterada i aquest resultat recolza el mecanisme citotòxic de l'edema cerebral.

Tanmateix, es va voler analitzar el paper que tenia l'anastomosi portocava en el desenvolupament de l'edema cerebral. Es va observar que no es produïen canvis en els valors d'ADC. A més, en els estudis gravimètrics tampoc es veuen canvis en el contingut d'aigua cerebral (~81% en cortex frontal (63)). Per tant, el model d'anastomosi portocava, per se, no produeix un edema cerebral, en canvi si que s'observen canvis en el metabolisme cerebral. Una possible explicació seria que es produeixen canvis dels metabòlits osmòticament actius, en absència de fallada energètica (64), que serveixen per mantenir la concentració osmolítica i iònica existent entre l'espai extracel·lular i l'intracel·lular i garantir així el volum cel·lular.

Existeixen dos estudis experimentals on han realitzat neuroimatge en models d'insuficiència hepàtica aguda induïts per infusió d'amoniac (65) i per l'administració de galactosamina (66). Ambdós estudis veuen alteracions en la dinàmica de l'aigua cerebral de forma heterogènia, és a dir, regions on es produeix una baixada ADC, com l'hipotàlam, regions on es veu un increment, com a l'estriat, i d'altres que es mantenen inalterades, com en el nucli accumbens. Els autors d'aquests estudis interpreten que aquests canvis es deuen a la presència d'un edema mixte (citotòxic i vasogènic). Però, encara que no es pot descartar que l'amoniac tingui un cert efecte tòxic en el cervell i que produeixi alteracions en l'ADC, existeixen algunes

limitacions en aquests dos estudis. En l'estudi del model per infusió d'amoníac no es va avaluar l'augment d'aigua cerebral i a més els experiments es van realitzar durant les dues hores posteriors a la injecció d'una única dosi d'amoníac (65). S'ha demostrat que l'edema cerebral no es fa evident fins després de, com a mínim, 3 hores d'una infusió contínua d'amoníac (67). Per tant, no es coneix si els resultats obtinguts es deu a l'increment de l'aigua o a la redistribució de l'aigua degut al bolus d'amoníac. En l'estudi d'infusió de galactosamina si que es va demostrar un increment d'aigua al cervell i un augment de la permeabilitat de la barrera hematoencefàlica, com havien demostrat altres estudis (68;69), i que, conjuntament amb les alteracions d'ADC, podrien confirmar l'edema mixte. Però no es pot descartar que existeixi alguna pertorbació a la barrera causada per la galactosamina. En canvi, en els estudis amb cultius cel·lulars s'observa un increment d'aigua dins de l'astròcit quan es dona una infusió d'amoníac (70;71).

En els estudis clínics realitzats en pacients amb insuficiència hepàtica aguda, secundària principalment a hepatitis viral aguda (tipus A, B, E) o a tractament amb antituberculosos, s'observa un increment d'aigua cerebral (72) associada a una disminució de l'ADC (73). Cal afegir que estudis on han examinat l'estructura dels capil·lars cerebrals, obtinguts a partir de biòpsies de pacients morts per insuficiència hepàtica aguda, mostren que les unions intercel·lulars (*tight junction*) es mantenen intactes (74) i a més es veu una vacuolització de les cèl·lules que envolten el vas. Aquests resultats donen suport a l'existència d'un edema cerebral d'origen citotòxic en els pacients amb insuficiència hepàtica aguda.

L'edema cerebral i l'augment de la pressió intracranial també s'ha documentat en l'insuficiència hepàtica crònica (75). En estudis amb pacients cirròtics estables s'observa un augment d'aigua cerebral (una disminució de l'index de transferència de magnetització) (51) i un increment de l'ADC (76). Això sembla indicar que els mecanismes de l'edema cerebral i les seves conseqüències probablement siguin diferents a la situació aguda.

Per tal d'obtenir informació sobre els mecanismes implicats en la situació crònica es va realitzar el segon estudi de la tesi en el qual es va estudiar l'edema cerebral mitjançant un ajust biexponencial de la difusió. El que es pretenia amb aquest ajust

era estudiar amb més deteniment els mecanismes de formació de l'edema cerebral en la situació crònica.

L'anàlisi biexponencial consistia en separar la difusió de l'aigua lliure en dos components anomenats ràpid i lent (77). Inicialment, aquest ajust estava ideat per mesurar l'espai intracel·lular amb el component lent i l'espai extracel·lular amb el ràpid (78). Però al realitzar l'anàlisi biexponencial del senyal de l'aigua es va obtenir una proporció de volum d'aigua en cada component (lent 33% i ràpid 67%) que no corresponia amb la distribució fisiològica de l'aigua a l'espai intracel·lular (80% d'aigua) i extracel·lular (20 %) (79;80). Una teoria més recent suggereix que aquests dos tipus de components corresponen a dos tipus d'aigua que depèn del nivell d'estructuració que té l'aigua lliure amb l'entorn (33). Malgrat aquesta controvèrsia, estudis on han analitzat el tensor de difusió amb un ajust biexponencial han mostrat diferent difusivitat segons el tipus d'edema cerebral. Així, els estudis de l'edema citotòxic realitzat en la fase inicial de l'ictus isquèmic mostren un augment de la difusivitat en el component lent (81); en canvi en els estudis de l'edema vasogènic present en regions peritumorals observen un augment de la difusivitat en el component ràpid (42). Per això, es va decidir realitzar un estudi de la difusió amb un ajust biexponencial en pacients amb cirrosis amb l'idea de diferenciar el tipus d'edema implicat en la insuficiència hepàtica crònica.

Les imatges de RM van mostrar signes d'edema cerebral en la substància blanca. Al realitzar l'ajust biexponencial es va observar un augment de la difusivitat en el component ràpid en les dues regions estudiades (substància blanca parietal i via corticoespinal). Aquests resultats són consistents amb els estudis previs de la difusió (54;82) i donen suport a un edema d'origen vasogènic (increment de l'aigua a l'espai extracel·lular). Aquest augment de la difusivitat va en paral·lel amb la disminució de la fracció d'anisotropia que probablement representa menys restricció del moviment de l'aigua lliure i que és una característica típica de l'edema extracel·lular (83). Aquesta observació de l'edema vasogènic en pacients cirròtics contrasta amb el primer estudi on s'observava que l'edema era de tipus citotòxic i per tant podria indicar que els mecanismes de formació de l'edema són diferents segons el tipus d'insuficiència hepàtica. Quan es van analitzar el component lent també es va veure un augment de la difusivitat de l'aigua present

només en la via corticoespinal. Aquest resultat podria correspondre a la coexistència d'ambdós tipus d'edema en aquesta regió. En altres situacions clíniques també s'ha proposat la existència d'ambdues formes d'edema. En un estudi amb pacients amb una lesió hepàtica aguda sobre un fetge prèviament malalt (*acute-on-chronic*) s'observa una disminució del fracció d'anisotropia i del component linial de la difusió i un augment del component esfèric de la difusió, mentre que la difusivitat mitja i el component planar de la difusió no es veuen alterats. Aquests resultats indicarien que en aquests pacients hi ha la presència d'ambdós tipus d'edema (84). La malaltia hepàtica crònica hauria causat un edema vasogènic, sobre el que s'afegiria la formació de l'edema citotòxic per la descompensació aguda.

Actualment, el tractament de l'edema cerebral de la insuficiència hepàtica aguda consisteix amb la teràpia osmòtica pel manteniment de la integritat de la barrera hematoencefàlica. A més es pot afegir hiperventilació per disminuir el volum cerebral de sang i mitjançant aquest mecanisme reduir la pressió intracranial. Tot i això, estudis de ressonància magnètica per avaluar el tractament amb manitol realitzats en pacients amb insuficiència hepàtica aguda i insuficiència hepàtica crònica aguditzada no mostren cap reducció de l'edema cerebral ni canvis en el metabolisme cerebral després del tractament (85). El tractament de la insuficiència hepàtica és el transplantament hepàtic i amb ell es resolen totes les complicacions derivades de la insuficiència hepàtica. Per tant, en el segon estudi també es va voler seguir l'evolució de l'edema cerebral després del transplantament. El que es va observar era que tant la difusivitat del component ràpid com la fracció d'anisotropia es normalitzaven a excepció de la via corticoespinal on persistia cert grau d'isotropia (valors baixos de la fracció d'anisotropia). La falta de recuperació de la fracció d'anisotropia podria indicar que en la via corticoespinal hi ha canvis microestructurals de la substància blanca causats, probablement, per desmielinització (86). Aquesta pèrdua de mielina podria explicar el trastorn funcional que persisteix després del transplantament en pacients amb mielopatia (87). Aquests resultats suggeririen que la via corticoespinal és més vulnerable que la substància blanca parietal. Probablement aquesta zona és més sensible a les alteracions produïdes en l'EH (52).

Una de les hipòtesis sobre la patogènesis de l'EH és que l'edema astrocitari (edema citotòxic) és el factor causant de l'EH. Per això es van realitzar tests neuropsicològics en els pacients cirròtics del segon estudi, els quals no presentaven signes evidents d'EH, per saber si tenien EH subclínica. Es va comprovar que la meitat dels pacients tenien EH mínima però al comparar la difusivitat mitja i la fracció d'anisotropia amb els pacients amb cirrosi i sense EH no s'observaven diferències, motiu pel qual es va proposar el tercer estudi de la tesi.

En el tercer estudi de la tesi es pretenia estudiar les característiques de l'edema cerebral en pacients amb cirrosi hepàtica durant un episodi d'EH. Per aquest motiu es van incloure pacients amb una EH evident. Es va observar que aquests pacients presentaven un ADC elevat però que no existia cap relació entre les manifestacions neurològiques (EH) i la distribució de l'aigua cerebral. A més aquest increment d'aigua cerebral es normalitzava quan ja s'havia resolt l'episodi d'EH. Aquests resultats indicaven que el desenvolupament de l'EH en pacients cirròtics no es podia atribuir directament a l'edema cerebral.

L'única dada relacionada amb els valors d'ADC era el tractament amb diürètics. Els pacients que els havien rebut presentaven valors d'ADC més elevats. Això suggereix que el mecanisme pel qual els diürètics causen EH poden participar en els canvis de la distribució de l'aigua cerebral. A més es va observar una correlació entre els valors de myo-inositol i la hiponatrèmia, com ja s'havia demostrat en altres estudis (88) que, tot i que no es correlacionaven amb els valor d' ADC, podria ser un signe addicional de l'alteració de la distribució d'aigua al cervell. Cal afegir que un nombre elevat de pacients també presentaven lesions focals en la substància blanca. Aquestes lesions són compatibles amb les lesions vistes en malaltia cerebrovascular de petit vas. Estudis recents han demostrat que aquestes lesions de leucariois estan presents en la isquèmia i podrien indicar una major permeabilitat de la barrera hematoencefàlica (89-91). A més s'ha vist que disminueixen després de l'episodi d'EH. Aquestes lesions leucariois també disminueixen després del transplantment hepàtic (53). Per tant aquestes dades podrien indicar que l'edema vasogènic present en els pacients cirròtics es deu a alteracions de la barrera hematoencefàlica. Aquest augment de permeabilitat podria ser secundària a la inflamació crònica i a l'activació de citoquines (92).

El quart estudi de la tesi es va realitzar per tal d'avaluar l'edema vasogènic i les possibles alteracions de la barrera hematoencefàlica. El model experimental elegit va ser el model de cirrosi secundària a la lligadura del conducte biliar per tal d'evitar qualsevol model produït per toxines que poguessin alterar la barrera hematoencefàlica. El moment elegit per analitzar l'edema cerebral era a les 6 setmanes de la lligadura del conducte biliar perquè diferents estudis havien demostrat un augment del contingut d'aigua cerebral tant per mètodes gravimètrics com per mètodes de dessecació (93;94). L'estudi de RM es va dur a terme a partir de la quarta setmana de la lligadura del conducte biliar ja que s'ha demostrat que en aquest moment comencen a observar alteracions dels paràmetres bioquímics i hipertensió portal (95). A més, en un grup d'animals es va inocular lipopolisacàrids, que és un factor precipitant per activar la cascada de neuroinflamació i provoca una descompensació de la insuficiència hepàtica (96). En el nostre estudi es va observar un augment d'aigua cerebral. Aquest augment era estadísticament significatiu en el grup d'animals inoculats amb lipopolisacàrids. En canvi, no es van observar alteracions de la difusivitat de l'aigua cerebral ni en el grup d'animals amb els lipopolisacàrids. El fet que no es veiessin alteracions en la difusió podria indicar l'existència d'un edema mixte. Per això no es veurien les alteracions dels paràmetres de RM tot i que es produeixi un augment del contingut d'aigua cerebral observat per gravimetria. Per tant, aquest model animal reproduïx les troballes vistes en els pacients amb una descompensació aguda de la cirrosi, motiu pel qual no es un bon model per estudiar l'edema vasogènic ni les pertorbacions en la barrera hematoencefàlica.

Els resultats dels diversos estudis realitzats mostren que existeixen diferents patrons en l'augment d'aigua cerebral produïts per la insuficiència hepàtica. Aquest augment de l'aigua seria principalment intracel·lular en la insuficiència hepàtica aguda, mixte en la insuficiència hepàtica crònica aguditzada i extracel·lular en la insuficiència hepàtica crònica. La hipòtesi que es podria suggerir sobre l'edema cerebral en l'insuficiència hepàtica seria la següent. En un primer moment es formaria l'edema citotòxic a nivell de l'astròcit produït per l'augment de la concentració d'amoníac al cervell en forma de glutamina. El segon esdeveniment, i tenint en compte que l'astròcit forma part de la barrera hematoencefàlica, es

produiria una alteració de la barrera que a llarg termini produiria l'edema vasogènic.

9.2. Metabolisme cerebral

L'espectroscòpia detecta les alteracions del metabolisme cerebral. En la insuficiència hepàtica es veu un augment de la glutamina i una disminució del myo-inositol i dels derivats de colina que es pot considerar el patró metabòlic d'aquesta patologia.

En el primer estudi de la tesi es va avaluar el metabolisme cerebral en la insuficiència hepàtica aguda. El patró metabòlic ja es comença a observar en el model animal d'anastomosi portocava però l'augment del pic de la glutamina és significativament inferior al observat en les etapes inicials de l'insuficiència hepàtica aguda (a les 6 hores de la lligadura). Bàsicament, els canvis metabòlics que es van detectar en el model d'insuficiència hepàtica aguda van ser de caràcter lleu (<20%) a excepció de la glutamina i del lactat.

La glutamina és l'aminoàcid precursor del glutamat cerebral i es troba localitzada en les cèl·lules astrocitàries. A l'astròcit hi ha l'enzim glutamat sintetasa que està implicat en el cicle glutamat/glutamina i en una situació d'hiperamonèmia es pot produir una alteració d'aquest cicle.

Aquests metabòlits (glutamina i lactat) es van examinar amb més deteniment a mesura que progressava la insuficiència hepàtica. En estats inicials (6 hores després de la lligadura) com ja s'ha comentat hi ha un augment de la glutamina i del lactat que a més, es van incrementant en l'estat de precoma. El canvi de l'estat precoma a l'estat de coma va acompanyat per un augment marcat del lactat, de més de tres vegades, sense un augment significatiu de la glutamina.

Aquest curs és similar al que s'ha descrit en pacients amb insuficiència hepàtica aguda sotmesos a un control de lactat per microdiàlisi i en els quals es va observar un gran augment de la pressió intracranial (64). En altres estudis de pacients amb insuficiència hepàtica aguda també s'ha observat aquest augment marcat de la glutamina i el lactat (97). A més, com es va comprovar en els estudis addicionals,

aquesta síntesi del lactat és 'de novo' (98) i només es dona al cervell, probablement degut a l'estat d'inactivitat que presenten els animals.

Aquestes dades recolzen la hipòtesi de la deficiència energètica cerebral secundària al metabolisme de l'amoniac. Aquest dèficit energètic podria indicar l'existència d'alguna lesió mitocondrial (71) encara que els experiments d'espectroscòpia amb fòsfor 31 contradiuen aquesta hipòtesis ja que no observen alteracions en els metabòlits energètics com l'ATP (99). D'altra banda, el lactat podria estar generat per via aeròbica degut a una activació glutamatèrgica excessiva (100).

A més, s'observa una disminució del pic de glutamat, un aminoàcid que actua en la neurotransmissió excitadora, probablement secundari al consum d'aquest substrat per la síntesi de glutamina. En canvi no s'han observat aquests canvis en el model d'anastomosi portocava. També s'ha vist que aquest i altres aminoàcids cerebrals relacionats amb la neurotransmissió canvien la seva concentració en diferents fluids (plasma, sang total, líquid cerebrospinal) a mesura que es va desenvolupant el coma hepàtic (101).

Hi ha una disminució del N-acetilaspargat en l'estat de coma que és un metabòlit, considerat com a marcador de la densitat neuronal. Aquestes alteracions vistes en el model animal podria explicar les disfuncions cognitives que s'observa en els pacients (102).

En el tercer i quart estudi de la tesi es va avaluar l'alteració del metabolisme cerebral de la insuficiència hepàtica crònica. El perfil metabòlic de la insuficiència hepàtica crònica respecte el grup d'individus control és caracteritzat per l'augment de glutamina i la disminució dels derivats de colina i el myo-inositol, resultats que ja s'havien trobat en altres estudis de cirrosi (50).

El resultat més destacat es troba en l'estudi en pacients amb cirrosi durant l'episodi d'EH. La glutamina basal augmenta a mesura que creix el grau d'EH i es redueix un cop el pacient s'ha recuperat de l'episodi d'EH. En canvi, la glutamina es manté estable en els pacients que encara presenten EH sis setmanes després del primer

estudi. Aquestes dades són una prova clínica del paper de la glutamina com a factor causant d'EH.

La glutamina clàssicament s'ha considerat com un aminoàcid inert però el transport d'amoniac en forma de glutamina cap a la mitocòndria de l'astròcit pot ser un element tòxic per aquesta cèl·lula (103). Alternativament, l'augment de glutamina pot ser un simple indicador de l'exposició d'amoniac que hi ha al cervell i pot ser el factor clau en el desenvolupament de l'EH.

Independentment del seu paper en la patogènesis de l'EH, la glutamina cerebral podria ser un biomarcador útil pel diagnòstic de casos difícils d'encefalopatia, per exemple pacients cirròtics amb encefalopatia no hepàtica secundària a malaltia de petit vas cerebrovasculars o a l'Alzheimer.

CONCLUSIONS

10. CONCLUSIONS

- L'edema present en la insuficiència hepàtica aguda és principalment citotòxic, es dir hi ha un increment d'aigua a l'espai intracel·lular, i no estan involucrats mecanismes de trencament ni d'augment de la permeabilitat de la barrera hematoencefàlica.
- L'edema en la insuficiència hepàtica crònica és principalment vasogènic el que implica un increment de l'aigua a l'espai extracel·lular.
- Existeixen indicis de la coexistència dels dos tipus d'edema, citotòxic i vasogènic, en els pacients amb insuficiència hepàtica crònica.
- L'edema cerebral està present en pacients durant un episodi d'EH, tot i així, no sembla ser el factor desencadenant de l'EH.
- Després del transplantament hepàtic o de l'episodi d'EH hi ha una resolució total o parcial de l'edema cerebral excepte en la via corticospinal.
- La via corticospinal sembla ser una regió més sensible al desenvolupament de seqüeles de l'EH.
- En la situació aguda hi ha una síntesi de lactat de 'novo' en els astròcits que pot estar associada a una fallada energètica o a l'activació del sistema lactat/glutamat.
- La concentració de glutamina en el cervell determinada per espectroscòpia de RM s'incrementa amb el grau d'EH. Per tant, pot ser un bon candidat a biomarcador de l'EH en pacients cirròtics.

MATERIALS I MÈTODES

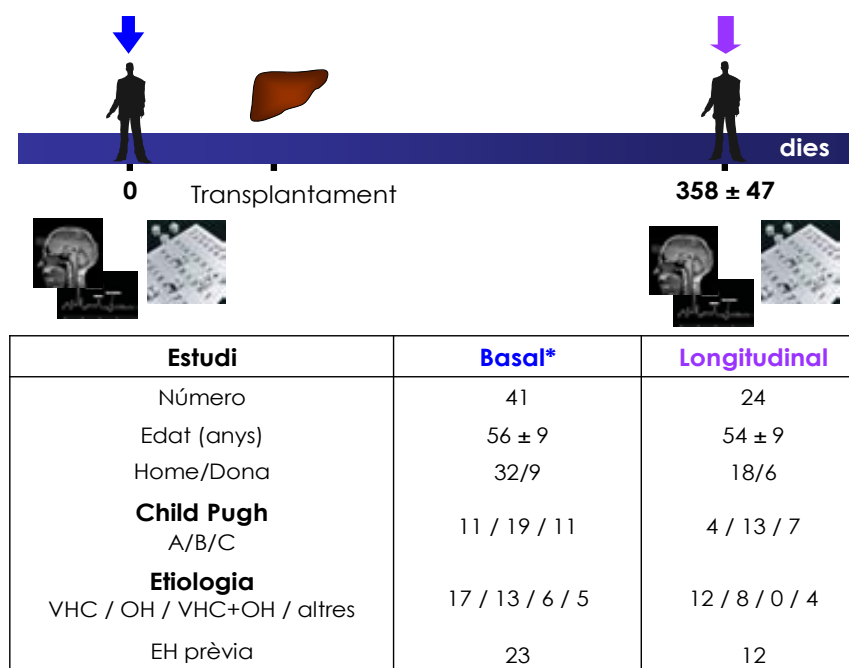
11. MATERIALS I MÈTODES

11.1. Subjectes

Es van realitzar dos estudis clínics sobre l'edema cerebral en pacients amb cirrosi mitjançant RM on es van estudiar pacients sense encefalopatia hepàtica, amb EH mínima o amb EH episòdica. Tots els estudis van ser aprovats pel comitè ètic de l'hospital Vall d'Hebron i amb el consentiment informat de tots els participants.

11.1.1. Estudi de RM en pacients amb cirrosi

Aquest estudi es va dividir en dues fases. La primera era un estudi basal que consistia en l'avaluació de l'edema cerebral en pacients sense signes evidents d'EH (sense EH o amb EH mínima). La segona fase era un estudi longitudinal per fer el seguiment de l'edema després del transplantament del fetge. En l'estudi Basal es van reclutar 41 pacients amb cirrosi i 24 d'ells es van tornar a analitzar un any després (358 ± 47 dies) del transplantament en l'estudi longitudinal. Aquells pacients amb una cirrosi d'origen alcohòlic van ésser abstinentes com a mínim en els sis mesos anteriors a l'estudi (Figura 11.1).



* Controls (n=16) → 6 homes/10 dones (53 ± 7 anys)

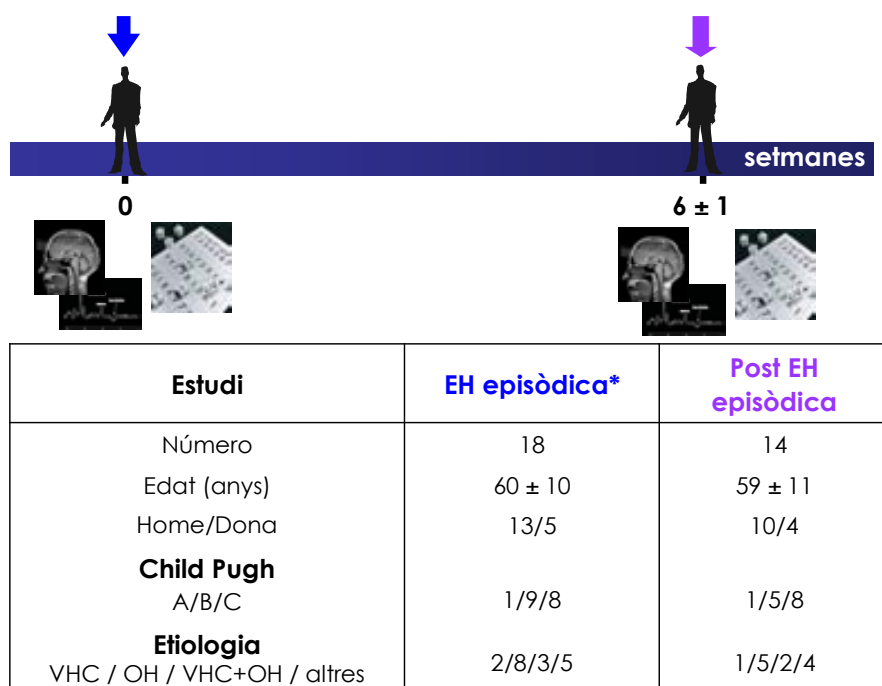
Figura 11.1 Disseny experimental i característiques clíniques dels pacients

Es va realitzar una bateria de tests neuropsicològics per detectar la EH mínima. Aquesta bateria consistia en diferents tests per avaluar la memòria (Auditory Verbal

Learning Memory Test); l'atenció i el processament de la informació (Trail A, Symbol Digit Test); i la funció psicomotora (Grooved Pegboard), executiva (Controlled Oral Word Association Test) i visuoperceptual (Hooper Visual Organization test, Judgment of Line Orientation test). Els resultats d'aquestes proves es van transformar en uns índexs T, ajustats per edat, sexe i nivell d'educació que mostren qualsevol desviació del grup control de persones sanes ($T=50$) (13). Es considera que un pacient cirròtic té EH mínima quan dos o més tests d'aquesta bateria es troben per sota a dues desviacions estàndards de la mitja ($T<30$). Com a grup control es van reclutar 16 voluntaris sans, dels quals 6 eren homes i 10 dones, amb una edat de 53 ± 7 anys, sense un historial d'abús de drogues o alcohol i cap d'ells patia malaltia hepàtica o neurològica.

11.1.2. Estudi de RM en pacients durant un episodi d'EH

L'estudi durant un episodi d'EH consistia en realitzar imatges de RM en pacients amb un episodi agut d'EH i veure com evolucionaven aquests paràmetres quan l'episodi ja estava resolt. Abans de cada ressonància, els pacients es van sotmetre a una bateria de tests neuropsicològics (*West Haven*) per avaluar com estava la funció cognitiva. En aquest estudi es van avaluar 18 pacients cirròtics, dels quals 14 es van tornar a analitzar 6 setmanes després i es van comparar amb 8 voluntaris sans (Figura 11.2).



* Controls (n=8) → 4homes/4dones (57 ± 8 anys)

Figura 11.2 Disseny experimental i característiques clíniques dels pacients.

11.2. Models Animals

Existeixen diversos models animals per estudiar la insuficiència hepàtica. En els nostres estudis experimentals es van utilitzar el model de desvascularització hepàtica per estudiar l'edema cerebral en la insuficiència hepàtica aguda i el model de lligadura del conducte biliar per estudiar l'edema a la insuficiència hepàtica crònica.

Tots els animals utilitzats per realitzar els diferents models eren rates mascles tipus *Sprague-Dawley* (Harlan, Udine, Itàlia) amb un pes inicial d'uns 250-300g. Aquests animals van romandre estabulats sota un ambient controlat, amb un cicle de llum i fosc de 12 hores, una temperatura constant de $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ i humitat relativa del 40-50% i a més, tenien lliure accés a menjar (dieta estàndard) i aigua.

Tots els estudis experimentals van ser aprovats pel comitè ètic d'experimentació animal de l'hospital Vall d'Hebron.

11.2.1. Model d'Insuficiència Hepàtica Aguda: Desvascularització

El model de desvascularització consisteix en eliminar les principals entrades de sang al fetge; les quals són la vena porta, on circula una sang amb un alt contingut de nutrients, i l'artèria hepàtica, on circula una sang més rica en oxigen. D'aquesta manera es provoca la insuficiència hepàtica i es produeix una acumulació d'amoniac al sistema circulatori que es postula com a agent causant de l'encefalopatia hepàtica.

Per fer la desvascularització a les rates, primer es fa una anastomosi portocava perquè hi hagi una comunicació directa entre la via portal i la sistèmica (Lee & Fischer). Per realitzar l'anastomosi portocava s'identifica la vena porta i s'aïlla amb un clampatge. Després es fa un clampatge de la vena cava inferior per sota i per sobre de les venes renals. S'obra un ullal a la vena cava i s'anastomosa a la vena porta amb una sutura continua de prolene 7/0. Es treu el clamp de la vena cava i es confirma que hi ha circulació correcta de sang i absència de lesions intestinals. Vint-i-quatre hores després es fa una segona cirurgia en la qual es procedeix a la lligadura de l'artèria hepàtica. Les dues cirurgies es realitzaran sota anestèsia per inhalació (isofluorà). Aquests animals desenvolupen insuficiència hepàtica fins arribar a un estat de precoma caracteritzat per una pèrdua del reflex de

redreçament (a les 10-12 hores de la lligadures de l'artèria) i un estat de coma on a més, hi ha una pèrdua del reflex corneal (a les 14-16 hores de la lligadura) (Figura 11.3).

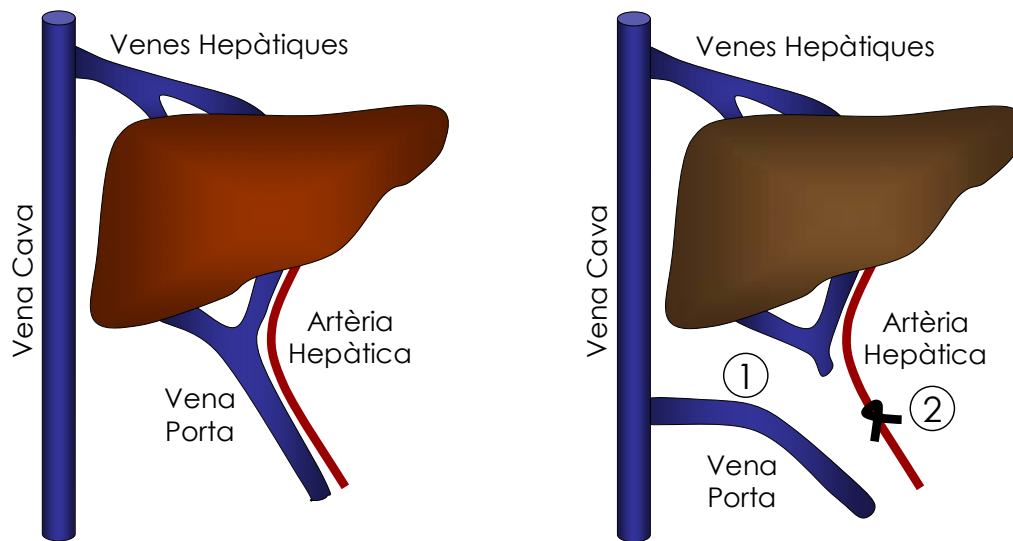


Figura 11.3 Desvascularització del fetge: l'anastomosi portocava (1) i la lligadura de l'artèria hepàtica (2).

En aquest model animal s'ha de mantenir controlada la temperatura i la glicèmia; per això es fa un monitoratge d'ambdós paràmetres cada hora durant tot l'experiment. La temperatura corporal es manté a 37°C mitjançant mantes tèrmiques. La glicèmia es controla mitjançant un test de glucosa en sang (Glucocard® A. Menarini Diagnostics S.r.l., Florència, Itàlia) a la vena de la cua. El nivell de glucosa es mantenen sobre els 100mg/dL. Per sota d'aquest nivell s'administra una dosi subcutània entre 0.5-2mL d'una solució de glucosa al 10% (Glucosado 10%, Fresenius Kabi, Bad Homburg, Alemanya).

En el grup de rates control es fa una operació fictícia de l'anastomosi portocava sota anestèsia (isofluorà) durant la qual es fa un clamplatge de 15 minuts de la vena porta. Vint-i-quatre hores després es procedeix la cirurgia fictícia de la lligadura de l'artèria hepàtica.

11.2.2. Insuficiència Hepàtica Crònica: Lligadura del Conducte Biliar

El model de la lligadura del conducte biliar és un model de cirrosi biliar secundària. La intervenció consisteix en dissecar el conducte biliar del greix adjacent, en el qual es prepara una lligadura i es lliga la part del conducte que va cap a l'intestí. Després es punxa en direcció al fetge amb una agulla de 30G 0,1mL/kg de

formalina, ja que la formalina esclerosa. D'aquesta manera es fixa el conducte biliar i així s'evita la formació de biloma que podria desencadenar una peritonitis. Tot seguit es fa la lligadura, es neteja el possible líquid que hagi sortit i es talla el conducte entre els dos nusos per evitar la repermeabilització (Figura 11.4).

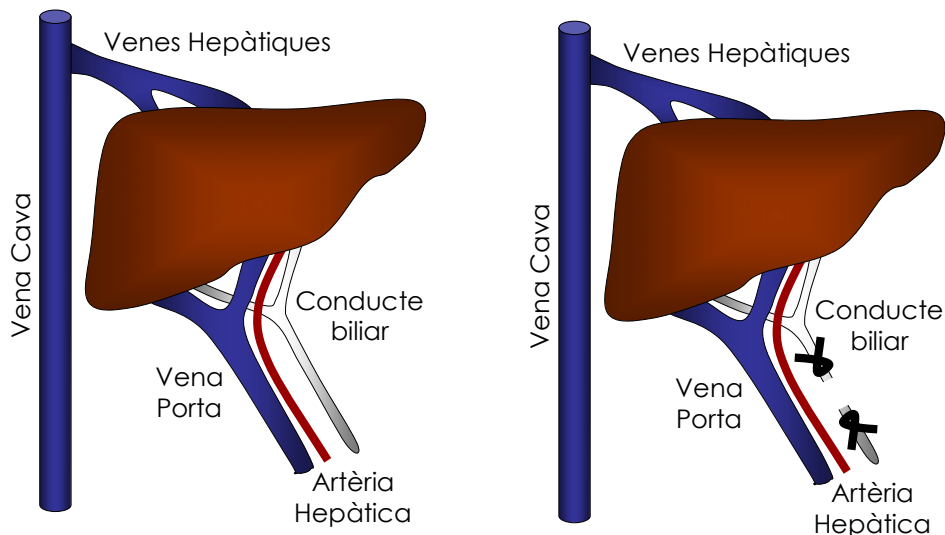


Figura 11.4. Lligadura del conducte biliar

Per evitar hemorràgies per dèficit de vitamina K, les rates reben una dosi de vitamina K (0.1mL/Kg) a la setmana per via intramuscular. En el grup de rates amb cirurgia fictícia (rates control) es fa el mateix procediment però no es realitza la doble lligadura ni la injecció de formalina. Els experiments es fan a les 6 setmanes de la lligadura del conducte biliar i en aquesta etapa la mortalitat és alta (60%).

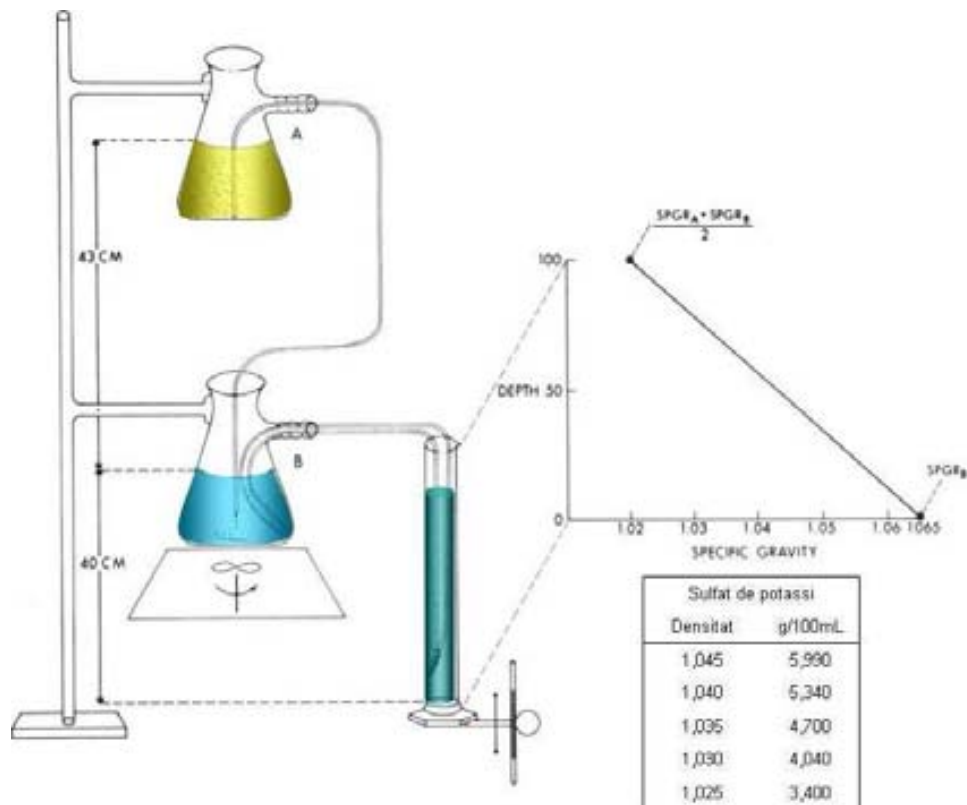
- Factor precipitant de la cascada neuroinflamatòria: lipopolisacàrids

Els lipopolisacàrids (LPS) són unes biomolècules localitzades en la membrana exterior dels bacteris gram negatiu. Aquestes molècules produeixen l'activació de la cascada neuroinflamatòria en els animals i per tant ens permeten avaluar la resposta immunitària de la infecció. D'aquesta manera es produeix augment de permeabilitat de la barrera hematoencefàlica que és un factor de descompensació de la insuficiència hepàtica.

En un grup d'animals amb cirrosi biliar secundària se'ls induirà l'activació de la cascada neuroinflamatòria mitjançant l'administració d'una dosi 1mg/kg de LPS de la soca *Klebsiella Pneumoniae* en un volum final de 0.5mL de sèrum salí per via intraperitoneal.

11.3. Gravimetria

Per mesurar la quantitat d'aigua que hi ha en els teixits cerebrals de les rates (còrtex frontal) es va utilitzar el mètode de gravimetria descrit per Marmarou (104). Aquest mètode consisteix en realitzar una columna amb un gradient de densitats construïda a partir d'una combinació de querosè i bromobenzè. Aquesta columna es calibra amb uns estàndards de sulfat potassi els quals tenen una densitat específica (Figura 11.5).



11.5 Muntatge per fer la columna gravimètrica (Ref.105)

Per mesurar la quantitat d'aigua en el cervell el que es fa és tallar les mostres de teixit amb una mida d'un a dos mil·límetres cúbics (unes 6 mostres per teixit) i submergir-les a la columna de densitat, així d'aquesta manera es pot determinar la quantitat d'aigua que conté el cervell.

11.4. Metabonòmica: Estudi de metabolisme amb ^{13}C -glucosa

Es va realitzar un estudi del metabolisme cerebral mitjançant RM. Es va realitzar espectres de protó per estudiar el patró metabòlic cerebral i també es va fer espectres de carboni 13 per estudiar de forma específica la glicòlisi.

Per fer aquest estudi metabonòmic es va utilitzar el model de desvascularització i l'estudi es va fer al cap de 12 hores d'haver realitzat la lligadura de l'artèria hepàtica. Per tal de fer l'estudi de carboni 13 es va injectar glucosa marcada amb carboni 13 ([1-13C]-glucosa, Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Alemanya) per via intraperitoneal a una dosi de 200mg/kg. Passat vint minuts es van sacrificar els animals i es va procedir a l'extracció de diferents teixits (cervell, múscul, sang) per congelar-los amb nitrogen líquid de la forma més ràpida possible i així parar el metabolisme.

En el teixit congelat es va fer l'extracció dels metabòlits. Aquesta extracció consistia en: polvoritzar el teixit en fred; afegir un volum de 6mL/g de teixit de metanol/cloroform (2:1) a 4°C; esperar 15 minuts a 4°C mesclant amb alguns cops de vòrtex; afegir un volum de 2.5mL/g de teixit de cloroform i un volum de 3.7mL/g de teixit d'aigua; centrifugar a 1000G a temperatura ambient (23°C) durant 5 minuts; i separar la fase orgànica i la fase aquosa. Aquesta extracció es fa dos cops i després s'evapora la fase orgànica i el metanol de la fase aquosa amb nitrogen gas; la fase aquosa s'acaba d'evaporar mitjançant Speed-Vac (Jouan, Nantes, França) a 35°C.

Per fer l'estudi d'espectroscòpia es va recompondre el sòlid amb aigua deuterada a un volum final de 600µL. Per quantificar els metabòlits es va afegir una referència externa amb una concentració coneguda. En els nostres experiments es va afegir una concentració 1mM de trimetil-sililpropionat sòdic (TSP) (Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Alemanya).

11.5. Ressonància magnètica

La RM és una tècnica no invasiva que ens permet avaluar el sistema nerviós central. Aquesta tècnica es basa en l'estudi de les propietats magnètiques d'alguns nuclis (protó, carboni, fòsfor, sodi) dels teixits biològics a partir de la qual podem obtenir imatges i espectres. D'aquesta manera podem observar qualsevol alteració produïda per una patologia.



Figura 11.6 Aparells de RM: Siemens per pacients (esquerra), Bruker Biospec per animals petits (centre) i Bruker 9.4T per animals petits i mostres (dreta)

11.5.1. Pacients

En pacients, els experiments de RM es van realitzar en espectròmetres de Siemens® (Siemens, Erlangen, Alemanya). En l'estudi dels pacients amb cirrosi es va utilitzar l'espectròmetre Symphony de 1.5T i en l'estudi de pacients amb EH episòdica es va utilitzar l'espectròmetre Trio de 3T (Figura 11.6).

- Symphony Quantum Maestro Class (1.5T)

L'espectròmetre *Symphony Quantum Maestro Class* és un imant de 1.5 T. Per realitzar els experiments es va utilitzar la bobina de cos com a transmissor del senyal i la bobina de cap (circular i polaritzada) que actuava com a receptor. El protocol de RM consistia en l'obtenció de imatges potenciades T1 utilitzant una seqüència *spin-echo* (TR: 650ms; TE: 17ms; 1 adquisició) i imatges potenciades en T2 mitjançant una seqüència *spin-echo* (TR: 3550ms; TEs: 14-86ms; 1 adquisició i ETL 5). Per cada eco es varen obtenir un total de 46 imatges transversals contínues, de 3mm de gruix, una mida de píxel de 1x1mm, un camp de visió de 250mm i una matriu d'adquisició de 256x256.

També es van obtenir imatges de tensor de difusió mitjançant una seqüència *single-shot echo-planar* (TR: 1100ms; TE: 145ms; 10 adquisicions) i utilitzant els gradients aplicats en 6 direccions no co-lineals i 11 valors de b (entre 0-7500 s/mm²). Es van obtenir 5 imatges axials centrades 2cm per sobre de la línia bicomisural amb un gruix de 4mm, una separació entre talls de 2mm, un camp de visió de 250mm i una matriu d'adquisició de 64x64 que donava una resolució en el pla de 3.9x3.9mm.

Es va realitzar espectroscòpia localitzada en la regió parieto-occipital en un volum cúbic de 2cm de costat en el que principalment hi havia substància blanca (Figura 11.7). Per realitzar l'espectre es va utilitzar una seqüència de polsos spin-eco 90°-180°-180°, amb un TE de 30ms i un TR de 1600 ms. Per fer la supressió d'aigua es va aplicar un pols gaussià selectiu centrat a la posició de l'aigua. El nombre de punts que es van adquirir van ser de 1024 punts amb un nombre de promitjos de N=128 i un ample espectral de 1000Hz.

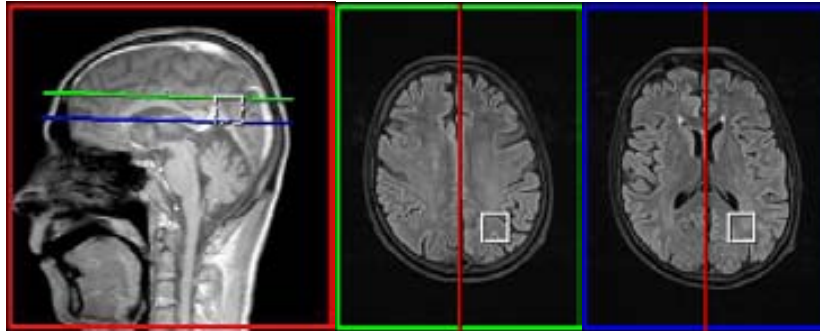


Figura 11.7. Localització de l'espectre al cervell dels pacients en els diferents plans

- Trio (3T)

L'espectròmetre Trio és un imant de 3T. Per realitzar els experiments es va utilitzar la bobina de cos com a transmissora de radiofreqüència i la bobina de cap (circular i polaritzada) que actuava com a receptora. El protocol de ressonància consistia en realitzar imatges potenciades en densitat protònica i en T2 amb una seqüència fast spin-echo (TR: 2900 ms; TE:19 -87ms; 2 adquisicions; factor turbo de 6) i imatges T2 amb una seqüència FLAIR (TR: 9000ms; TE: 93ms; temps d'inversió [TI]: 2500ms; 1 adquisició; factor turbo de 16) per enregistrar 46 imatges contigües de 3mm de gruix en un camp de visió de 250mm i una matriu d'adquisició de 256x256. Les imatges de difusió es van obtenir amb una seqüència single-shot echo-planar (TR: 4000ms; TE: 93ms; 6 adquisicions; factor turbo de 128) i utilitzant gradients en 3 direccions ortogonals amb 4 valors de b 0, 1000, 2000 3000 s/mm² per cada direcció. Es varen obtenir 28 imatges axials de 4mm de gruix i una distància entre tallis de 2mm, en un camp de visió de 250mm i una matriu d'adquisició de 128x128. També es va realitzar una espectroscòpia localitzada de protó en substància blanca de la regió parieto-occipital amb una seqüència de polsos spin-eco 90°-180°-180° (TR 3000ms; TE 30ms; 80 adquisicions; 4 dummy scans) i es van adquirir 1024 punts.

11.5.2. Animals: Bruker Biospec (7T)

Els experiments 'in vivo' en animals es van realitzar en un espectròmetre Bruker Biospec® 70/30 (Bruker BioSpin GmbH, Karlsruhe, Alemanya) amb un imant horitzontal superconductor de 7.0T (Figura 11.6).

Per realitzar els estudis de ressonància es va fer servir una sonda de volum de 72mm de diàmetre intern pel procés d'excitació dels protons i el senyal de relaxació va ser adquirit mitjançant una sonda de superfície dissenyada pel cervell de la rata. Els programes utilitzats per a la realització d'aquests experiments van ser el Paravision v4.0 i el TopSpin.

El protocol d'experimentació que es va realitzar en cada sessió de RM consistia en l'obtenció d'imatges anatòmiques, l'espectre localitzat del cervell de la rata i imatges potenciades en T2 i difusió (tensor de difusió).

Les imatges anatòmiques es van adquirir utilitzant una seqüència RARE (TR/TE_{eff}/ETL 4000ms/36ms/8) en un pla axial (13 imatges), sagital (9 imatges) i coronal (6 imatges). Aquests plans ortogonals es van utilitzar com imatge de referència amb els següents paràmetres: gruix de la imatge de 1mm, una matriu d'adquisició de 256x256 mm i un camp de visió de 35mmx35mm.

Les imatges potenciades en T2 es van adquirir utilitzant una seqüència *multi-slice multi-echo* (TE/TR 10-120ms/2000ms) en 13 capes contínues amb 1mm de gruix, un matriu d'adquisició de 128x128 mm i un camp de visió de 35mmx35mm per obtenir els mapes de T2.

Les imatges del tensor de difusió (DTI) es van adquirir utilitzant una seqüència *echo-planar* (TR/TE/ Δ / δ 2000ms/35ms/20ms/4ms) amb una geometria idèntica al mapa de T2 en 20 direccions de difusió i 4 valors de b (rang 0-1000 s/mm²) per obtenir ADC.

L'espectre localitzat de protó es va obtenir mitjançant una seqüència PRESS precedida per una seqüència de supressió d'aigua (tipus VAPOR) en un mida de vòxel de 6.5mmx6.5mmx6.5mm amb els paràmetres següents: ample de banda espectral de 4000Hz, 4096 punts, TE 12 ms, TR 2500 ms i 64 promitjos. El vòxel es va

localitzar per sobre de la glàndula pituïtària fins al bulb olfatori i inclou substància blanca i substància gris (Figura 11.8).

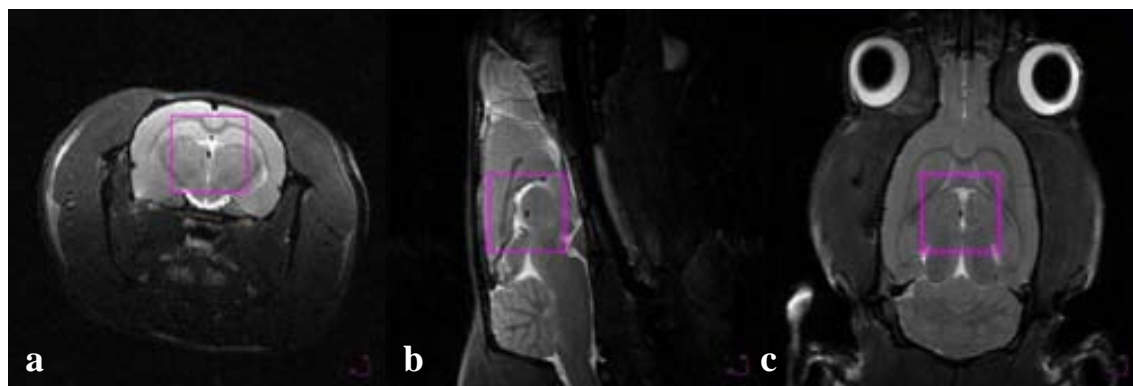


Figura 11.8. Localització de l'espectre al cervell de la rata en els diferents plans

- Metabonòmica: Bruker Avance

Els experiments 'ex vivo' es van realitzar en un espectròmetre Bruker AVANCE® de 400MHz (Bruker BioSpin GmbH, Karlsruhe, Alemanya) equipat amb un imant vertical superconductor de 9.4T (Figura 11.6). Per realitzar els estudis de ressonància es va fer servir una sonda invertida per a líquids de 5mm de diàmetre que es va sintonitzar per protó i carboni.

L'espectroscòpia de protó es va adquirir utilitzant una seqüència WaterGate, que és una seqüència clàssica 3_9_19 amb presaturació del pic de l'aigua, amb 64 adquisicions, 4 dummy scans i un ample de banda de 4006.41Hz a una temperatura de 303K i un angle de gir dels rotors de 20Hz.

Per fer l'adquisició de carboni es va utilitzar una seqüència de pols desacoblada amb temps de echo de 4s (32k), un temps de relaxació de 0,7s, 1024 adquisicions, 4 dummy scans i un ample de banda de 24038.46Hz a una temperatura de 303K.

11.6. Processament de Dades

El general per fer el processament de les imatges i els espectres es va utilitzar el software que per defecte tenia en cada maquina: NUMARIS4 software syngo version (Siemens, Erlangen, Alemanya) per Siemens; Paravision v.4 i Top Spin per Biospec (Bruker, Karlsruhe, Alemanya) i XWNNMR per AVANCE (Bruker, Karlsruhe, Alemanya). Però també es va utilitzar altres programes per realitzar el processament de les imatges i els espectres que a continuació detallarem.

11.6.1. Tensor de Difusió: Anàlisi Biexponencial

Per fer l'anàlisi biexponencial es va dissenyar un programa amb llenguatge C. El primer pas d'aquest programa consistia en fer un tractament del senyal de la imatge on es realitzava una interpolació de les imatges per augmentar la matriu fins a 128x128 punts mitjançant una funció segmentaria cúbica (tipus spline), es reduïa el soroll del senyal mitjançant l'ús d'un algoritme descrit per Gudbjartsson i Patz, i es feia una correcció de la distorsió entre les imatges de cada gradient de difusió i les imatges sense difusió mitjançant l'aplicació de l'algoritme simple de Nelder i Mead.

Després es van definir les regions que es volien analitzar, utilitzant el programa MRlcro (<http://www.sph.sc.edu/comd/rorden/micro.html>) en els mapes de fracció d'anisotropia obtingudes en l'estudi del tensor.

Un cop tractat el senyal, es va realitzar l'anàlisi del senyal utilitzant un ajust monoexponencial [Eq.1] i un ajust biexponencial [Eq.2] del senyal, en aquelles regions que s'havien seleccionat, utilitzant 11 valors de b (0-7500s/mm²) i 6 direccions no co-lineals.

$$S = S_0 \cdot e^{\sum_{i=1}^3 \sum_{j=1}^3 b_{ij} D_{ij}} \quad [\text{Eq.1}]$$

$$S = S_0^{fast} \cdot e^{\sum_{i=1}^3 \sum_{j=1}^3 b_{ij} D_{ij}^{fast}} + S_0^{slow} \cdot e^{\sum_{i=1}^3 \sum_{j=1}^3 b_{ij} D_{ij}^{slow}} \quad [\text{Eq.2}]$$

En ambdós ajustos S es el senyal de la intensitat que depenen dels valors de b , i per tant de la difusió, i S_0 és la intensitat de senyal en absència de difusió.

La diferència entre els dos ajustos és que en el biexponencial l'atenuació del senyal està repartit en dos components: un que constitueix una difusió més ràpida (fast) i un altre que mostra una difusió més lenta (slow). D'aquesta manera es pot estudiar dos moviments diferents que corresponen a una aigua en un entorn menys estructurat i per tant que es mou amb menys restriccions i una altra tipus d'aigua en un entorn més estructurat i per tant més lenta en moviments.

Utilitzant aquestes equacions es construeix un sistema d'equacions vectorials que mesuren la difusió de les molècules en varies direccions i que es van resoldre

mitjançant la implementació de Lourakis de l'algoritme optimitzat per Levenberg-Marquardt. Després d'obtenir el tensor de difusió es fa la diagonalització per tal d'obtenir els valors propis ($\lambda_1, \lambda_2, \lambda_3$) i els vectors propis ($\vec{\lambda}_1, \vec{\lambda}_2, \vec{\lambda}_3$) que serviran per calcular la fracció d'anisotropia [Eq.3] i la difusivitat mitja [Eq.4] de les regions estudiades. En l'anàlisi biexponencial s'obtidran els valors i els vectors propis, la fracció d'anisotropia i la difusivitat mitja per a cada component.

$$FA = \frac{1}{\sqrt{2}} \sqrt{\frac{(\lambda_1 - \lambda_2)^2 + (\lambda_2 - \lambda_3)^2 + (\lambda_1 - \lambda_3)^2}{\lambda_1^2 + \lambda_2^2 + \lambda_3^2}} \quad [Eq.3]; \quad MD = \frac{\lambda_1 + \lambda_2 + \lambda_3}{3} \quad [Eq.4]$$

11.6.2. Lesions en les imatges FLAIR: Anàlisi amb Jim

Per identificar les lesions observades en les imatges T2-FLAIR es va utilitzar les plaques de ressonància on es van localitzar les lesions focals en la substància blanca amb una mida mínima d'uns 3mm. Després es va mesurar l'àrea d'aquestes lesions utilitzant el programa Jim (version 5.0, Xinapse Systems Ltd, Northants, UK, www.xinapse.com).

11.6.3. Espectroscopia 'in vivo': Anàlisi amb LCModel

LCModel va ser el programa utilitzat per a quantificar els espectres 'in vivo' de pacients i de rates (105). Aquest programa aplica un algoritme per quantificar, de forma automàtica, els espectres de protó. Aquest algoritme el va desenvolupar i validar mitjançant estudis espectroscòpics en mostres de referència, cervell de rates i cervells de voluntaris sans i van demostrar que es podia utilitzar en espectres d'alta i baixa qualitat (106).

L'anàlisi de LCModel es basa en comparar els espectres 'in vivo' mitjançant un espectre de referència. Per fer aquest espectre de referència, el que es fa és realitzar o simular els espectres individuals de cada metabòlit en les mateixes condicions d'estudi (tipus d'imant, seqüència d'adquisició) i, mitjançant la combinació lineal de tots aquest espectres individuals, obtenir l'espectre de referència.

Al aplicar el programa en els espectres obtinguts s'obté la concentració de cada metabòlit i la relació de cada metabòlit respecte a creatina/fosfocreatina.

11.6.4. Metabonòmica: Anàlisi de components principals

La metabonòmica és una àrea que genera molta informació i això fa que l'anàlisi sigui complex. Les variables a estudiar són per una banda tots els punts de l'espectre i per l'altra tota aquella variable que es vulgui relacionar amb els metabòlits ja sigui altres variables bioquímiques, estats de la patologia o tractaments utilitzats. Això fa que s'hagi d'analitzar un gran nombre de variables per individu i per tant es necessari utilitzar una eina per l'anàlisi de multivariables com l'anàlisi de components principals. Aquest anàlisi redueix la dimensió de les dades amb la pèrdua mínima d'informació i és molt útil per obtenir models de predicció (107). Per fer aquest anàlisi es va utilitzar el programa SIMCA (Umetrics, Umea, Suècia)

L'anàlisi de components principals consisteix en fer una transformació lineal del conjunt de dades originals a un nou sistema de coordenades que depèn del nivell de variació entre les variables. D'aquesta manera, en el primer component principal es projectaran les dades amb màxima variància, en el segon component, ortogonal al primer, es projectaran les dades amb segona major variació i així successivament fins a definir tota la variància de les dades. Normalment es necessiten més de tres components per resumir la informació del conjunt de dades.

Els components principals depenen de la precisió (R^2X) que explica la variació de l'ajust i augmenta amb el nombre de components, i del poder predictiu del model (Q^2X) que incrementa fins a un valor màxim. Per tant, el nombre de components que defineix el model és un equilibri entre la qualitat de l'ajust i la capacitat de predicció. Generalment, s'agafa com a valor de precisió aquell que explicava el 95% de la variància de les dades. A més, en aquest tipus d'anàlisi podem avaluar el pes de cada variable original en cada component i això fa possible identificar algun tipus d'agrupació entre les variables.

L'avantatge d'utilitzar aquest tipus d'anàlisi és que permet fer una avaluació de les dades de forma no supervisada, és a dir, sense necessitat de tenir un coneixement previ de les dades. Tanmateix, es poden realitzar un anàlisi de supervisió com ara l'anàlisi discriminant a través de la predicció d'estructures latents utilitzant mínims quadrats parcials (PLS-DA). Aquest anàlisi permet distingir les diferències entre els

grups i per tant, requereix un coneixement previ dels grups de les mostres o classes per tal de desenvolupar el model de predicció (Figura 11.9).

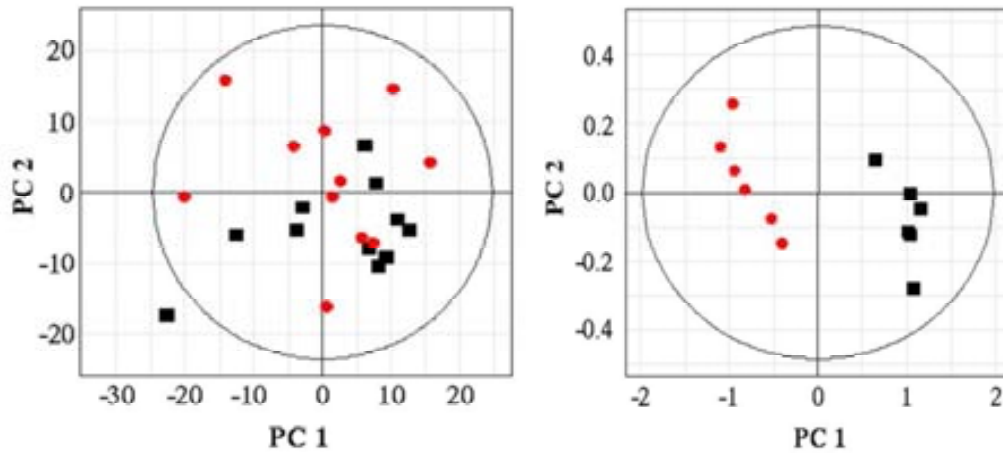


Figura 11.9 Anàlisi de components principals: no supervisat (esquerra) i anàlisi discriminant PLS-DA (dreta)

11.7. Anàlisi estadístic

El programa utilitzat per a fer l'anàlisi estadístic va ser el Sigma Stat. Es van utilitzar les proves paramètriques i no paramètriques comuns segons el tipus de comportament de les variables analitzades i es va considerar com a diferència significativa una $P < 0.050$.

ANNEX I

12. ANNEX I

Neuroimaging in ALF [Review]

Neurochemistry International 59 (2011) 1175–1180



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Neurochemistry International

journal homepage: www.elsevier.com/locate/nci



Review

Neuroimaging in acute liver failure

Laia Chavarria^{a,b,c}, Juli Alonso^{c,d}, Alex Rovira^d, Juan Córdoba^{a,b,c,*}

^a Servei de Medicina Interna-Hepatologia, Hospital Vall d'Hebron, Vall d'Hebron Institut of Research (VHIR), Barcelona, Spain

^b Departament de Medicina, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain

^c Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBEREHD), Barcelona, Spain

^d Servei de Resonància Magnètica (Institut de Diagnòstic per la Imatge), Departament de Radiologia, Hospital Vall d'Hebron, Barcelona, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 3 June 2011

Received in revised form 29 August 2011

Accepted 6 September 2011

Available online 14 September 2011

Keywords:

Hepatic encephalopathy

Magnetic resonance

Acute liver failure

ABSTRACT

Acute liver failure (ALF) is frequently complicated by the development of brain edema that can lead to intracranial hypertension and severe brain injury. Neuroimaging techniques allow a non-invasive assessment of brain tissue and cerebral hemodynamics by means of transcranial Doppler ultrasonography, magnetic resonance and nuclear imaging with radioligands. These methods have been very helpful to unravel the pathogenesis of this process and have been applied to patients and experimental models. They allow monitoring the outcome of patients with ALF and neurological manifestations. The increase in brain water can be detected by observing changes in brain volume and disturbances in diffusion weighted imaging. Neurometabolic changes are detected by magnetic resonance spectroscopy, which provides a pattern of abnormalities characterized by an increase in glutamine and a decrease in myo-inositol. Disturbances in cerebral blood flow are depicted by SPECT or PET and can be monitored and the bedside by assessing the characteristics of the waveform provided by transcranial Doppler ultrasonography. Neuroimaging methods, which are rapidly evolving, will undoubtedly lead to future diagnostic and therapeutic progress that could be very helpful for patients with ALF.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The development of new technologies that allow in vivo assessment of brain morphology and function have been crucial for a better understanding of the pathogenesis of a variety of neurological disorders. These methods include microscopic information using techniques such as confocal microscopy or biophotonic imaging; as well as morphological, physiological and functional information using transcranial Doppler (TCD), computed axial tomography (CT) or magnetic resonance (MR) or images provided by radioligands detected by positron emission tomography (PET) or single photon emission computed tomography (SPECT). These methods are being

progressively applied to investigate brain disturbances in acute liver failure (ALF). Most of the data currently originate of experimental models, which have benefit from the increasing availability of imaging resources for small animals. Studies in patients with ALF are scarce, because these patients are commonly in a critical condition, where neuroimaging investigations are difficult to perform. Extrapolation of the results in chronic liver failure patients with acute HE have been very helpful.

In this article we will review the data provided by different neuroimaging methods in patients and experimental models of ALF. Some data are controversial and have not been widely reproduced; differences among experimental models may explain part of the divergences. In spite of these caveats, the findings are discussed in relation to our current understanding of brain disturbances in ALF and how they may be helpful for future developments in the field.

2. Neuroimaging methods

2.1. Computed tomography (CT)

This a clinical fast technique that offers high-resolution images giving anatomical information related to bones, soft tissue and blood vessels to identify global abnormalities, in addition to

Abbreviations: ACLF, acute-on-chronic liver failure; ADC, apparent diffusion coefficient; ALF, acute liver failure; CBF, cerebral blood flow; Cho, choline compounds; CLF, chronic liver failure; CPP, cerebral perfusion pressure; Cr, creatine compounds; CT, computed tomography; FA, fractional anisotropy; Glx, glutamate and glutamine; HE, hepatic encephalopathy; ICP, intracranial pressure; MD, mean diffusivity; mIns, myo-inositol; MR, magnetic resonance; MRL, magnetic resonance imaging; MRS, magnetic resonance spectroscopy; NAA, N-acetylaspartate; PET, positron emission tomography; SPECT, single photon emission computed tomography; TCD, transcranial Doppler.

* Corresponding author at: Servei de Medicina Interna-Hepatologia, Hospital Vall d'Hebron, Paseo Vall d'Hebron 119, Barcelona 08035, Spain.

E-mail addresses: laia.chavarria@vhir.org (L. Chavarria), juli.alonso@idi-cat.org (J. Alonso), alex.rovira@idi-cat.org (A. Rovira), jcordoba@vhebron.net (J. Córdoba).

0197-0186/\$ - see front matter © 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

doi:10.1016/j.neuint.2011.09.003

outlining of organs or tumors with the administration of iodized contrast agents. The major value of CT is that is easy available and is a fast method to investigate changes in brain structure. During the procedure, it is possible to monitor the clinical status of the patient, better than during MR. For these reasons, CT is very useful for the diagnosis of intracranial complications, such as cerebral bleeding or cerebral herniation (Kumamoto et al., 2009). However, CT is less sensitive than MR to detect mild to moderate brain edema and does not allow the performing of additional techniques to investigate biochemical or functional abnormalities.

2.2. Magnetic resonance (MR)

MR is based on a property of the nuclei of certain atoms (most usual isotopes are ^1H , ^{31}P , ^{23}Na , ^{13}C), which absorb the energy at a selective radiofrequency under very powerful magnetic fields. Release of this excess of energy induces an electrical signal that, properly processed, will yield an image (magnetic resonance imaging, MRI) or a spectrum that enables metabolic analysis of a tissue (magnetic resonance spectroscopy, MRS). Since MR is sensitive to a high number of nuclei physicochemical properties, it is able to give interesting morphological and physiological information as well as in vivo metabolism. Morphological information is obtained mainly from T1-, proton density- and T2-weighted images.

Diffusion imaging is a variant of MRI that is sensitive to the restriction of local water diffusion. It offers quantitative information of water motion (apparent diffusion coefficient, ADC, or mean diffusivity, MD) and structural integrity (fractional anisotropy, FA). Diffusion studies are also capable of detecting damage to neuronal tracts, because the damage affects the diffusion of water along the axonal tracts. This damage is reflected in FA. Moreover, MR allows the assessment of changes in local blood flow and haemoglobin oxygenation by functional MRI and provides mapping of the functional centers of the human brain. In patients with chronic liver failure, MR has been applied in an important number of studies. One of the most characteristic findings is a high signal on T1-weighted images in the globus pallidus that can spread to other nuclei (Rovira et al., 2008) and has been attributed to manganese accumulation secondary to portal-systemic shunting (Rose et al., 1999). The process of manganese accumulation is slow and relates to the development of Parkinsonism (bradykinesia-rigidity). For this reason is usually not seen in ALF. However, one report describes high T1 signal and reversible Parkinsonism in one patient that developed ALF secondary to hepatitis E (Aggarwal et al., 2006).

MRS is an analytical technique to determine metabolic compounds of different biological tissues that is used to identify metabolic patterns of some disorders. Changes in the brain spectrum are typical from some disorders, such as hepatic encephalopathy (HE) (Kreis et al., 1992). Some of the metabolites of the spectrum that can be easily identified in the spectrum of healthy brain are N-acetylaspartate (NAA), glutamate and glutamine, creatine and phosphocreatine (Cr), choline-containing compounds (Cho), myo-inositol (mIns). However, it is important to note that glutamine (one of the metabolites implicated in ALF) shows a peak that cannot be separated easily from glutamate with the 1.5–3 Tesla MR systems. For this reason, glutamine and glutamate are usually grouped and referred as Glx. Several methods have been applied for quantifying the changes in the peaks of the spectrum; the most widely applied is the comparison of the peak of interest to the peak of creatine.

2.3. Nuclear imaging techniques

These techniques consist of assessing the signal generated by radioisotopes that are administered intravenously with PET or SPECT. The radioisotopes are linked to molecules, such as

deoxyglucose, which allows following the metabolism of these compounds and obtain functional and metabolic information of the brain. The most relevant limitations are the spatial resolution that are capable to generate and the lack of information about the anatomical structures and the detected metabolic data.

PET gives quantitative data of isotope distribution (nCi/mL); the main isotopes used to study brain function are ^{15}O , ^{13}N , ^{11}C , and ^{18}F . In contrast, SPECT provides only relative measurements of the radioactivity (counts/mL) and uses uncommon biological elements such as $^{99\text{m}}\text{Tc}$. However, SPECT is more easily available and less expensive than PET. One recent application is bimodal imaging that combines the anatomical images of CT or MR with functional images of PET. Examples of the use of this methodology are the ^{13}N -ammonia PET studies that have been performed to investigate brain ammonia metabolism in cirrhosis. These studies have shown that intracellular metabolism of ammonia increases in patients with cirrhosis and overt HE, which is in accordance to the important role of ammonia in the pathogenesis of HE (Iversen et al., 2009). ^{13}N -ammonia PET studies have not been undertaken in patients with ALF.

2.4. Transcranial Doppler (TCD)

TCD is a noninvasive device which can continuously measure cerebral blood flow velocity (CBF), producing a velocity-time waveform that indirectly monitors changes in cerebral hemodynamics, including intracranial pressure (ICP). In addition, TCD avoids the risks of hemorrhage and infection that are associated with ICP monitors. Blood flow velocity is recorded by emitting a high-pitched sound wave from the ultrasound probe. The speed of the blood in relation to the probe causes a phase shift. TCD does not allow assessment of CBF, because the velocity of blood depends on the diameter of that vessel that is variable, but is useful to estimate relative changes in flow and has become part of the monitoring armamentarium in neurocritical units. By assessing the velocity-time waveform it is possible to indirectly monitor changes in cerebral hemodynamics, such as ICP and cerebral perfusion pressure (CPP). The waveform has two phases namely a systolic double peak and a diastolic depression. The morphology is affected by cerebral hypertension and parallel changes in CPP (Aggarwal et al., 2008).

2.5. The brain in acute liver failure

The hallmark of ALF is the development of a decrease in consciousness that is attributed to an insufficient liver function. This situation that is identified as HE is different from a series of disturbances that are common in ALF and that may impact directly on brain function, such as hypoglycemia or sepsis. The mechanisms that generate HE in ALF are in many ways similar to those present in chronic liver failure. Liver failure impairs several metabolic pathways and increases plasma levels of substances, such as ammonia, which is considered a key factor in HE. Other features of major pathophysiological importance are the activation of a systemic inflammatory response, circulatory dysfunction and failure of other organs that can cause directly disturbances to brain function. These disturbances induce brain edema, which has an important role in ALF, cause neurometabolic changes and impact on CBF and neuroenergetics.

2.6. Brain edema in ALF

Traditionally, intracranial hypertension secondary to brain edema was considered the main cause of death in ALF (Jalan et al., 2004). Improvements in the intensive care management of patients with ALF have been associated with a decrease in the frequency of this complication that nowadays is responsible of death in less

than 25% of patients (Wendon et al., 2010). The increment of cerebral water content in ALF has been clearly documented in different experimental models and several species with different methods (Cauli et al., 2011; Chatauret et al., 2003; Chavarria et al., 2010; Zwingmann et al., 2003, 2004). Assessing brain edema in humans is difficult, due to the difficulty of studying critically-ill patients and to the low sensitivity of clinically available neuroimaging methods. One aspect that is important to separate is brain edema (an increase of the amount of water in brain parenchyma) from intracranial hypertension, which requires invasive monitoring catheters. Brain edema leads to an increase in brain volume, which can cause a rise of the pressure inside a rigid skull if it is not mitigated by a compensatory decrease in the volume of other compartments (such as cerebrospinal fluid or cerebral blood volume). Furthermore, intracranial hypertension may be exacerbated by sudden rises in cerebral blood volume, secondary to vasodilatation.

CT and standard MR may reveal changes in the volume of brain, such a decrease in the size of ventricles, ingurgitation of brain convolutions and attenuation of the signal intensity of brain parenchyma. However, mild to moderate accumulation of water may not become apparent as shown in studies in patients with chronic liver failure. Patients with cirrhosis exhibit mild chronic edema that can be demonstrated indirectly with magnetization transfer ratio (Rovira et al., 2001). Studies comparing the brain of patients before and after liver transplantation show an increase in the size of the ventricles and a decrease in white matter lesions that are compatible with resolution of mild edema after liver transplantation (Garcia-Martinez et al., 2010). The increase in brain water has been confirmed with water quantification maps, a sophisticated method of MR that measures directly the amount of water in the tissue (Shah et al., 2008).

Brain edema can be secondary to a cytotoxic mechanism that causes an increase of water inside the cell (generally the astrocyte), such as hypoxia or hyponatremia. Alternatively, brain edema can be caused by an increase in the flow of water that crosses the blood–brain barrier and accumulates in the interstitial compartment (vasogenic edema), such as edema secondary to brain tumors (Fig. 1). MR diffusion techniques are able to distinguish changes in the distribution of water between the intracellular and the extracellular compartment (Schwarcz et al., 2007; Sevicik et al., 1992). An increase in the ADC can be interpreted as an increase in the amount of water in the extracellular compartment, while a decrease as a rise in the intracellular compartment.

Diffusion weighted studies in experimental models, have shown signs consistent with cytotoxic edema in rats with ALF secondary to devascularization or to the administration of galactosamine (Cauli et al., 2011; Chavarria et al., 2010). In both studies, the

progression to coma was associated with an increase in the amount of brain water and a decrease in ADC (Fig. 2). These findings are consistent with the observation in astrocyte cultures, in which the exposure to ammonia results in cell swelling. In addition, experimental models of ALF show normal permeability of BBB to small molecules (Chavarria et al., 2010). However, some studies have found regional differences in ADC, and it has been proposed that cytotoxic and vasogenic edema may coexist and affect different regions of the central nervous system. One study in the galactosamine model has shown an increase in ADC in the cerebellum associated with an increase in the permeability to Evans Blue, supporting breakdown of the blood–brain barrier (Cauli et al., 2011). Similarly, in a rat model of acute ammonia infusion there were different results depending on the studied brain area, some areas exhibited a decrease in T1 and T2 relaxation times while others an increase in ADC (Cauli et al., 2007). A comprehensive review of blood–brain barrier integrity and function in experimental and human ALF has been recently published (Nguyen et al., this issue).

In patients with ALF, diffusion weighted imaging have found signs consistent with cytotoxic edema (Rai et al., 2008; Ranjan et al., 2005; Saksena et al., 2008; Saraswat et al., 2008). The ADC or the mean diffusivity (MD) (indexes of water movement), have been found decreased in four studies (Table 1). As in some experimental preparations (Chavarria et al., 2010), these changes were not reflected in T2-weighted images (Table 2). However, according to one study using diffusion tensor imaging, a mixed pattern may also be present. In that study, the spherical isotropy increased in association with changes in the fractional anisotropy that was probably due to the dilution effect caused by the rise in extracellular water content (Rai et al., 2008).

According to clinical observations, the normalization of brain edema may be a slow process. In one study in ALF patients that repeated diffusion tensor imaging at 3 weeks, when patients exhibited a complete clinical recovery, MR parameters were still abnormal (Rai et al., 2008). Similarly, the administration of mannitol to five patients with raised intracranial pressure was not followed by any effect on brain edema determined by diffusion tensor imaging acquired 45 minutes after completing the mannitol injection (Saraswat et al., 2008).

The results of diffusion weighted imaging in ALF are opposite to those obtained in chronic liver failure, where ADC is increased (Rovira et al., 2008) and T2-weighted images show focused hyperintensities. However, a mixed pattern may also be present in this situation. A biexponential analysis of diffusion images suggests the coexistence of interstitial and intracellular edema. One explanation to these apparently divergent findings is the predominance

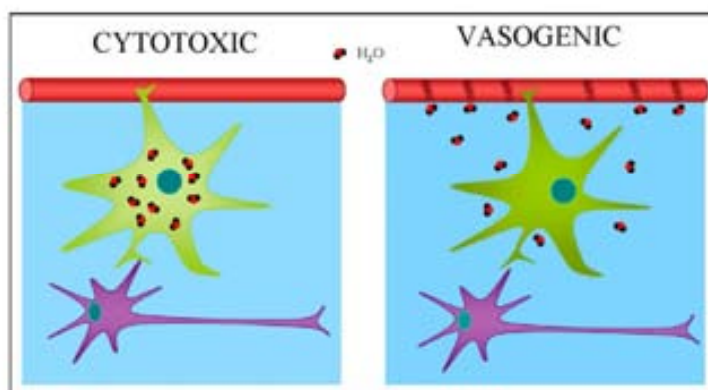


Fig. 1. Schema of brain edema mechanisms: cytotoxic (the rise of intracellular water) and vasogenic (the rise of interstitial water).

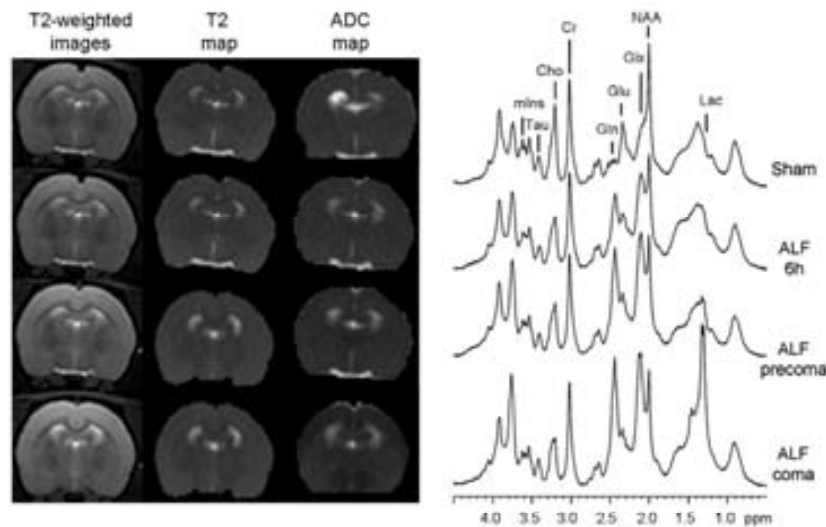


Fig. 2. RM experimental: T2-weighted images, T2 maps, ADC maps and ^1H spectra of sham and ALF rat brains at 6 h after hepatic artery ligation (ALF 6 h), at precoma and coma stages. Metabolites: Cho, choline derivatives; Cr, creatine; Glx, glutamine + glutamate; Gln, glutamine; Glu, glutamate; Lac, lactate; mIns, myo-inositol; NAA, N-acetylaspartate; Tau, taurine.

Table 1
Clinical studies of MR.

Human RM studies	Demographical characteristics				Etiology	MRI			MRS			
	Subjects	n	Gender (M/F)	Age (years)		T2WI	ADC/MD	FA	CS	↑ ratio	↓ ratio	≈ ratio
Ranjan et al. (2005)	ALF	7	4/3	6–35	3HEV, 1HAV, 2ATT, 1 unknow	≈	↓					
Rai et al. (2008)	ALF	20	7/13	14–25	11HEV, 2HBV, 5HAV, 2ATT		↓	↑ ↓ ↓*	↓			
	controls	15	7/8	18–48								
Saraswat et al. (2008)	ALF	5	3/2	14–46	3HEV, 2HBV		↓			Glx	Cho	mIns
	controls	5	3/2	18–50						Gln		NAA
Saksena et al. (2008)	ALF	10	5/5	15–49	4HEV, 4HBV, 1HAV, 1ATT		↓	↓		Glx	Cho	mIns
	controls	10	4/6	18–50						Gln		NAA
Verma et al. (2008)	ALF	10	5/5	15–49	5HBV, 1HCV, 1ATT					Glx	Cho	mIns
	controls	10	4/6	18–50								NAA
Sijens et al. (2008)	ALF	5	4/1	0–11	2cholangitis, 2virus infection,					Glx		
	no ALF	5	3/2	0–11	1hepatopulmonar					Lac		

Etiologies: ATT, antitubercular therapy; HAV, hepatitis A virus; HBV, hepatitis B virus; HCV, hepatitis C viruses; HEV, hepatitis E virus.

MRI: T2WI, T2-weighted images; ADC, apparent diffusion coefficient; MD, mean diffusivity; FA, fractional anisotropy; CS, spherical isotropy.

MRS: ratio is made versus creatine. Cho, choline compounds; Glx, glutamine and glutamate; Gln, glutamine; Lac, lactate; mIns, myo-inositol; NAA, N-acetylaspartate.

* Changes depend on the studied region.

of cytotoxic mechanisms in the acute setting, probably in relation to an abrupt exposure to ammonia, and vasogenic mechanisms in the chronic situation, possible secondary to inflammatory mediators affecting the function of tight junctions (Nguyen et al., 2006).

3. Brain metabolism

Several brain metabolites may be determined non-invasively *in vivo* applying brain ^1H -spectroscopy. Liver failure is associated with a characteristic pattern that includes an increase in the peaks that correspond to glutamine and a decrease of the peaks that are associated to choline containing compounds (Saksena et al., 2008; Saraswat et al., 2008; Sijens et al., 2008; Verma et al., 2008) (Table 1). In addition, they may be some differences between acute and chronic liver failure. Verma and colleagues performed an *in vivo* MRS study to revise divergences between ALF, acute-on-chronic liver failure (ACLF) and chronic liver failure (CLF). They showed a significant increase in Glx/Cr according to the severity

(ALF > ACLF > CLF > controls) and a reduction of Cho/Cr, without any significant differences between ALF, ACLF and CLF. NAA/Cr and mIns/Cr did not change compared to controls values in ALF patients while decreased in ACLF and CLF patients (Verma et al., 2008).

The best explanation for the changes in MR-spectroscopy is that correspond to the effects of ammonia metabolism in the brain, where ammonia is metabolized to glutamine. The drop in choline and myo-inositol is usually understood as an osmotic compensatory response to the intracellular increase in glutamine and water. The differences in myo-inositol between the acute and chronic situation could account for the slow regulatory process that involves myo-inositol (Cordoba et al., 1996). In general, NAA is considered a neuronal marker that is not affected unless the presence of some degree of neurodegeneration and brain atrophy (García-Martínez et al., 2011).

Many studies have been performed in experimental models to evaluate brain metabolism using ^1H , ^{13}C and ^{31}P spectroscopy

Table 2
Experimental studies of MR.

Experimental studies	Animal model	n	MRI			MRS		Brain			Treatment
			T1WI	T2WI	ADC MD	atom	↑ ratio ↓ ratio	CBF	ICP	Edema BBB	
Cauli et al. (2011)	GalN	6–8			↑ ↓	¹ H	Glx Lac		↑ ↑ ↑ ↑		
Cauli et al. (2007)	Ammonia infusion	7	↓	↓	↑ ↓	¹ H	mlns			MK 801 prevent T1WI, T2WI changes	
Chavarria et al. (2010)	PCA + HAL	6		≈	↑ ↓	¹ H	Glx, Gln [§] , His [§] , Ala [§]	mlns, Cho, Glu		↑ ≈	
Barba et al. (2008)		6			↑ ↓	¹ H	Gln [§] , His [§] , Ala [§]	NAA [§] , Tau [§] , mlns [§] , Cr [§]			Hypothermia prevents metabolic alterations
Zwingmann et al. (2004)		8–10			↑ ↓	¹ H	Gln	mlns, Tau		↑	Hypothermia prevents edema, HE and metabolic alterations (except Gln)
Zwingmann et al. (2003)		4–8			↑ ↓	¹ H ¹³ C	Gln, Lac, Ala	Glu, Asp, NAA		↑	
Chatauret et al. (2003)		8			↑ ↓	¹ H ¹³ C	Gln, Lac, Ala	Glu, Asp, NAA		↑	Hypothermia prevents edema, HE and metabolic alterations (except Gln)

Animal models: GalN, galactosamine injection; PCA, portocava anastomosis; HAL, hepatic artery ligation.

MRI: T1WI, T1-weighted images; T2WI, T2-weighted images; ADC, apparent diffusion coefficient; MD, mean diffusivity.

MRS: ratio is made versus creatine (Cr). §, absolute quantification of metabolites. Ala, alanine; Cho, choline derivatives; Glx, glutamine and glutamate; Gln, glutamine; Glu, glutamate; His, histidine; Lac, lactate; mlns, *myo*-inositol; NAA, N-acetylaspartate; Tau, taurine.

[§] Changes depend on the studied region.

(Table 2). In addition of corroborating the disturbances described in humans, a common finding is signs of disturbed energy metabolism (Barba et al., 2008). The most conspicuous disturbance is an increase of lactate in brain tissue, which has also been demonstrated in patients with ALF using a brain microdialysis system in the interstitial fluid (Tofteng et al., 2002). The increase in brain lactate, which has not been demonstrated in CLF, is most apparent in the advanced stages of HE.

In vivo studies have confirmed the increase of lactate at late stages of ALF (Chavarria et al., 2010) (Fig. 2). The origin of this increase appears to be 'de novo' synthesis as could be corroborated by ¹³C-spectroscopy after the injection of U-¹³C-glucose (Zwingmann et al., 2003). Lactate is a substrate produced by the anaerobic via of glucose metabolism and classically, was defined as a biomarker of mitochondrial impairment. However, recent studies proposed astrocytic lactate as a precursor of neuronal pyruvate (Pellerin et al., 2007) that may be stimulated by enhancement of the glutamine synthesis due to ammonia uptake.

4. Cerebral blood flow

CBF in ALF is a dynamic process that is affected by multiple factors and that has major impact on the viability of brain tissue. In normal conditions, CBF remains stable in spite of changes in CPP (the difference between mean arterial pressure and ICP) due to compensatory changes in the diameter of cerebral arterioles. This process, which is known as autoregulation, has been shown to become impaired in liver failure and in hyperammonemia (Larsen et al., 2000). The variations in CBF in ALF have been proposed to develop in a pattern that includes five phases: (1) low CBF (secondary to a decrease in cerebral metabolic rate of oxygen) and normal ICP; (2) high CBF (probably secondary to loss of autoregulation) and normal ICP; (3) high CBF (probably secondary to brain energetic failure) and high ICP (enhanced by the increase in cerebral blood volume); (4) low CBF (secondary to low CPP) and high ICP; and (5) brain death (the consequence of high ICP and insufficient CPP). This model assumes that the CBF changes precede and contribute to an elevated ICP and brain swelling and is supported by the results of a retrospective study in 26 patients (Aggarwal et al., 2005).

Since, CBF is so variable, it is of help to have systems to monitor CBF and associated changes in cerebral hemodynamics. TCD has

been shown to be of help in this situation. In a retrospective study in 16 patients with ALF that underwent simultaneous monitoring of intracranial pressure identified several features of the waveform obtained by TCD predicted CPP and ICP (Aggarwal et al., 2008). Similar encouraging findings have been reported in short observational series. An additional method that may help to monitor the consequences of insufficient CBF in brain tissue is the assessment of tissue oxygenation by near-infrared spectrophotometry (Nielsen et al., 2003). The role of non-invasive monitoring of cerebral hemodynamics in ALF is not fully established (Bindi et al., 2008). However, it may be of help in guiding therapeutic interventions, such as mechanical hyperventilation (Strauss et al., 2000), perfusion of noradrenaline (Nielsen et al., 2003) or moderate hypothermia (Jalan et al., 2004).

5. Conclusion

Neuroimaging technologies are appropriate and valuable for the monitoring of ALF complications such as CBF by TCD, brain edema evolution by diffusion technologies and brain metabolism by spectroscopy or nuclear imaging. These technologies are in continuous evolution; a better understanding of biophysics and neurophysiology basis of these technologies help to understand the pathogenesis of brain disturbances in ALF and will lead to new ways of diagnosing and monitoring the effects of new treatments.

Financial support

CIBEREHD is supported by Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain. The studies that generated some of the data of the article were obtained with the support of grants from the Spanish Ministry of Health (FIS PI080698 and PI070641).

References

- Aggarwal, A., Vaidya, S., Shah, S., Singh, J., Desai, S., Bhatt, M., 2006. Reversible Parkinsonism and T1W pallidal hyperintensities in acute liver failure. *Mov. Disord.* 21, 1986–1990.
- Aggarwal, S., Brooks, D.M., Kang, Y., Linden, P.K., Patzer, J.F., 2008. Noninvasive monitoring of cerebral perfusion pressure in patients with acute liver failure using transcranial doppler ultrasonography. *Liver Transpl.* 14, 1048–1057.
- Aggarwal, S., Obrist, W., Yonas, H., Kramer, D., Kang, Y., Scott, V., Planinsic, R., 2005. Cerebral hemodynamic and metabolic profiles in fulminant hepatic failure: relationship to outcome. *Liver Transpl.* 11, 1353–1360.

- Barba, I., Chatauret, N., García-Dorado, D., Córdoba, J., 2008. A 1H nuclear magnetic resonance-based metabolomic approach for grading hepatic encephalopathy and monitoring the effects of therapeutic hypothermia in rats. *Liver Int.* 28, 1141–1148.
- Bindi, M.L., Biancofiore, G., Esposito, M., Meacci, L., Biosa, M., Mozzo, R., Urbani, L., Catalano, G., Montin, U., Filippini, F., 2008. Transcranial doppler sonography is useful for the decision-making at the point of care in patients with acute hepatic failure: a single centre's experience. *J. Clin. Monit. Comput.* 22, 449–452.
- Cauli, O., Lopez-Larrubia, P., Rodrigo, R., Agusti, A., Boix, J., Nieto-Charques, L., Cerdán, S., Felipo, V., 2011. Brain region-selective mechanisms contribute to the progression of cerebral alterations in acute liver failure in rats. *Gastroenterology* 140, 638–645.
- Cauli, O., Lopez-Larrubia, P., Rodrigues, T.B., Cerdán, S., Felipo, V., 2007. Magnetic resonance analysis of the effects of acute ammonia intoxication on rat brain. *J. Neurochem.* 103, 1334–1343.
- Chatauret, N., Zwingsmann, C., Rose, C., Leibfritz, D., Butterworth, R.F., 2003. Effects of hypothermia on brain glucose metabolism in acute liver failure: a ¹H/¹³C-nuclear magnetic resonance study. *Gastroenterology* 125, 815–824.
- Chavarria, L., Oria, M., Romero-Gimenez, J., Alonso, J., Lope-Piedrafita, S., Córdoba, J., 2010. Diffusion tensor imaging supports the cytotoxic origin of brain edema in a rat model of acute liver failure. *Gastroenterology* 138, 1566–1573.
- Córdoba, J., Gottstein, J., Blei, A.T., 1996. Glutamine, myo-inositol, and organic brain osmolytes after portocaval anastomosis in the rat: implications for ammonia-induced brain edema. *Hepatology* 24, 919–923.
- García-Martínez, R., Rovira, A., Alonso, J., Aymerich, F.X., Huerfano, E., Jacas, C., Simon-Talero, M., Vargas, V., Córdoba, J., 2010. A long-term study of changes in the volume of brain ventricles and white matter lesions after successful liver transplantation. *Transplantation* 89, 589–594.
- García-Martínez, R., Rovira, A., Alonso, J., Jacas, C., Simon-Talero, M., Chavarria, L., Vargas, V., Córdoba, J., 2011. Hepatic encephalopathy is associated with posttransplant cognitive function and brain volume. *Liver Transpl.* 17, 38–46.
- Iversen, P., Sorensen, M., Bak, L.K., Waagepetersen, H.S., Vafae, M.S., Borghammer, P., Mouridsen, K., Jensen, S.B., Vilstrup, H., Schousboe, A., Ott, P., Gjedde, A., Keiding, S., 2009. Low cerebral oxygen consumption and blood flow in patients with cirrhosis and an acute episode of hepatic encephalopathy. *Gastroenterology* 136, 863–871.
- Jalan, R., Olde Damink, S.W., Deutz, N.E., Hayes, P.C., Lee, A., 2004. Moderate hypothermia in patients with acute liver failure and uncontrolled intracranial hypertension. *Gastroenterology* 127, 1338–1346.
- Kreis, R., Ross, B.D., Farrow, N.A., Ackerman, Z., 1992. Metabolic disorders of the brain in chronic hepatic encephalopathy detected with H-1 MR spectroscopy. *Radiology* 182, 19–27.
- Kumamoto, T., Takeda, K., Ishibe, A., Morioka, D., Matsuo, K., Tanaka, K., Endo, I., Sekido, H., Togo, S., Shimada, H., 2009. Complete neurological recovery from fulminant hepatic failure with subarachnoid hemorrhage by living donor liver transplantation: a case report. *Transplant. Proc.* 41, 1982–1986.
- Larsen, F.S., Strauss, G., Møller, K., Hansen, B.A., 2000. Regional cerebral blood flow autoregulation in patients with fulminant hepatic failure. *Liver Transpl.* 6, 795–800.
- Nguyen, J.H., Yamamoto, S., Steers, J., Sevelier, D., Lin, W., Shimogima, N., Castaneda-Casey, M., Genco, P., Golde, T., Richelson, E., Dickson, D., McKinney, M., Eckman, C.B., 2006. Matrix metalloproteinase-9 contributes to brain extravasation and edema in fulminant hepatic failure mice. *J. Hepatol.* 44, 1105–1114.
- Nielsen, H.B., Tofteng, F., Wang, L.P., Larsen, F.S., 2003. Cerebral oxygenation determined by near-infrared spectrophotometry in patients with fulminant hepatic failure. *J. Hepatol.* 38, 188–192.
- Pellerin, L., Bouzier-Sore, A.K., Aubert, A., Serres, S., Merle, M., Costalat, R., Magistretti, P.J., 2007. Activity-dependent regulation of energy metabolism by astrocytes: an update. *Glia* 55, 1251–1262.
- Rai, V., Nath, K., Saraswat, V.A., Purwar, A., Rathore, R.K., Gupta, R.K., 2008. Measurement of cytotoxic and interstitial components of cerebral edema in acute hepatic failure by diffusion tensor imaging. *J. Magn. Reson. Imaging* 28, 334–341.
- Ranjan, P., Mishra, A.M., Kale, R., Saraswat, V.A., Gupta, R.K., 2005. Cytotoxic edema is responsible for raised intracranial pressure in fulminant hepatic failure: in vivo demonstration using diffusion-weighted MRI in human subjects. *Metab. Brain Dis.* 20, 181–192.
- Rose, C., Butterworth, R.F., Zayed, J., Noormandin, L., Todd, K., Michalak, A., Spahr, L., Huet, P.M., Pomier-Layrargues, G., 1999. Manganese deposition in basal ganglia structures results from both portal-systemic shunting and liver dysfunction. *Gastroenterology* 117, 640–644.
- Rovira, A., Alonso, J., Córdoba, J., 2008. MR imaging findings in hepatic encephalopathy. *AJNR Am. J. Neuroradiol.* 29, 1612–1621.
- Rovira, A., Grive, E., Pedraza, S., Rovira, A., Alonso, J., 2001. Magnetization transfer ratio values and proton MR spectroscopy of normal-appearing cerebral white matter in patients with liver cirrhosis. *AJNR Am. J. Neuroradiol.* 22, 1137–1142.
- Saksena, S., Rai, V., Saraswat, V.A., Rathore, R.S., Purwar, A., Kumar, M., Thomas, M.A., Gupta, R.K., 2008. Cerebral diffusion tensor imaging and in vivo proton magnetic resonance spectroscopy in patients with fulminant hepatic failure. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 23, e111–e119.
- Saraswat, V.A., Saksena, S., Nath, K., Mandal, P., Singh, J., Thomas, M.A., Rathore, R.S., Gupta, R.K., 2008. Evaluation of mannitol effect in patients with acute hepatic failure and acute-on-chronic liver failure using conventional MRI, diffusion tensor imaging and in-vivo proton MR spectroscopy. *World J. Gastroenterol.* 14, 4168–4178.
- Schwarz, A., Ursprung, Z., Berente, Z., Bogner, P., Kotek, G., Meric, P., Gillet, B., Beloeil, J.C., Doczi, T., 2007. In vivo brain edema classification: new insight offered by large b-value diffusion-weighted MR imaging. *J. Magn. Reson. Imaging* 25, 26–31.
- Sevick, R.J., Kanda, F., Mintoovitch, J., Arief, A.I., Kucharczyk, J., Tsuruda, J.S., Norman, D., Moseley, M.E., 1992. Cytotoxic brain edema: assessment with diffusion-weighted MR imaging. *Radiology* 185, 687–690.
- Shah, N.J., Neeb, H., Kircheis, G., Engels, P., Haussinger, D., Zilles, K., 2008. Quantitative cerebral water content mapping in hepatic encephalopathy. *Neuroimage* 41, 706–717.
- Sijens, P.E., Alkefaji, H., Lumsing, R.J., van Spronsen, F.J., Meiners, L.C., Oudkerk, M., Verkade, H.J., 2008. Quantitative multivoxel 1H MR spectroscopy of the brain in children with acute liver failure. *Eur. Radiol.* 18, 2601–2609.
- Strauss, G.L., Hansen, B.A., Herzog, T., Larsen, F.S., 2000. Cerebral autoregulation in patients with end-stage liver disease. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 12, 767–771.
- Tofteng, F., Jørgensen, L., Hansen, B.A., Ott, P., Kondrup, J., Larsen, F.S., 2002. Cerebral microdialysis in patients with fulminant hepatic failure. *Hepatology* 36, 1333–1340.
- Verma, A., Saraswat, V.A., Radha, K.Y., Nath, K., Thomas, M.A., Gupta, R.K., 2008. In vivo 1H magnetic resonance spectroscopy-derived metabolite variations between acute-on-chronic liver failure and acute liver failure. *Liver Int.* 28, 1095–1103.
- Wendon, J., Manns, M., Alexander, G., Aldersley, M., Burroughs, A., Simpson, K., Mulimer, D., Nevens, F., Bernal, W., Lartere, P.-F., Ilan, Y., Hudson, M., Stolze-Larsen, F., Saliba, F., Arroyo, V., Murphy, N., Lalazar, G., O'Brien, J., Hadem, J., Samuel, D., 2010. Acute liver failure: current European perspective, 52 ed., p. 513.
- Zwingsmann, C., Chatauret, N., Leibfritz, D., Butterworth, R.F., 2003. Selective increase of brain lactate synthesis in experimental acute liver failure: results of a [¹H-¹³C] nuclear magnetic resonance study. *Hepatology* 37, 420–428.
- Zwingsmann, C., Chatauret, N., Rose, C., Leibfritz, D., Butterworth, R.F., 2004. Selective alterations of brain osmolytes in acute liver failure: protective effect of mild hypothermia. *Brain Res.* 999, 118–123.

ANNEX II

13. ANNEX II

Metabonomic Analysis in Liver Diseases

Laia Chavarria,^{1,2,3} Ignasi Barba,⁴ * Juan Córdoba^{1,2,3}

¹Liver Unit, Hospital Vall Hebron, Barcelona Spain, ²Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBEREHD), Instituto de Salud Carlos III, Madrid Spain, ³Departament Medicina. Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Spain, ⁴Cardiology Unit, Hospital Vall Hebron, Barcelona Spain

Abstract: Metabonomics is a new technology that provides rapid, accurate and precise analysis of a large number of metabolites in biological systems. Using multivariate analysis and pattern recognition, it provides a direct unbiased measure of biochemical consequences of a pathology or a drug treatment. The integration of the all ‘omics’ information (genomics, transcriptomics, proteomics and metabonomics) can provide knowledge for better understanding of biological systems and may lead to the generation of new mechanistic hypotheses to explain the development of pathologies. In this chapter, we will give an overview of the basic principles of this new technology and provide examples of applications in liver diseases.

TABLE 1. Definitions of terms used in metabolomics analysis

Term	Definition
Metabolomics	Identification and quantification of all metabolites in a biological system
Metabolomic profiling	Identification and quantification of metabolites implied in a biological pathway
Metabolomic fingerprinting	A global analysis that provides a classification model
Metabolic footprinting	A specific analysis of secreted/excreted metabolites by an organism
Metabolic target analysis	Analysis of metabolites related to a specific reaction
Metabonomics	Analysis of metabolites in response to pathophysiological stimuli (disease or therapeutic treatment) or genetic modification
Lipidomics	Analysis of all lipids and molecules that interact with them

INTRODUCTION

The availability of complete genome sequences has led to the development of new ‘omics’ technologies including transcriptomics, proteomics and metabolomics. These technologies provide useful information for the investigation of new diagnostic biomarkers and for the evaluation of disease progression and therapeutic effectiveness. Moreover, it may lead to generation of new mechanistic hypotheses to explain the development of pathologies (Fig. 1) (1).

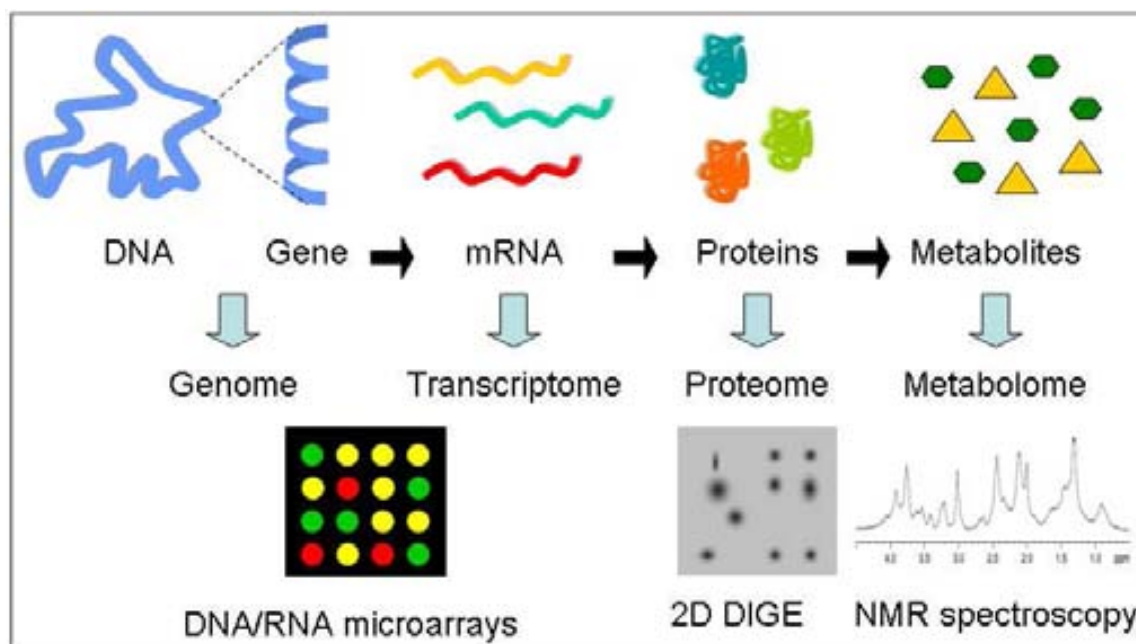


Figure 1. Schematic representation of the ‘omics’ technologies. The metabolome can be seen downstream of the genome, transcriptome and proteome.

Genomics provides information about the genotype of a large number of species and contributes to the development of functional genomic techniques such as transcriptomics, to the study of gene expression, or proteomics, to the evaluation of protein translation and post-translational modifications (2). However, many genes are not under transcriptional control, suggesting that an approach based solely on transcriptomics is inadequate. Also, unraveling the proteome of an organism remains an immense technical challenge (3).

Metabolomics is a new technology that yields a snapshot of global metabolism and defines phenotypes based on measurements of metabolite concentrations and fluxes in cells/tissues (interaction between the genetic activity, protein activity and metabolic activity). Whenever possible, the analysis takes into account that biological systems also depend on external

factors such as other genomes (symbiotic organisms) or metabolic responses from multicellular systems (pathophysiological stimuli or genetic modification). Likewise, metabolomics assessment of differences between normal and pathological metabolic profiles may improve our understanding of the disease process or predict metabolic consequences of gene modifications (4).

Classically, this technology was classified by Nicholson & Wilson (5) in two terminologies: 1) *Metabolomics* defined as ‘the measurement of metabolite concentrations and fluxes and secretions in cells and tissues in which there is a direct connection between the genetic activity (gene expression), protein activity (proteome) and metabolic activity itself’; 2) *Metabonomics* defined as ‘the quantitative measurement of the multivariate metabolomic responses of multicellular systems to pathophysiological stimuli or genetic modifications’. Later, other authors used other terminologies in order to explain the different aspects of metabolomics, for example Fiehn (6) used metabonomics, metabolomic profiling and metabolomic fingerprinting and Ellis and coworkers (7) also used metabonomics, metabolomic profiling, metabolomic fingerprinting and metabolic footprinting, metabolic target analysis, metabonomics and lipidomics (Table 1).

An advantage of metabolomics over other ‘omics’ techniques is that the metabolome is downstream of the genome and the proteome and thus it more closely resembles the phenotype (8). It has been shown, using metabolic control analysis, that small changes of enzyme activity, and therefore their expression, may have little or no effect on metabolite fluxes but could lead to substantial changes in metabolite concentrations (9). Moreover, while genes and proteins are specific for each organism, metabolites are virtually the same in all organisms. Thus, the study of metabolites is useful for translational research because findings in lab animals can be directly transferred to the clinical environment.

All expressed phenotypes depend on the constraints imposed by the environment and the identification of all these restrictions defines phenotypic states. Metabolic networks have more thermodynamic and stoichiometric constraints than signalling networks, and, consequently, metabolomics provides a more basic approach to understanding biological systems (10). All these facts make metabolomics an attractive option, especially because there are only 2766 metabolites per 31897 genes in humans (11).

Another advantage of metabolomics is that it is much cheaper on a per sample basis and with higher throughput compared to transcriptomics and proteomics. The major challenge of metabolomics is the experimental design in order e.g. to determine adequate variables and sample size (12).

Metabonomics is a rapid, accurate and precise analysis of metabolite data which yields an unbiased measure of biochemical consequences of drug effectivity/toxicity, disease processes and gene functions. Data analysis is not based on *a priori* knowledge of physiological or pathophysiological models and thus provides unbiased information of complex biological systems. Integration with physiological studies (as for example described in Chapters 3, 4, 12, 13) and studies using other ‘omics’ approaches (13) will ultimately lead to improved understanding of biological systems.

DATA COLLECTION

There are two main approaches in metabonomics, profiling and fingerprinting (Table 1). Profiling is based on quantitative analysis of all metabolites involved in a biochemical system (14). Fingerprinting is based on the determination of characteristic metabolites of a biochemical system “snapshot” (15).

Metabolites are of a very heterogenous chemical nature. There is no single technical approach that allows to detect all of them and thus very different detection methods have been used; these include enzymatic analysis, infra-red spectroscopy, Raman spectroscopy, thin layer chromatography, high performance liquid chromatography (HPLC) (16;17), mass spectroscopy (MS) and magnetic resonance spectroscopy (MRS). Until now, metabolomics has mostly been based on MS and MSR because these methods provide measurements of a great variety of metabolites in each analysis.

TABLE 2. Comparison between mass spectroscopy (MS) and magnetic resonance spectroscopy (MRS)

	Advantages	Disadvantages
MS	Identify similar substances Determine molecules in low concentration High sensitivity Quantitative analysis	Ionisation method Prior separation of a mix
MRS	Non-ionisation method (non-invasive) Studies of mixtures <i>In vivo</i> studies Quantitative analysis	Low sensitivity

Mass Spectroscopy

MS is an analytical technique to determine the sample composition by measurement of the mass-to-charge ratio of particles that have been ionised e.g. by an electron beam (18). MS is usually coupled with a metabolite separation method such as gas chromatography where analytes are separated by their boiling point, or liquid chromatography where analytes are separated by their chemical properties (hydrophobicity, hydrophilicity or charge) or capillary electrophoresis where analytes are separated by the mobility of their electrical charge (Table 2) (19).

An advantage of this technique is that it provides high sensitivity for detecting metabolites at physiological concentrations. For example, MS coupled with HPLC has instrumental lower limits of detection in the 25-75 pg range, and lower limits of quantification in the 75-250 pg range. The lower limits of quantification in human samples is on the order of nmol L⁻¹ to µmol L⁻¹ (20). On the other hand, the presence of a separation method prior to the detector implies that only a pre-defined group of metabolites will be detected.

Magnetic Resonance Spectroscopy

MRS is a non-ionising analytical technique associated with magnetic resonance imaging (MRI). It is based on proton resonance of the molecules *in vivo* or in a biological sample (21) in order to determine metabolic compounds. It does not require any separation before analysis

(Table 2). Hydrogen is usually the nucleus studied by magnetic resonance, but other nuclei of biological interest can also be used such as ^{13}C , ^{31}P , ^{19}F and ^{15}N .

Briefly, when a biological sample is placed in a magnetic field, the nuclei (for example ^1H) of the molecules can absorb radiofrequency radiation and the nuclear spin transits to an elevated energy level. During spin relaxation, there are emissions of photons proportional to the magnetic field (ν ; in Hz); the spectrum is a representation of these emissions. Each nucleus within a molecule will sense a slightly different magnetic field due to its particular environment. Thus, in a spectra the frequency, which is typically plotted as chemical shift (δ ; in ppm), is a characteristics of an atomic nucleus allowing for metabolite identification (Fig. 2).

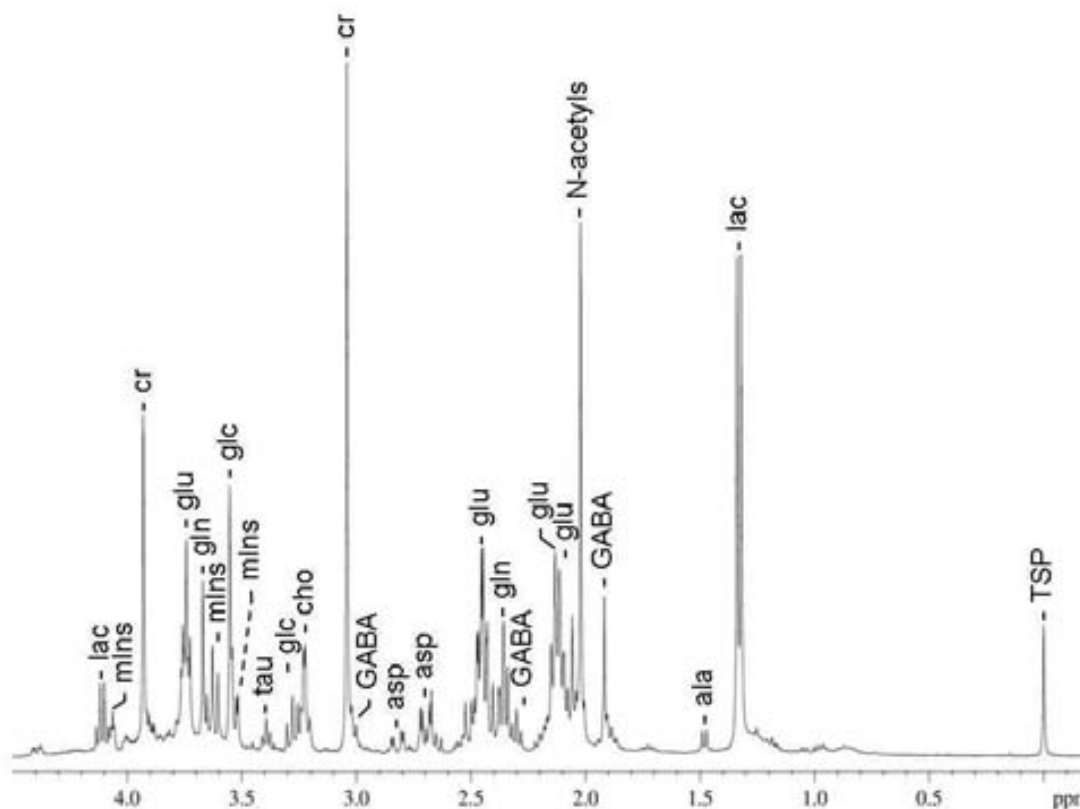


Figure 2. Typical ^1H -MR spectra of metabolites in the brain cortex of rats with portocaval anastomosis obtained at 9.4T (400MHz). All metabolites are referred to trimethylsilyltetra deuteropropionate acid (TSP) at 0.0 ppm. Only the aliphatic part of the spectra, between 0 and 4.5 ppm, is shown. Abbreviations: lac, lactate; ala, alanine; GABA, γ -aminobutyric acid; glu, glutamate; gln, glutamine; asp, aspartate; cr, creatine; cho, choline; glc, glucose; tau, taurine; mIns, *myo*-inositol.

An advantage of MRS is that metabolic markers discovered and analysed *in vitro* can be measured *in vivo*. A recent study of acute liver failure in rats determined the *in vivo* alterations of brain metabolites involved in this pathology (22). MRS can routinely be performed in the human brain and metabolic fingerprinting has been carried out in patients, particularly in the field of cancer (23-26). In addition, magnetic resonance spectroscopic imaging (MRSI) is a new approach which focuses on a segment of the metabolome by analysing a few selected metabolites to comprise a specific biochemical pathway (27) (Fig. 3). Another way to study a specific alteration of a particular pathway is through the follow-up of metabolism using labelled substrates such as ^{13}C -labelled precursors [22], see also Chapter 12.

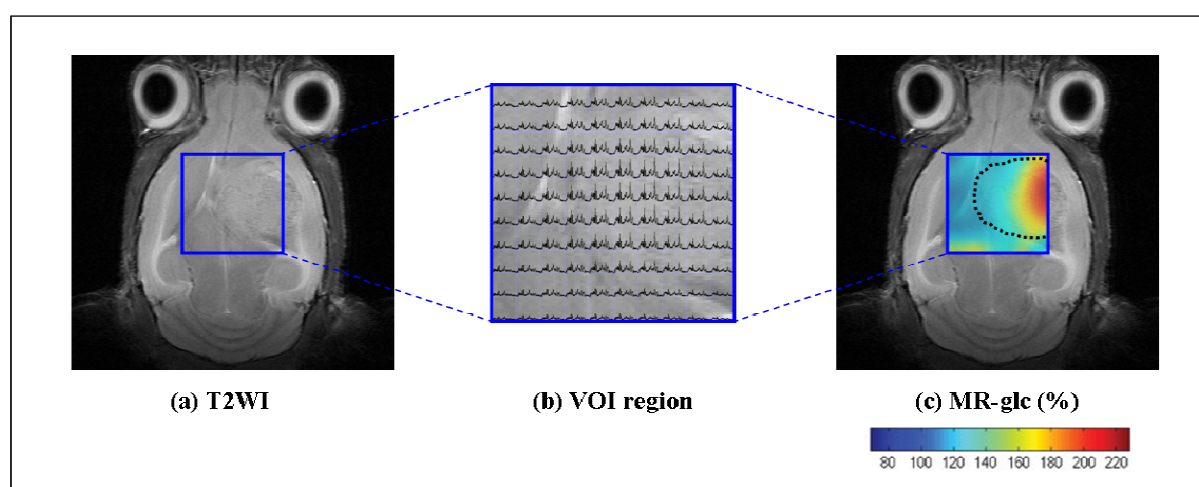


Figure 3. Example of ^1H -MRSI from a high-grade mouse glioma, with PRESS localisation. (a) T2-weighted reference image (T2WI) of the mouse brain with overlaid volume of interest (VOI, blue square) for MRSI includes most of the tumour region. (b) Enlargement of the PRESS-VOI region, where a 10×10 ^1H -MRSI matrix and respective spectra are displayed. (c) Map of time-course MR-detectable glucose changes in the VOI region, during induced acute hyperglycemia, color-coded according to the scale displayed (MR-glc, %); tumour borders marked with dashed line. Maps could be drawn for each metabolite identified in the spectra. Modified figure from [21].

Biological Samples

Metabonomic analysis can be done with most types of biological samples such as cell cultures (28) tissues (29) or biofluids (plasma, urine, cerebrospinal fluid, the vitreous humor) (30) and it can also be performed *in vivo* using, for example MRS measurements (31).

DATA ANALYSIS

As with other 'omics' approaches, a metabolomic dataset consists of a huge number of variables (MS or MRS peaks) compared to the number of samples. Statistical analysis usually comprises multivariate data analysis such as principal component analysis (PCA), allowing for pattern recognition. PCA reduces the dimensions of a dataset with a minimum loss of information and is mainly used to explore the dataset and to build predictive models (32). PCA implies linear transformation of the original variables of the dataset to a new coordinate system in which the largest variance of the dataset is referred to the first axis (first principal component; PC1), the second largest variance is referred to the second orthogonal axis (second principal component; PC2) and so on. The projections of a dataset comprise a score plot. The score plot is interpreted by use of a loading plot that shows the weight of each original variable for each component whereby it becomes possible to identify some kind of grouping variables (Fig. 4).

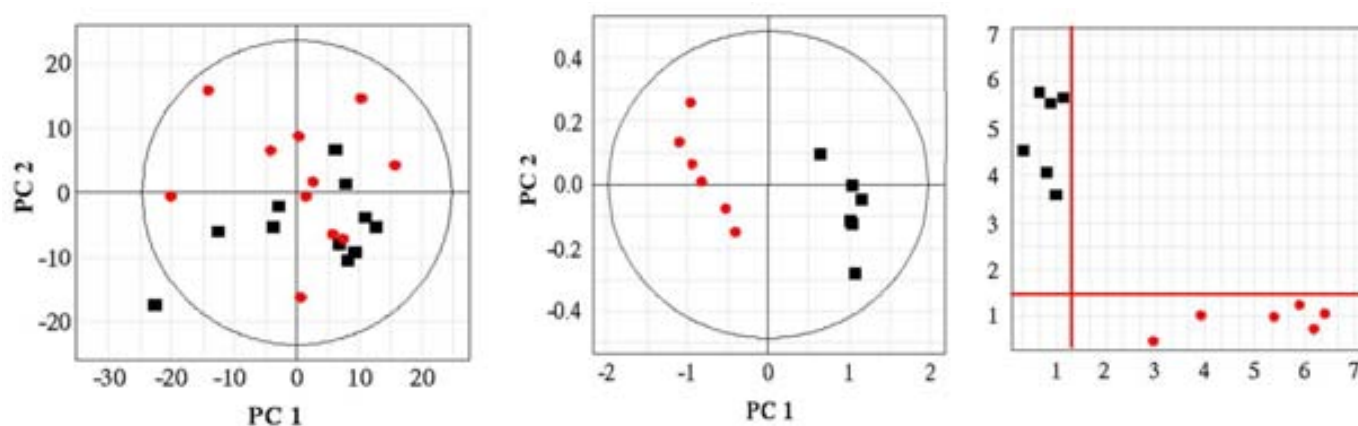


Figure 4. Chart of a typical chemo-metric approach used to cluster NMR data. (a) Unsupervised classification method (Principal Component analysis) is used to see any major trends in the dataset. (b) Supervised classification (Discriminant Analysis) shows clustering or outliers related to a variable of interest. (c) Cooman's plot shows the separation of two different groups (i.e. healthy *versus* disease). Thick lines mark the 95% confidence interval for the samples belonging to a particular group.

Frequently, more than three components are necessary to summarise the information of a dataset. The number of principal components chosen for the analysis depends on two parameters: the goodness of fit accuracy (R^2X) and the goodness of prediction (Q^2X). While the R^2X parameter explains the fitting variation that increases with the complexity of the model, Q^2X explains the predictive power of the model that increases until a maximum value. Therefore, the number of chosen components defines the model with optimal balance between the goodness of fit and the predictive ability.

PCA is an unsupervised technique to assess the variation of the dataset without any prior knowledge of the samples (Fig. 4). However, if specific questions are being posed, supervised techniques such as prediction to latent structures through partial least squares (PLS) may be more appropriate (Fig. 4). These supervised methods require a knowledge of the sample class to develop a projection model in which dependent variables are chosen to represent the class membership (33). Discriminant analysis is a method for distinguishing differences between groups (Fig. 4). This analysis first uses a training-set of data for the establishment of rules for classification and features of each data entry. Then these features are combined to maximise the separation between the classes in the training set while keeping intra-group variation at a minimum. The objective is to obtain the decision boundaries with which the subsequent prediction model will work. However, if this part of the analysis is based on a small number of samples, the prediction model may be biased due to a selection of the variability of the samples in the training set. Consequently, application of such a prediction model to other data sets may result in a biased fit and an incorrect prediction. Therefore, the model has to be validated using an independent test set of individuals of unknown classes to assure the correct prediction of the model (34). In addition, there have been described data filter procedures that can be used in discriminant analysis to further improve separation between groups such as the orthogonal signal correction (OSC) (35).

METABONOMIC APPLICATIONS

Metabonomic analysis is used in a variety of studies to establish pattern recognition as a diagnostic tool, a system to monitor pharmacological treatment, or to determine silent mutations.

In basic research, metabonomics is used in a great variety of studies. For example, the FANCY (functional analysis by co-responses in yeast) approach can reveal the phenotype of silent genes by the metabolic comparison of mutations (36). This study showed that mutations with no changes in growth rate or substrate utilisation had different levels of intracellular metabolite concentrations. In this case, the metabonomic approach provided extra information not provided by transcriptomics or proteomics. The study showed that more knowledge about the function of unstudied genes could be obtained through metabolic analysis.

One objective in metabonomics is to classify biological variables by pattern recognition analysis and to find useful biomarkers for diagnosis. Brindle and co-workers used this

approach to predict coronary artery diseases and to determine the severity of the disease by means of the analysis of blood composition (37). They used MR-based metabonomics to identify small molecules such as the levels of various lipids as risk factors involved in coronary heart diseases. This study determined two partially overlapping clusters that distinguished between patients with triple vessel disease and patients with normal coronary arteries by discriminant analysis (PLS-DA). They identified the main metabolites that allowed for setting these groups apart. After the application of OSC, patients were well separated and a predictive model was constructed from the data of fifty-four patients. This model predicted class membership of unknown samples with a sensitivity of 92% and a specificity of 93%. In addition, it was unnecessary to fully understand the molecular differences of the patients' spectra for a correct classification. The high sensitivity, specificity and simplicity show the power of this technique for screening and diagnosis of human metabolic disorders. However, in a subsequent study Kirschenlohr and co-workers (38) found that the classification model was biased since gender and statin treatment were factors of interference which were not accounted for.

Metabolomics is also a tool to assess drug toxicity (39) or to personalise a pharmacological treatment (40). The evaluation of drug toxicity has been assessed by the consortium for metabonomic toxicology (COMET) formed by five major pharmaceutical companies and Imperial College (London) (41). They used MR-based metabolomics to generate a database of metabolite content in rodent urine and blood. Predictive systems were built using pattern recognition tools for the detection of *in vivo* drug toxicity from a set of 80 treatments. The error rate of the predictive models was found to be around the 8% with a sensitivity between 40-70%, depending on the main organ of toxicity, and specificity above 70%. In some treatments, it was not possible to make predictions due to interferences between metabolite signals or class overlapping. This study validated the metabonomic approach to preclinical toxicology assessment for rapid *in vivo* drug toxicity screening. Pharmaco-metabonomics is a personalisation of drug treatment according to the individual characteristics of each patient using pattern recognition of biofluid metabolite profiles to predict the drug response (42). This approach can provide both population-screening and individualised tools for suitable drug treatment.

Metabonomics Applications in Liver Diseases

Metabonomic analysis has been applied in some liver disease studies. For example, Barba and coworkers used metabonomics to establish a model of classification of hepatic encephalopathy (HE) according to its severity and to evaluate the effect of therapeutic hypothermia in a rat model of acute liver failure (43). They studied brain metabolites using MRS of brain tissue extracts. This animal model has a predictable course reaching precoma, defined as loss of righting reflex, and coma, defined as a loss of corneal reflex. They isolated two different brain regions (frontal cortex and brainstem) to evaluate the metabolites by high-resolution magic angle spinning (HR-MAS) spectroscopy. Principal component analysis (PCA) summarised the information of the metabolite spectra; where PC1 clustered the data according to the severity of liver failure (normal, precoma and coma stage), PC2 provided no useful information and PC3 showed the origin of tissue (frontal cortex or brainstem) (Fig. 5).

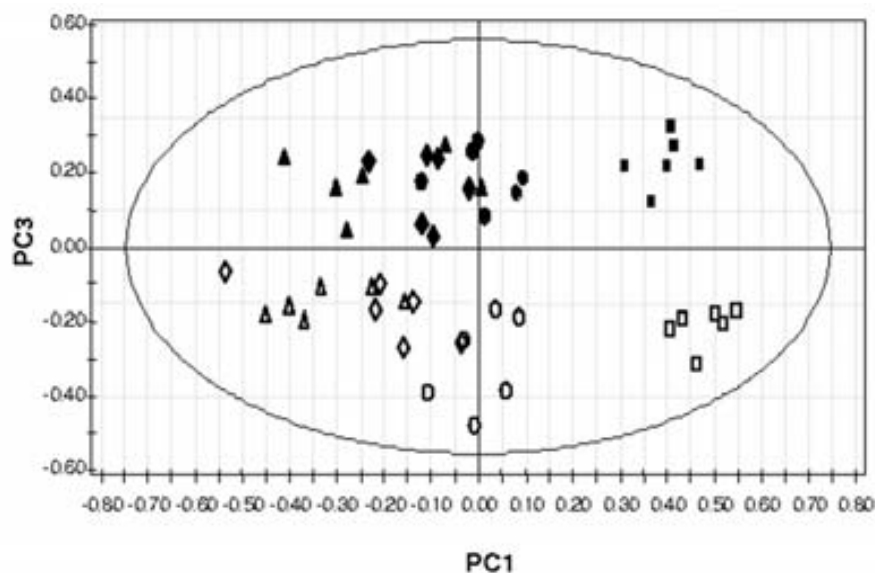


Figure 5. Score plots of principal component analysis from HR-MAS spectra obtained from the brain of a rat model of HE. Each symbol corresponds to an individual animal. The first principal component (PC1) is related to the severity of HE while the third principal component (PC3) differentiated between cortex and brainstem. The second component (not shown) was unrelated to pathology or brain area. Legend: Samples from sham (squares), 6 h stage (circles), precoma (diamonds) and coma (triangles) acute liver failure rats are labelled filled for the cortex and opened for the brainstem.

Thus, metabolic profiles changed during acute liver failure progression. The study also demonstrated that mild hypothermia as a treatment for acute liver failure caused a delay in disease progression, which correlated with the changes of brain metabolite profiles. Indeed, this study established a model to classify the severity of liver failure and to detect the effectiveness of a treatment using metabolomics analysis (Fig. 6). This is a promising tool for diagnosis and prognosis of pathologies.

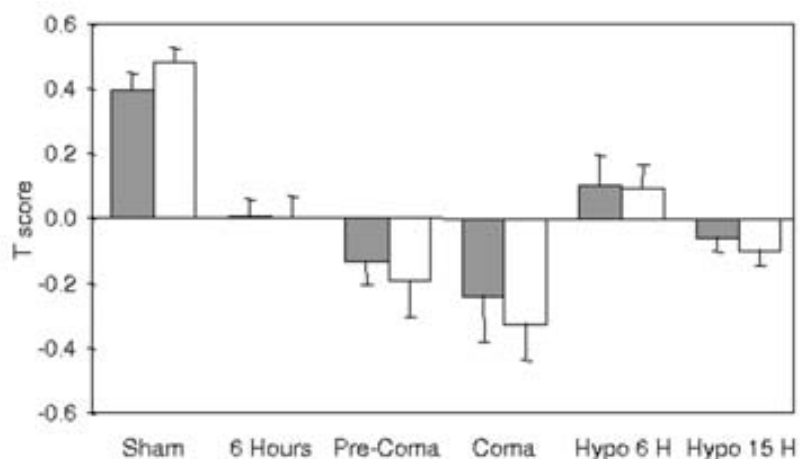


Figure 6. Average of score plot (t) for sham-operated animals, normothermic animals at 6 h (6 H), precoma and coma and hypothermic animals (hypo) at 6 h (6 H) and 15 h (15 H) in the cortex (grey bars) and the brainstem (empty bars) obtained in one-component partial least square discriminate analysis (PLS-DA). Scores for hypothermic animals were obtained using the PLS-DA model created using the different stages of disease progression in normothermic animals showing that hypothermia prevents metabolic degeneration as well as the symptom progression.

Metabolic profiling has been used to study specific metabolites that may be involved in pathology. Vinaixa and co-workers studied an animal model of non-alcoholic liver disease, which is a frequent cause of liver dysfunction secondary to a fatty infiltration in the absence of alcohol abuse (44). It has been hypothesised that the development of hepatic inflammation originates from steatosis of the liver but this has been questioned recently. This study analysed the effect of dietary cholesterol on steatosis in a mouse knockout model of the low-density lipoprotein receptor. Mice were fed three different diets: a control diet (3% fat, 0.03% cholesterol); a high-fat diet (23% fat, 0.03% cholesterol); and a high-fat and high-cholesterol diet (23% fat, 0.28% cholesterol). Analysis of the livers after 16 and 32 weeks showed that the dietary cholesterol content was of importance for the development of steatosis. In contrast, inflammation had less impact because the three groups of animals showed the same number of infiltrating cells. Therefore, diet could have a critical role on the mechanism of this pathology. These external factors can be evaluated by metabolomics.

In a more recent study, Sun and co-workers demonstrated that the potential hepatotoxicity of acetaminophen (APAP) could be assessed through the study of the drug's metabolite profiles in urine (45). They treated rats with APAP 400 mg kg⁻¹ or 1600 mg g⁻¹ to study the metabolic pathway of APAP through the metabolites excreted in urine. They found that almost all APAP was metabolised and excreted as compounds conjugated with sulphate (APAP-Sul) or with glucuronide (APAP-Glu). A small quantity of APAP was oxidated to a reactive

metabolite (N-acetyl-p-benzoquinone) that is involved in liver toxicity. N-acetyl-p-benzoquinone reacts with glutathione to form APAP conjugated with N-acetyl-L-cysteine (APAP-NAC) that is excreted in urine. A small amount of unmetabolised APAP is excreted in the urine. All these metabolites were detected in the urine with MS-based metabonomics for both doses and then their concentrations were detected at different time-points by MR-based metabonomics. The highest concentration of APAP-NAC in urine was seen after 24h of treatment and disappeared after 72h. Furthermore, the concentration of S-adenosyl-L-methionine, the source of sulphur in glutathione, was evaluated in urine and there was an inverse correlation between S-adenosyl-L-methionine and APAP-NAC concentrations. This suggests that the trans-sulphuration metabolic pathway was involved in the drug detoxification process. They also showed a correlation between APAP-NAC and biochemical analyses (ALT, AST and bilirubin). This data supports the idea that metabolomic technologies are useful in evaluating the potential toxicity of a drug and in detecting biomarkers of toxicity that could be useful for the drug discovery process.

Hepatic graft failure could be detected as early as two hours after transplantation by blood metabolic analysis (46). A patient was examined after a failed graft of orthotopic liver transplantation from a living donor and after a second successful graft transplantation from a deceased donor. Blood samples were collected 2, 24 and 48 hours after both liver transplantations. Principal component analysis showed two different clusters depending on the success or failure of the liver transplantation; thus, putative biomarkers of graft dysfunction were identified including lactate, uric acid, citrate, glutamine, methionine and total fatty acid. Moreover, there were differences in the metabolic profiles between graft rejection and a favourable outcome both at early stages of the transplantation (after two hours when there are no changes in liver enzymes) and at late stages (after 24-48h). Although this is a preliminary study that should be validated in a heterogeneous population, these data suggest the possible usefulness of metabonomics as a tool for clinical decision making.

Hepatocellular carcinoma could also be detected before the patients developed clinical symptoms using a minimally invasive analysis of blood metabolites (47). MR spectroscopy was performed on serum samples from patients with cirrhosis, hepatocellular carcinoma and healthy volunteers. A supervised discriminant analysis (PLS-DA) found two principal components that allowed for the correct separation between the three groups of subjects. This model predicted class membership with a goodness of fit of 50% and a predictive ability of

59%. The main metabolites involved in the clustering of healthy volunteers were very low density lipoproteins (VLDL) and unsaturated lipids. This is in accordance with the results obtained from *in vivo* spectra that showed a decrease in lipids in the serum of the same patients. In contrast, patients with cirrhosis had elevated glycerol and glutamine and patients with hepatocarcinoma showed a decrease in LDL and an increase in acetylglycoproteins. Thus, the study demonstrated that patients with cirrhosis and hepatocarcinoma have different metabolic profiles as compared to healthy controls. Furthermore, the supervised analysis between cirrhosis and hepatocarcinoma showed a good prediction model ($R^2 = 35.4\%$ and $Q^2 = 45.7\%$). This study suggests that metabolomics can be a tool for the early diagnosis of hepatocarcinoma and cirrhosis. More studies are necessary before establishing an adequate classification model for the stratification of liver diseases.

All metabolites contain hydrogen atoms, thus ^1H -MRS could be used to study almost all metabolites. However, some metabolic pathways are better assessed by other approaches. Energetic metabolism or phospholipid metabolism have been studied by ^{31}P -MRS and carbon fluxes by ^{13}C -MRS using ^{13}C -labelled precursors. These methods have also been applied in different pathologies of the liver. Zwingmann and collaborators (48) used 1- ^{13}C -labelled glucose to follow glycolytic metabolism in the rat brain of acute liver failure by *ex vivo* magnetic resonance. They showed a selective increase in the synthesis of *de novo* lactate at advanced stages of liver failure (coma stage) and an increase in the synthesis of glutamine at an earlier precoma stage. Both metabolites are involved in energy and nitrogen metabolism. Hyperpolarisation is a new approach that enhances the MR signal and may be used as a non-invasive agent for *in vivo* studies. Ardenkjaer-Larsen and coworkers have carried out the development of this technology achieving an enhancement of the signal-to-noise ratio to 44400 for ^{13}C and 23500 for ^{15}N (49). Moreover, there are some experimental *in vivo* studies that follow the carbon fluxes using ^{13}C -hyperpolarised pyruvate as non-invasive biomarkers in the area of cancer (50) or heart disease (51). An accurate MR-based metabolic study may elucidate some extra data of the mechanisms that act in this pathology.

Hepatic encephalopathy is a complication of cirrhosis. These patients have characteristic *in vivo* brain ^1H -MR spectra defined by a decrease in choline derivatives and myo-inositol and an increase in glutamate and glutamine (52;53). These alterations have been linked to the severity of liver failure and it has been proposed that they could indicate compensatory mechanisms due to the development of brain edema (54;55). These metabolic changes may

also participate in the neurophysiological disturbances that affect the first motor neuron (56). In experimental models (57), neurophysiological abnormalities have been related to abnormalities of nitrogen metabolism. It is difficult to distinguish which metabolites are involved in neurophysiological detriment and in brain edema or if there is a combined effect of both. Metabolomics may clarify the mechanisms involved in brain edema and neurophysiological detriment associated with hepatic encephalopathy.

CONCLUSION

Metabonomics is a useful tool for basic research and clinical applications in the diagnosis and prognosis of liver diseases as well as for treatment follow-up. This technology is especially useful for the liver because of the key role of the liver in the metabolism of exogenous and endogenous substances. Furthermore, unlike genomics, metabonomics considers the alterations due to the environment making this a promising tool to evaluate not only phenotypes but also disease progression and treatment response.

ACKNOWLEDGEMENTS

Authors would like to thank Prof. Carles Arús and Dr. Rui Simões for providing the images used in Fig. 3.

REFERENCES

- (1) Goodacre R. Making sense of the metabolome using evolutionary computation: seeing the wood with the trees. *J Exp Bot* 2005 January;56(410):245-54.
- (2) Evans GA. Designer science and the "omic" revolution. *Nat Biotechnol* 2000 February;18(2):127.
- (3) Griffin JL. Metabolic profiles to define the genome: can we hear the phenotypes? *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2004 June 29;359(1446):857-71.
- (4) Griffin JL. Metabolic profiles to define the genome: can we hear the phenotypes? *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2004 June 29;359(1446):857-71.
- (5) Nicholson JK, Wilson ID. Opinion: understanding 'global' systems biology: metabonomics and the continuum of metabolism. *Nat Rev Drug Discov* 2003 August;2(8):668-76.
- (6) Fiehn O. Combining genomics, metabolome analysis, and biochemical modelling to understand metabolic networks. *Comp Funct Genomics* 2001;2(3):155-68.
- (7) Ellis DI, Dunn WB, Griffin JL, Allwood JW, Goodacre R. Metabolic fingerprinting as a diagnostic tool. *Pharmacogenomics* 2007 September;8(9):1243-66.

- (8) Kell DB. Metabolomics and systems biology: making sense of the soup. *Curr Opin Microbiol* 2004 June;7(3):296-307.
- (9) Fiehn O. Metabolomics--the link between genotypes and phenotypes. *Plant Mol Biol* 2002 January;48(1-2):155-71.
- (10) Price ND, Reed JL, Palsson BO. Genome-scale models of microbial cells: evaluating the consequences of constraints. *Nat Rev Microbiol* 2004 November;2(11):886-97.
- (11) Duarte NC, Becker SA, Jamshidi N, Thiele I, Mo ML, Vo TD, Srivas R, Palsson BO. Global reconstruction of the human metabolic network based on genomic and bibliomic data. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007 February 6;104(6):1777-82.
- (12) Kell DB. Metabolomics and systems biology: making sense of the soup. *Curr Opin Microbiol* 2004 June;7(3):296-307.
- (13) Ge H, Walhout AJ, Vidal M. Integrating 'omic' information: a bridge between genomics and systems biology. *Trends Genet* 2003 October;19(10):551-60.
- (14) Weckwerth W, Morgenthal K. Metabolomics: from pattern recognition to biological interpretation. *Drug Discov Today* 2005 November 15;10(22):1551-8.
- (15) Ellis DI, Dunn WB, Griffin JL, Allwood JW, Goodacre R. Metabolic fingerprinting as a diagnostic tool. *Pharmacogenomics* 2007 September;8(9):1243-66.
- (16) Ellis DI, Dunn WB, Griffin JL, Allwood JW, Goodacre R. Metabolic fingerprinting as a diagnostic tool. *Pharmacogenomics* 2007 September;8(9):1243-66.
- (17) Griffin JL, Shockcor JP. Metabolic profiles of cancer cells. *Nat Rev Cancer* 2004 July;4(7):551-61.
- (18) Weckwerth W, Morgenthal K. Metabolomics: from pattern recognition to biological interpretation. *Drug Discov Today* 2005 November 15;10(22):1551-8.
- (19) Weckwerth W, Morgenthal K. Metabolomics: from pattern recognition to biological interpretation. *Drug Discov Today* 2005 November 15;10(22):1551-8.
- (20) Ross AB, Redeuil K, Vigo M, Rezzi S, Nagy K. Quantification of alkylresorcinols in human plasma by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2010 March 15;24(5):554-60.
- (21) Griffin JL. Metabonomics: NMR spectroscopy and pattern recognition analysis of body fluids and tissues for characterisation of xenobiotic toxicity and disease diagnosis. *Curr Opin Chem Biol* 2003 October;7(5):648-54.
- (22) Chavarria L, Oria M, Romero-Gimenez J, Alonso J, Lope-Piedrafita S, Cordoba J. Diffusion Tensor Imaging Supports the Cytotoxic Origin of Brain Edema in a Rat Model of Acute Liver Failure. *Gastroenterology* 2010 April;138(4):1566-73.
- (23) Merz AL, Serkova NJ. Use of nuclear magnetic resonance-based metabolomics in detecting drug resistance in cancer. *Biomark Med* 2009 June 1;3(3):289-306.

- (24) Sitter B, Bathen TF, Singstad TE, Fjosne HE, Lundgren S, Halgunset J, Gribbestad IS. Quantification of metabolites in breast cancer patients with different clinical prognosis using HR MAS MR spectroscopy. *NMR Biomed* 2010 January 25.
- (25) Barba I, Sanz C, Barbera A, Tapia G, Mate JL, Garcia-Dorado D, Ribera JM, Oriol A. Metabolic fingerprinting of fresh lymphoma samples used to discriminate between follicular and diffuse large B-cell lymphomas. *Exp Hematol* 2009 November;37(11):1259-65.
- (26) Tate AR, Griffiths JR, Martinez-Perez I, Moreno A, Barba I, Cabanas ME, Watson D, Alonso J, Bartumeus F, Isamat F, Ferrer I, Vila F, Ferrer E, Capdevila A, Arus C. Towards a method for automated classification of 1H MRS spectra from brain tumours. *NMR Biomed* 1998 June;11(4-5):177-91.
- (27) Merz AL, Serkova NJ. Use of nuclear magnetic resonance-based metabolomics in detecting drug resistance in cancer. *Biomark Med* 2009 June 1;3(3):289-306.
- (28) Barba I, Sanz C, Barbera A, Tapia G, Mate JL, Garcia-Dorado D, Ribera JM, Oriol A. Metabolic fingerprinting of fresh lymphoma samples used to discriminate between follicular and diffuse large B-cell lymphomas. *Exp Hematol* 2009 November;37(11):1259-65.
- (29) Barba I, Chatauret N, Garcia-Dorado D, Cordoba J. A 1H nuclear magnetic resonance-based metabolomic approach for grading hepatic encephalopathy and monitoring the effects of therapeutic hypothermia in rats. *Liver Int* 2008 September;28(8):1141-8.
- (30) Barba I, Garcia-Ramirez M, Hernandez C, Alonso MA, Masmiquel L, Garcia-Dorado D, Simo R. Metabolic fingerprints of proliferative diabetic retinopathy. An 1H NMR-based metabolomic approach using vitreous humor. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010 April 7.
- (31) Chavarria L, Oria M, Romero-Gimenez J, Alonso J, Lope-Piedrafita S, Cordoba J. Diffusion Tensor Imaging Supports the Cytotoxic Origin of Brain Edema in a Rat Model of Acute Liver Failure. *Gastroenterology* 2010 April;138(4):1566-73.
- (32) Stoyanova R, Brown TR. NMR spectral quantitation by principal component analysis. *NMR Biomed* 2001 June;14(4):271-7.
- (33) Trygg J, Wold S. Orthogonal projections to latent structures (O-PLS). *Journal of Chemometrics* 2002;16(3):119-28.
- (34) Tate AR, Griffiths JR, Martinez-Perez I, Moreno A, Barba I, Cabanas ME, Watson D, Alonso J, Bartumeus F, Isamat F, Ferrer I, Vila F, Ferrer E, Capdevila A, Arus C. Towards a method for automated classification of 1H MRS spectra from brain tumours. *NMR Biomed* 1998 June;11(4-5):177-91.
- (35) Wold S, Antti H, Lindgren F, Íhman J. Orthogonal signal correction of near-infrared spectra. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 1998 December 14;44(1-2):175-85.
- (36) Raamsdonk LM, Teusink B, Broadhurst D, Zhang N, Hayes A, Walsh MC, Berden JA, Brindle KM, Kell DB, Rowland JJ, Westerhoff HV, van DK, Oliver SG. A

- functional genomics strategy that uses metabolome data to reveal the phenotype of silent mutations. *Nat Biotechnol* 2001 January;19(1):45-50.
- (37) Brindle JT, Antti H, Holmes E, Tranter G, Nicholson JK, Bethell HW, Clarke S, Schofield PM, McKilligin E, Mosedale DE, Grainger DJ. Rapid and noninvasive diagnosis of the presence and severity of coronary heart disease using ¹H-NMR-based metabolomics. *Nat Med* 2002 December;8(12):1439-44.
- (38) Kirschenlohr HL, Griffin JL, Clarke SC, Rhydwen R, Grace AA, Schofield PM, Brindle KM, Metcalfe JC. Proton NMR analysis of plasma is a weak predictor of coronary artery disease. *Nat Med* 2006 June;12(6):705-10.
- (39) Ebbels TM, Keun HC, Beckonert OP, Bollard ME, Lindon JC, Holmes E, Nicholson JK. Prediction and classification of drug toxicity using probabilistic modeling of temporal metabolic data: the consortium on metabolomic toxicology screening approach. *J Proteome Res* 2007 November;6(11):4407-22.
- (40) Clayton TA, Lindon JC, Cloarec O, Antti H, Charuel C, Hanton G, Provost JP, Le Net JL, Baker D, Walley RJ, Everett JR, Nicholson JK. Pharmaco-metabolomic phenotyping and personalized drug treatment. *Nature* 2006 April 20;440(7087):1073-7.
- (41) Lindon JC, Keun HC, Ebbels TM, Pearce JM, Holmes E, Nicholson JK. The Consortium for Metabolomic Toxicology (COMET): aims, activities and achievements. *Pharmacogenomics* 2005 October;6(7):691-9.
- (42) Clayton TA, Lindon JC, Cloarec O, Antti H, Charuel C, Hanton G, Provost JP, Le Net JL, Baker D, Walley RJ, Everett JR, Nicholson JK. Pharmaco-metabolomic phenotyping and personalized drug treatment. *Nature* 2006 April 20;440(7087):1073-7.
- (43) Barba I, Chatauret N, Garcia-Dorado D, Cordoba J. A ¹H nuclear magnetic resonance-based metabolomic approach for grading hepatic encephalopathy and monitoring the effects of therapeutic hypothermia in rats. *Liver Int* 2008 September;28(8):1141-8.
- (44) Vinaixa M, Rodriguez MA, Rull A, Beltran R, Blade C, Brezmes J, Canellas N, Joven J, Correig X. Metabolomic assessment of the effect of dietary cholesterol in the progressive development of fatty liver disease. *J Proteome Res* 2010 May 7;9(5):2527-38.
- (45) Sun J, Schnackenberg LK, Beger RD. Studies of acetaminophen and metabolites in urine and their correlations with toxicity using metabolomics. *Drug Metab Lett* 2009 August;3(3):130-6.
- (46) Serkova NJ, Zhang Y, Coatney JL, Hunter L, Wachs ME, Niemann CU, Mandell MS. Early detection of graft failure using the blood metabolic profile of a liver recipient. *Transplantation* 2007 February 27;83(4):517-21.
- (47) Gao H, Lu Q, Liu X, Cong H, Zhao L, Wang H, Lin D. Application of ¹H NMR-based metabolomics in the study of metabolic profiling of human hepatocellular carcinoma and liver cirrhosis. *Cancer Sci* 2009 April;100(4):782-5.

- (48) Zwingmann C. Nuclear magnetic resonance studies of energy metabolism and glutamine shunt in hepatic encephalopathy and hyperammonemia. *J Neurosci Res* 2007 November 15;85(15):3429-42.
- (49) Ardenkjaer-Larsen JH, Fridlund B, Gram A, Hansson G, Hansson L, Lerche MH, Servin R, Thaning M, Golman K. Increase in signal-to-noise ratio of > 10,000 times in liquid-state NMR. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003 September 2;100(18):10158-63.
- (50) Albers MJ, Bok R, Chen AP, Cunningham CH, Zierhut ML, Zhang VY, Kohler SJ, Tropp J, Hurd RE, Yen YF, Nelson SJ, Vigneron DB, Kurhanewicz J. Hyperpolarized ¹³C lactate, pyruvate, and alanine: noninvasive biomarkers for prostate cancer detection and grading. *Cancer Res* 2008 October 15;68(20):8607-15.
- (51) Moreno KX, Sabelhaus SM, Merritt ME, Sherry AD, Malloy CR. Competition of pyruvate with physiological substrates for oxidation by the heart: implications for studies with hyperpolarized [1-¹³C]pyruvate. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2010 May;298(5):H1556-H1564.
- (52) Cordoba J, Sanpedro F, Alonso J, Rovira A. ¹H magnetic resonance in the study of hepatic encephalopathy in humans. *Metab Brain Dis* 2002 December;17(4):415-29.
- (53) Saksena S, Rai V, Saraswat VA, Rathore RS, Purwar A, Kumar M, Thomas MA, Gupta RK. Cerebral diffusion tensor imaging and in vivo proton magnetic resonance spectroscopy in patients with fulminant hepatic failure. *J Gastroenterol Hepatol* 2008 July;23(7 Pt 2):e111-e119.
- (54) Rai V, Nath K, Saraswat VA, Purwar A, Rathore RK, Gupta RK. Measurement of cytotoxic and interstitial components of cerebral edema in acute hepatic failure by diffusion tensor imaging. *J Magn Reson Imaging* 2008 August;28(2):334-41.
- (55) Cordoba J, Alonso J, Rovira A, Jacas C, Sanpedro F, Castells L, Vargas V, Margarit C, Kulisevsky J, Esteban R, Guardia J. 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 November;35(5):598-604.
- (56) Cordoba J, Raguer N, Flavia M, Vargas V, Jacas C, Alonso J, Rovira A. T2 hyperintensity along the cortico-spinal tract in cirrhosis relates to functional abnormalities. *Hepatology* 2003 October;38(4):1026-33.
- (57) Oria M, Raguer N, Chatauret N, Bartoli R, Odena G, Planas R, Cordoba J. Functional abnormalities of the motor tract in the rat after portocaval anastomosis and after carbon tetrachloride induction of cirrhosis. *Metab Brain Dis* 2006 December;21(4):297-308.

BIBLIOGRAFIA

14. BIBLIOGRAFIA

- (1) Cordoba J, Minguez B. Hepatic encephalopathy. Semin Liver Dis 2008 February;28(1):70-80.
- (2) Escorsell A, Mas A, de la MM. Acute liver failure in Spain: analysis of 267 cases. Liver Transpl 2007 October;13(10):1389-95.
- (3) Ichai P, Samuel D. Epidemiology of liver failure. Clin Res Hepatol Gastroenterol 2011 May 5.
- (4) Instituto Nacional de Estadística (INE). INE: Morbilidad hospitalaria 2009. Instituto Nacional de Estadística (INE) 2009; Available from: URL: <http://www.ine.es/jaxi/menu.do?type=pcaxis&path=/t15/p414&file=inebase&L=0>
- (5) Instituto Nacional de Estadística (INE). INE: Defuncions segons causa mort (2009). Instituto Nacional de Estadística (INE) 2009; Available from: URL: <http://www.ine.es/jaxi/menu.do?type=pcaxis&path=/t15/p417&file=inebase&L=0>
- (6) Lewis M, Howdle PD. The neurology of liver failure. QJM 2003 September;96(9):623-33.
- (7) Haussinger D, Schliess F. Pathogenetic mechanisms of hepatic encephalopathy. Gut 2008 August;57(8):1156-65.
- (8) 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 March;35(3):716-21.
- (9) Prakash R, Mullen KD. Mechanisms, diagnosis and management of hepatic encephalopathy. Nat Rev Gastroenterol Hepatol 2010 September;7(9):515-25.
- (10) Garcia-Martinez R, Rovira A, Alonso J, Jacas C, Simon-Talero M, Chavarria L, Vargas V, Cordoba J. Hepatic encephalopathy is associated with posttransplant cognitive function and brain volume. Liver Transpl 2011 January;17(1):38-46.
- (11) Garcia MR, Rovira A, Alonso J, Aymerich FX, Huerga E, Jacas C, Simon-Talero M, Vargas V, Cordoba J. A long-term study of changes in the volume of brain ventricles and white matter lesions after successful liver transplantation. Transplantation 2010 March 15;89(5):589-94.

- (12) Randolph C, Hilsabeck R, Kato A, Kharbanda P, Li YY, Mapelli D, Ravdin LD, Romero-Gomez M, Stracciari A, Weissenborn K. Neuropsychological assessment of hepatic encephalopathy: ISHEN practice guidelines. *Liver Int* 2009 May;29(5):629-35.
- (13) Minguez B, Garcia-Pagan JC, Bosch J, Turnes J, Alonso J, Rovira A, Cordoba J. Noncirrhotic portal vein thrombosis exhibits neuropsychological and MR changes consistent with minimal hepatic encephalopathy. *Hepatology* 2006 April;43(4):707-14.
- (14) Cordoba J. New assessment of hepatic encephalopathy. *J Hepatol* 2011 May;54(5):1030-40.
- (15) Shah NJ, Neeb H, Kircheis G, Engels P, Haussinger D, Zilles K. Quantitative cerebral water content mapping in hepatic encephalopathy. *Neuroimage* 2008 July 1;41(3):706-17.
- (16) Jalan R, Olde Damink SW, Hayes PC, Deutz NE, Lee A. Pathogenesis of intracranial hypertension in acute liver failure: inflammation, ammonia and cerebral blood flow. *J Hepatol* 2004 October;41(4):613-20.
- (17) Wendon J, Manns M, Alexander G, Aldersley M, Burroughs A, Simpson K, Mutimer D, Nevens F, Bernal W, Larterre P-F, Ilan Y, Hudson M, Stolze-Larsen F, Saliba F, Arroyo V, Murphy N, Lalazar G, O'Bierne J, Hadem J, Samuel D. Acute liver failure: current european perspective. *Journal of Hepatology* 52[Supplement 1], S13. 2010.
Ref Type: Abstract
- (18) Beauchamp NJ, Jr., Ulug AM, Passe TJ, van Zijl PC. MR diffusion imaging in stroke: review and controversies. *Radiographics* 1998 September;18(5):1269-83.
- (19) Nguyen JH, Yamamoto S, Steers J, Sevlever D, Lin W, Shimojima N, Castanedes-Casey M, Genco P, Golde T, Richelson E, Dickson D, McKinney M, Eckman CB. Matrix metalloproteinase-9 contributes to brain extravasation and edema in fulminant hepatic failure mice. *J Hepatol* 2006 June;44(6):1105-14.
- (20) Kato M, Sugihara J, Nakamura T, Muto Y. Electron microscopic study of the blood-brain barrier in rats with brain edema and encephalopathy due to acute hepatic failure. *Gastroenterol Jpn* 1989 April;24(2):135-42.
- (21) Kato M, Hughes RD, Keays RT, Williams R. Electron microscopic study of brain capillaries in cerebral edema from fulminant hepatic failure. *Hepatology* 1992 June;15(6):1060-6.

- (22) Larsen FS, Strauss G, Moller K, Hansen BA. Regional cerebral blood flow autoregulation in patients with fulminant hepatic failure. *Liver Transpl* 2000 November;6(6):795-800.
- (23) Aggarwal S, Obrist W, Yonas H, Kramer D, Kang Y, Scott V, Planinsic R. Cerebral hemodynamic and metabolic profiles in fulminant hepatic failure: relationship to outcome. *Liver Transpl* 2005 November;11(11):1353-60.
- (24) Magistretti PJ. Neuron-glia metabolic coupling and plasticity. *J Exp Biol* 2006 June;209(Pt 12):2304-11.
- (25) Pellerin L. Brain energetics (thought needs food). *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2008 November;11(6):701-5.
- (26) Zwingmann C. The anaplerotic flux and ammonia detoxification in hepatic encephalopathy. *Metab Brain Dis* 2007 December;22(3-4):235-49.
- (27) Lemberg A, Fernandez MA. Hepatic encephalopathy, ammonia, glutamate, glutamine and oxidative stress. *Ann Hepatol* 2009 April;8(2):95-102.
- (28) Misgeld T, Kerschensteiner M. In vivo imaging of the diseased nervous system. *Nat Rev Neurosci* 2006 June;7(6):449-63.
- (29) Hashemi RH, Bradley WGJ. *MRI: the Basics*. Baltimore, USA: 1997.
- (30) Gadian DG. *NMR and its applications to living systems*. 2nd ed. New York, United States: Oxford University Press; 1995.
- (31) Wolff SD, Balaban RS. Magnetization transfer contrast (MTC) and tissue water proton relaxation in vivo. *Magn Reson Med* 1989 April;10(1):135-44.
- (32) Dousset V, Grossman RI, Ramer KN, Schnall MD, Young LH, Gonzalez-Scarano F, Lavi E, Cohen JA. Experimental allergic encephalomyelitis and multiple sclerosis: lesion characterization with magnetization transfer imaging. *Radiology* 1992 February;182(2):483-91.
- (33) Le BD, Mangin JF, Poupon C, Clark CA, Pappata S, Molko N, Chabriat H. Diffusion tensor imaging: concepts and applications. *J Magn Reson Imaging* 2001 April;13(4):534-46.
- (34) Rosen Y, Lenkinski RE. Recent advances in magnetic resonance neurospectroscopy. *Neurotherapeutics* 2007 July;4(3):330-45.
- (35) Martin WR. MR spectroscopy in neurodegenerative disease. *Mol Imaging Biol* 2007 July;9(4):196-203.

- (36) Ruiz-Cabello J, Barnett BP, Bottomley PA, Bulte JW. Fluorine (^{19}F) MRS and MRI in biomedicine. *NMR Biomed* 2011 February;24(2):114-29.
- (37) Ropele S, Strasser-Fuchs S, Augustin M, Stollberger R, Enzinger C, Hartung HP, Fazekas F. A comparison of magnetization transfer ratio, magnetization transfer rate, and the native relaxation time of water protons related to relapsing-remitting multiple sclerosis. *AJNR Am J Neuroradiol* 2000 November;21(10):1885-91.
- (38) Vavasour IM, Laule C, Li DK, Traboulsee AL, MacKay AL. Is the magnetization transfer ratio a marker for myelin in multiple sclerosis? *J Magn Reson Imaging* 2011 March;33(3):713-8.
- (39) Finsterer J. Management of mitochondrial stroke-like-episodes. *Eur J Neurol* 2009 November;16(11):1178-84.
- (40) Kotek G, Berente Z, Schwarcz A, Vajda Z, Hadjiev J, Horvath I, Repa I, Miseta A, Bogner P. Effects of intra- and extracellular space properties on diffusion and T(2) relaxation in a tissue model. *Magn Reson Imaging* 2009 February;27(2):279-84.
- (41) Sevick RJ, Kanda F, Mintorovitch J, Arief AI, Kucharczyk J, Tsuruda JS, Norman D, Moseley ME. Cytotoxic brain edema: assessment with diffusion-weighted MR imaging. *Radiology* 1992 December;185(3):687-90.
- (42) Schwarcz A, Ursprung Z, Berente Z, Bogner P, Kotek G, Meric P, Gillet B, Beloeil JC, Doczi T. In vivo brain edema classification: New insight offered by large b-value diffusion-weighted MR imaging. *J Magn Reson Imaging* 2007 January;25(1):26-31.
- (43) Neeb H, Zilles K, Shah NJ. Fully-automated detection of cerebral water content changes: study of age- and gender-related H₂O patterns with quantitative MRI. *Neuroimage* 2006 February 1;29(3):910-22.
- (44) Tran T, Ross B, Lin A. Magnetic resonance spectroscopy in neurological diagnosis. *Neurol Clin* 2009 February;27(1):21-60, xiii.
- (45) Zwingmann C, Leibfritz D. Regulation of glial metabolism studied by ^{13}C -NMR. *NMR Biomed* 2003 October;16(6-7):370-99.
- (46) Simoes RV, gado-Goni T, Lope-Piedrafita S, Arus C. ^1H -MRSI pattern perturbation in a mouse glioma: the effects of acute hyperglycemia and moderate hypothermia. *NMR Biomed* 2010 January;23(1):23-33.
- (47) Schroeder MA, Atherton HJ, Ball DR, Cole MA, Heather LC, Griffin JL, Clarke K, Radda GK, Tyler DJ. Real-time assessment of Krebs cycle metabolism using hyperpolarized ^{13}C magnetic resonance spectroscopy. *FASEB J* 2009 August;23(8):2529-38.

- (48) Fitsanakis VA, Zhang N, Avison MJ, Gore JC, Aschner JL, Aschner M. The use of magnetic resonance imaging (MRI) in the study of manganese neurotoxicity. *Neurotoxicology* 2006 September;27(5):798-806.
- (49) Aggarwal A, Vaidya S, Shah S, Singh J, Desai S, Bhatt M. Reversible Parkinsonism and T1W pallidal hyperintensities in acute liver failure. *Mov Disord* 2006 November;21(11):1986-90.
- (50) Cordoba J, Alonso J, Rovira A, Jacas C, Sanpedro F, Castells L, Vargas V, Margarit C, Kulisevsky J, Esteban R, Guardia J. 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 November;35(5):598-604.
- (51) Miese FR, Wittsack HJ, Kircheis G, Holstein A, Mathys C, Modder U, Cohnen M. Voxel-based analyses of magnetization transfer imaging of the brain in hepatic encephalopathy. *World J Gastroenterol* 2009 November 7;15(41):5157-64.
- (52) Cordoba J, Raguer N, Flavia M, Vargas V, Jacas C, Alonso J, Rovira A. T2 hyperintensity along the cortico-spinal tract in cirrhosis relates to functional abnormalities. *Hepatology* 2003 October;38(4):1026-33.
- (53) Rovira A, Cordoba J, Sanpedro F, Grive E, Rovira-Gols A, Alonso J. Normalization of T2 signal abnormalities in hemispheric white matter with liver transplant. *Neurology* 2002 August 13;59(3):335-41.
- (54) Lodi R, Tonon C, Stracciari A, Weiger M, Camaggi V, Iotti S, Donati G, Guarino M, Bolondi L, Barbiroli B. Diffusion MRI shows increased water apparent diffusion coefficient in the brains of cirrhotics. *Neurology* 2004 March 9;62(5):762-6.
- (55) Rovira A, Alonso J, Cordoba J. MR Imaging Findings in Hepatic Encephalopathy. *AJNR Am J Neuroradiol* 2008 June 26.
- (56) Garcia-Martinez R., Rovira A, Alonso J, Aymerich FX, Huerga E, Jacas C, Simon-Talero M, Vargas V, Cordoba J. A long-term study of changes in the volume of brain ventricles and white matter lesions after successful liver transplantation. *Transplantation* 2010 March 15;89(5):589-94.
- (57) Cordoba J, Sanpedro F, Alonso J, Rovira A. 1H magnetic resonance in the study of hepatic encephalopathy in humans. *Metab Brain Dis* 2002 December;17(4):415-29.
- (58) Verma A, Saraswat VA, Radha KY, Nath K, Thomas MA, Gupta RK. In vivo 1H magnetic resonance spectroscopy-derived metabolite variations between acute-on-chronic liver failure and acute liver failure. *Liver Int* 2008 September;28(8):1095-103.

- (59) Saksena S, Rai V, Saraswat VA, Rathore RS, Purwar A, Kumar M, Thomas MA, Gupta RK. Cerebral diffusion tensor imaging and in vivo proton magnetic resonance spectroscopy in patients with fulminant hepatic failure. *J Gastroenterol Hepatol* 2008 July;23(7 Pt 2):e1111-e1119.
- (60) Chatauret N, Rose C, Therrien G, Butterworth RF. Mild hypothermia prevents cerebral edema and CSF lactate accumulation in acute liver failure. *Metab Brain Dis* 2001 June;16(1-2):95-102.
- (61) Albers GW. Diffusion-weighted MRI for evaluation of acute stroke. *Neurology* 1998 September;51(3 Suppl 3):S47-S49.
- (62) Preston E, Webster J, Small D. Characteristics of sustained blood-brain barrier opening and tissue injury in a model for focal trauma in the rat. *J Neurotrauma* 2001 January;18(1):83-92.
- (63) Oria M, Chatauret N, Chavarria L, Romero-Gimenez J, Palenzuela L, Pardo-Yules B, Arranz JA, Bodega G, Ragner N, Cordoba J. Motor-evoked potentials in awake rats are a valid method of assessing hepatic encephalopathy and of studying its pathogenesis. *Hepatology* 2010 December;52(6):2077-85.
- (64) Bjerring PN, Hauerberg J, Frederiksen HJ, Jorgensen L, Hansen BA, Tofteng F, Larsen FS. Cerebral glutamine concentration and lactate-pyruvate ratio in patients with acute liver failure. *Neurocrit Care* 2008;9(1):3-7.
- (65) Cauli O, Lopez-Larrubia P, Rodrigues TB, Cerdan S, Felipo V. Magnetic resonance analysis of the effects of acute ammonia intoxication on rat brain. Role of NMDA receptors. *J Neurochem* 2007 November;103(4):1334-43.
- (66) Cauli O, Lopez-Larrubia P, Rodrigo R, Agusti A, Boix J, Nieto-Charques L, Cerdan S, Felipo V. Brain region-selective mechanisms contribute to the progression of cerebral alterations in acute liver failure in rats. *Gastroenterology* 2011 February;140(2):638-45.
- (67) Cordoba J, Gottstein J, Blei AT. Glutamine, myo-inositol, and organic brain osmolytes after portocaval anastomosis in the rat: implications for ammonia-induced brain edema. *Hepatology* 1996 October;24(4):919-23.
- (68) Nguyen JH, Yamamoto S, Steers J, Sevlever D, Lin W, Shimojima N, Castanedes-Casey M, Genco P, Golde T, Richelson E, Dickson D, McKinney M, Eckman CB. Matrix metalloproteinase-9 contributes to brain extravasation and edema in fulminant hepatic failure mice. *J Hepatol* 2006 June;44(6):1105-14.
- (69) Traber PG, Dal Canto M, Ganger DR, Blei AT. Electron microscopic evaluation of brain edema in rabbits with galactosamine-induced fulminant

- hepatic failure: ultrastructure and integrity of the blood-brain barrier. *Hepatology* 1987 November;7(6):1272-7.
- (70) Takahashi H, Koehler RC, Brusilow SW, Traystman RJ. Glutamine synthetase inhibition prevents cerebral oedema during hyperammonemia. *Acta Neurochir Suppl (Wien)* 1990;51:346-7.
- (71) Norenberg MD, Rao KV, Jayakumar AR. Mechanisms of ammonia-induced astrocyte swelling. *Metab Brain Dis* 2005 December;20(4):303-18.
- (72) Detry O, De RA, Honore P, Meurisse M. Brain edema and intracranial hypertension in fulminant hepatic failure: pathophysiology and management. *World J Gastroenterol* 2006 December 14;12(46):7405-12.
- (73) Saksena S, Rai V, Saraswat VA, Rathore RS, Purwar A, Kumar M, Thomas MA, Gupta RK. Cerebral diffusion tensor imaging and in vivo proton magnetic resonance spectroscopy in patients with fulminant hepatic failure. *J Gastroenterol Hepatol* 2008 July;23(7 Pt 2):e1111-e1119.
- (74) Kato M, Hughes RD, Keays RT, Williams R. Electron microscopic study of brain capillaries in cerebral edema from fulminant hepatic failure. *Hepatology* 1992 June;15(6):1060-6.
- (75) Donovan JP, Schafer DF, Shaw BW, Jr., Sorrell MF. Cerebral oedema and increased intracranial pressure in chronic liver disease. *Lancet* 1998 March 7;351(9104):719-21.
- (76) Lodi R, Tonon C, Stracciari A, Weiger M, Camaggi V, Iotti S, Donati G, Guarino M, Bolondi L, Barbiroli B. Diffusion MRI shows increased water apparent diffusion coefficient in the brains of cirrhotics. *Neurology* 2004 March 9;62(5):762-6.
- (77) Maier SE, Vajapeyam S, Mamata H, Westin CF, Jolesz FA, Mulkern RV. Biexponential diffusion tensor analysis of human brain diffusion data. *Magn Reson Med* 2004 February;51(2):321-30.
- (78) Mulkern RV, Haker SJ, Maier SE. On high b diffusion imaging in the human brain: ruminations and experimental insights. *Magn Reson Imaging* 2009 October;27(8):1151-62.
- (79) Mulkern RV, Gudbjartsson H, Westin CF, Zengingonul HP, Gartner W, Guttman CR, Robertson RL, Kyriakos W, Schwartz R, Holtzman D, Jolesz FA, Maier SE. Multi-component apparent diffusion coefficients in human brain. *NMR Biomed* 1999 February;12(1):51-62.
- (80) Niendorf T, Dijkhuizen RM, Norris DG, van Lookeren CM, Nicolay K. Biexponential diffusion attenuation in various states of brain tissue:

- implications for diffusion-weighted imaging. *Magn Reson Med* 1996 December;36(6):847-57.
- (81) Brugieres P, Thomas P, Maraval A, Hosseini H, Combes C, Chafiq A, Ruel L, Breil S, Peschanski M, Gaston A. Water diffusion compartmentation at high b values in ischemic human brain. *AJNR Am J Neuroradiol* 2004 May;25(5):692-8.
- (82) Kale RA, Gupta RK, Saraswat VA, Hasan KM, Trivedi R, Mishra AM, Ranjan P, Pandey CM, Narayana PA. Demonstration of interstitial cerebral edema with diffusion tensor MR imaging in type C hepatic encephalopathy. *Hepatology* 2006 April;43(4):698-706.
- (83) Rai V, Nath K, Saraswat VA, Purwar A, Rathore RK, Gupta RK. Measurement of cytotoxic and interstitial components of cerebral edema in acute hepatic failure by diffusion tensor imaging. *J Magn Reson Imaging* 2008 August;28(2):334-41.
- (84) Nath K, Saraswat VA, Krishna YR, Thomas MA, Rathore RK, Pandey CM, Gupta RK. Quantification of cerebral edema on diffusion tensor imaging in acute-on-chronic liver failure. *NMR Biomed* 2008 August;21(7):713-22.
- (85) Saraswat VA, Saksena S, Nath K, Mandal P, Singh J, Thomas MA, Rathore RS, Gupta RK. Evaluation of mannitol effect in patients with acute hepatic failure and acute-on-chronic liver failure using conventional MRI, diffusion tensor imaging and in-vivo proton MR spectroscopy. *World J Gastroenterol* 2008 July 14;14(26):4168-78.
- (86) Schneider JF, Il'yasov KA, Boltshauser E, Hennig J, Martin E. Diffusion tensor imaging in cases of adrenoleukodystrophy: preliminary experience as a marker for early demyelination? *AJNR Am J Neuroradiol* 2003 May;24(5):819-24.
- (87) Weissenborn K, Tietge UJ, Bokemeyer M, Mohammadi B, Bode U, Manns MP, Caselitz M. Liver transplantation improves hepatic myelopathy: evidence by three cases. *Gastroenterology* 2003 February;124(2):346-51.
- (88) Guevara M, Baccaro ME, Torre A, Gomez-Anson B, Rios J, Torres F, Rami L, Monte-Rubio GC, Martin-Llahi M, Arroyo V, Gines P. Hyponatremia is a risk factor of hepatic encephalopathy in patients with cirrhosis: a prospective study with time-dependent analysis. *Am J Gastroenterol* 2009 June;104(6):1382-9.
- (89) Fernandez-Cadenas I, Mendioroz M, Domingues-Montanari S, Del Rio-Espinola A, Delgado P, Ruiz A, Hernandez-Guillamon M, Giralt D, Chacon P, Navarro-Sobrino M, Ribo M, Molina CA, varez-Sabin J, Rosell A, Montaner J. Leukoaraiosis is associated with genes regulating blood-brain barrier

- homeostasis in ischaemic stroke patients. *Eur J Neurol* 2011 June;18(6):826-35.
- (90) Singer OC, Humpich MC, Fiehler J, Albers GW, Lansberg MG, Kastrup A, Rovira A, Liebeskind DS, Gass A, Rosso C, Derex L, Kim JS, Neumann-Haefelin T. Risk for symptomatic intracerebral hemorrhage after thrombolysis assessed by diffusion-weighted magnetic resonance imaging. *Ann Neurol* 2008 January;63(1):52-60.
- (91) Topakian R, Barrick TR, Howe FA, Markus HS. Blood-brain barrier permeability is increased in normal-appearing white matter in patients with lacunar stroke and leucoaraiosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2010 February;81(2):192-7.
- (92) Chastre A, Jiang W, Desjardins P, Butterworth RF. Ammonia and proinflammatory cytokines modify expression of genes coding for astrocytic proteins implicated in brain edema in acute liver failure. *Metab Brain Dis* 2010 March;25(1):17-21.
- (93) Bosoi CR, Parent-Robitaille C, Anderson K, Tremblay M, Rose CF. AST-120 (spherical carbon adsorbent) lowers ammonia levels and attenuates brain edema in bile duct-ligated rats. *Hepatology* 2011 June;53(6):1995-2002.
- (94) Jover R, Rodrigo R, Felipo V, Insausti R, Saez-Valero J, Garcia-Ayllon MS, Suarez I, Candela A, Compan A, Esteban A, Cauli O, Auso E, Rodriguez E, Gutierrez A, Girona E, Erceg S, Berbel P, Perez-Mateo M. Brain edema and inflammatory activation in bile duct ligated rats with diet-induced hyperammonemia: A model of hepatic encephalopathy in cirrhosis. *Hepatology* 2006 June;43(6):1257-66.
- (95) Martinez-Prieto C, Ortiz MC, Fortepiani LA, Ruiz-Macia J, Atucha NM, Garcia-Estan J. Haemodynamic and renal evolution of the bile duct-ligated rat. *Clin Sci (Lond)* 2000 May;98(5):611-7.
- (96) Wright G, Davies NA, Shawcross DL, Hodges SJ, Zwingmann C, Brooks HF, Mani AR, Harry D, Stadlbauer V, Zou Z, Williams R, Davies C, Moore KP, Jalan R. Endotoxemia produces coma and brain swelling in bile duct ligated rats. *Hepatology* 2007 June;45(6):1517-26.
- (97) Mans AM, DeJoseph MR, Hawkins RA. Metabolic abnormalities and grade of encephalopathy in acute hepatic failure. *J Neurochem* 1994 November;63(5):1829-38.
- (98) Zwingmann C, Chatauret N, Leibfritz D, Butterworth RF. Selective increase of brain lactate synthesis in experimental acute liver failure: results of a [H-C] nuclear magnetic resonance study. *Hepatology* 2003 February;37(2):420-8.
- (99) Friolet R, Colombo JP, Lazeyras F, Aue WP, Kretschmer R, Zimmermann A, Bachmann C. In vivo ³¹P NMR spectroscopy of energy rich phosphates in

the brain of the hyperammonemic rat. *Biochem Biophys Res Commun* 1989 March 15;159(2):815-20.

- (100) Pellerin L, Bouzier-Sore AK, Aubert A, Serres S, Merle M, Costalat R, Magistretti PJ. Activity-dependent regulation of energy metabolism by astrocytes: an update. *Glia* 2007 September;55(12):1251-62.
- (101) Record CO, Buxton B, Chase RA, Curzon G, Murray-Lyon IM, Williams R. Plasma and brain amino acids in fulminant hepatic failure and their relationship to hepatic encephalopathy. *Eur J Clin Invest* 1976 September 10;6(5):387-94.
- (102) Rovira A, Minguez B, Aymerich FX, Jacas C, Huerga E, Cordoba J, Alonso J. Decreased white matter lesion volume and improved cognitive function after liver transplantation. *Hepatology* 2007 November;46(5):1485-90.
- (103) Albrecht J, Norenberg MD. Glutamine: a Trojan horse in ammonia neurotoxicity. *Hepatology* 2006 October;44(4):788-94.
- (104) Marmarou A, Poll W, Shulman K, Bhagavan H. A simple gravimetric technique for measurement of cerebral edema. *J Neurosurg* 1978 October;49(4):530-7.
- (105) Provencher SW. Automatic quantitation of localized in vivo ¹H spectra with LCModel. *NMR Biomed* 2001 June;14(4):260-4.
- (106) Provencher SW. Estimation of metabolite concentrations from localized in vivo proton NMR spectra. *Magn Reson Med* 1993 December;30(6):672-9.
- (107) Stoyanova R, Brown TR. NMR spectral quantitation by principal component analysis. *NMR Biomed* 2001 June;14(4):271-7.

