



ALTERACIONS FUNCIONALS DE LA VIA MOTORA CENTRAL EN L'ENCEFALOPATIA HEPÀTICA EXPERIMENTAL

Marc Oria Alonso

Laboratori de Malalties Hepàtiques

Vall d'Hebrón Institut de Recerca (VHIR)

Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia

Universitat Autònoma de Barcelona

Barcelona 2011



Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia

Universitat Autònoma de Barcelona

**ALTERACIONS FUNCIONALS DE LA VIA MOTORA CENTRAL EN L'ENCEFALOPATIA
HEPÀTICA EXPERIMENTAL**

Memòria presentada per **Marc Orià Alonso** per optar al grau de Doctor per la

Universitat Autònoma de Barcelona

Director de la tesi doctoral

Dr. Joan Córdoba

Tutor de la tesi doctoral

Dr. Xavier Navarro

Tesi Doctoral realitzada en el Laboratori de Malalties Hepàtiques del Vall d'Hebrón Institut de Recerca (VHIR) amb finançament del Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBEREHD), Instituto de Salud Carlos III sota la direcció del Doctor JOAN CÓRDOBA i CARDONA i la tutoria del Doctor XAVIER NAVARRO i ACEBES del Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia de la Universitat Autònoma de Barcelona

1 ÍNDIX

1	ÍNDIX	3
2	AGRAÏMENTS	6
3	INTRODUCCIÓ	29
3.1	ASPECTES GENERALS DE L'ENCEFALOPATIA HEPÀTICA	29
3.2	CLASSIFICACIÓ DE L'ENCEFALOPATIA HEPÀTICA	29
3.3	MANIFESTACIONS NEUROLÒGIQUES	31
3.4	FISIOPATOLOGIA DE L'ENCEFALOPATIA HEPÀTICA	32
3.5	METABOLISME DE L'AMONÍAC	33
3.6	EDEMA CEREBRAL.....	35
3.7	ALTERACIONS MOTORES	36
3.8	TRACTE MOTOR EN LA RATA	36
3.9	MODELS ANIMALS EN L'ENCEFALOPATIA HEPÀTICA	37
3.9.1	<i>Tipus A: Fallida hepàtica aguda</i>	38
3.9.2	<i>Tipus B i C: Fallida hepàtica crònica</i>	39
3.10	VALIDACIÓ DELS MODELS ANIMALS.....	40
3.11	LIMITACIONS DELS MODELS EXPERIMENTALS EN L'ENCEFALOPATIA HEPÀTICA.....	41
4	ESTUDI 1: ALTERACIONS FUNCIONALS DE LA VIA MOTORA EN MODELS EXPERIMENTALS D'ENCEFALOPATIA HEPÀTICA	44
4.1	HIPÒTESI I OBJECTIUS	44
4.1.1	<i>Introducció</i>	44
4.1.2	<i>Hipòtesi</i>	44
4.1.3	<i>Objectius</i>	45
4.2	RESUM DE L'ESTUDI.....	46
5	ESTUDI 2: NOVA METODOLOGIA PER MESURAR LA FUNCIONALITAT DE LA VIA MOTORA SENSE ANESTÈSIA.	63
5.1	HIPÒTESI I OBJECTIUS	63
5.1.1	<i>Introducció</i>	63
5.1.2	<i>Hipòtesi</i>	63
5.1.3	<i>Objectius</i>	64
5.2	RESUM DE L'ESTUDI.....	64
6	ESTUDI 3: VALIDACIÓ DELS POTENCIALS EVOCATS MOTORS COM UN SISTEMA OBJECTIU D'AVALUAR L'ENCEFALOPATIA HEPÀTICA EXPERIMENTAL	80
6.1	HIPÒTESI I OBJECTIUS.....	80
6.1.1	<i>Introducció</i>	80
6.1.2	<i>Hipòtesi</i>	80
6.1.3	<i>Objectius</i>	80
6.2	RESUM DE L'ESTUDI.....	81
7	ESTUDI 4: INVESTIGAR ELS BENEFICIS D'UN NOU FÀRMAC PER L'ENCEFALOPATIA HEPÀTICA I ANALITZAR ELS MECANISMES D'ACCIÓ	94
7.1	HIPÒTESI I OBJECTIUS.....	94
7.1.1	<i>Introducció</i>	94
7.1.2	<i>Hipòtesi</i>	94
7.1.3	<i>Objectius</i>	95
7.2	RESUM DE L'ESTUDI.....	95
8	DISCUSSIÓ	117
8.1	ALTERACIONS NEUROFISIOLÒGIQUES EN RATES AMB ANASTOMOSI PORTO-CAVA I EN RATES AMB CIRROSI	117
8.2	DESENVOLUPAMENT D'UN MÈTODE PER ESTUDIAR LA FUNCIÓ DE LA VIA MOTORA SENSE ANESTÈSIA.....	121

8.3	LA MEDICIÓ DELS POTENCIALS EVOCATS MOTORS: UN MÈTODE VÀLID PER MESURAR	
	L'ENCEFALOPATIA HEPÀTICA	122
8.4	EDEMA CEREBRAL EN L'ENCEFALOPATIA HEPÀTICA	125
8.5	METABOLISME DE L'AMONÍAC	126
8.6	NOVES ESTRATÈGIES TERAPÈUTIQUES: ORNITINA-FENILACETAT.....	127
9	CONCLUSIONS.....	130
10	MATERIAL I MÈTODES.....	132
10.1	ANIMALS.....	132
10.2	MODEL ANIMALS EMPRATS	132
10.2.1	<i>Models animal d'anastomosi portocava.....</i>	132
10.2.2	<i>Model animal d'insuficiència hepàtica aguda.....</i>	133
10.2.3	<i>Model animal de cirrosi per tetraclorur de carboni.....</i>	134
10.2.4	<i>Model animal de lligadura del conducte biliar</i>	135
10.3	MÈTODE NEUROFISIOLÒGIC.....	135
10.3.1	<i>Cargol cranial.....</i>	137
10.3.2	<i>Registres neurofisiològics.....</i>	137
10.4	MANIFESTACIONS NEUROLÒGIQUES	140
10.5	MESURA DE L'AIGUA.....	140
10.6	MICRODIÀLISI CEREBRAL.....	141
10.7	MESURES BIOQUÍMIQUES	142
10.8	METABÒLITS CEREBRALS	142
10.9	METODOLOGIA PER A MESURAR FENILACETAT I FENILACETIL-GLUTAMINA	143

AGRAÏMENTS

2 AGRAÏMENTS

Sembla que arriba el final de “l’Eternal Pre-doc” i és que entrant a treballar amb el Joan a l’estiu del 2003 i acabar la tesi al 2011 com voleu que m’anomeni?

No m’agradaria deixar-me ningú en aquest agraïments, i si per alguna raó passa ha estat pel meu cap que està a tot arreu però no arriba enlloc. Per intentar-ho evitar, faré els agraïments de forma cronològica:

Un e-mail arriba al meu correu provinent de la Beth, la germana de la Mar, explicant-me que hi havia una oferta de feina a Vall Hebron on buscaven un biòleg per fer la tesi doctoral sobre encefalopatia hepàtica. Sense dubtar-ho vaig enviar un currículum vitae. És curiós que l’oferta de feina em vingués per part de la família de la Mar; és “la família”. Plena de germans, cosins, nebots, cunyats, tiets, tietes, sogres.... una família que he tingut la sort de veure créixer des que em van acollir als seus braços com un més, gràcies per posar-m’ho tan fàcil.

Primera entrevista de feina amb el Joan, i que voleu que us digui del Joan que no sapiguen la gran majoria, però si que us puc dir la primera frase que em va dir.....saps qui soc? Em coneixes d’alguna cosa?.....buf pensava que ja havia begut oli, vaig imaginar la seva cara a diaris, telenotícies, revistes, però no em venia al cap..... doncs resulta que la vida em va portar a treballar amb un remer, com jo en aquella època. No li digueu al Joan, però crec que aquest fet em va donar molt punts per aconseguir el lloc!

Això succeïa un dimecres 16 de juliol del 2003 a les 17:30 de la tarda. L'entrevista va anar molt bé i va haver-hi feeling des del començament. Estava tan content que em van posar una multa per excés de velocitat al sortir de l'entrevista!

Al vespre vaig rebre un nou e-mail que em deia que si podia anar el dia següent a la mateixa hora per fer una segona entrevista.

Quina raó tenies Mar quan em vas dir que en la següent entrevista em posarien a prova i que intentarien posar-me en situació d'estrés.... Vaig arribar a l'entrevista el dijous puntual, i l'entrevista no me la va fer el Joan, que hi era present tota l'estona, sinó l'altre Joan, que encara que ara digui que no ho recorda em va apretar dient-me que el camí de la ciència era com una rosa, ple d'espines fins que arribes a la flor, i no tothom arriba a la flor, que estava mal remunerat..... si la Mar no m'hagués avisat potser hauria sortit cames ajudeu-me amb llàgrimes als ulls.

Al vespre el Joan molt content em va trucar per dir-me que havia estat seleccionat per començar la tesi amb un rollo anomenat encefalopatia hepàtica, que com tothom hagués fet, vaig mirar que era a internet.

Vaig marxar de vacances i ja havia conegut a dues persones que tindrien un gran paper en la meva tesi doctoral:

Com no el Dr. Joan Córdoba, el meu director i mentor dins del món científic i, el que per mi té el mateix o més valor, un gran amic, company, esportista, confident, familiar fora de la feina. Tothom m'ha dit que tinc molta sort de tenir un cap com el que tinc, però és que mai m'he queixat del que tenia i tan de bo ho sigui durant molts anys si em puc fer lloc en aquest difícil camí d'espines. Tan sols puc donar-te les gràcies per tot, però sembla que un tot és el que s'ha de dir, però és que és la realitat, res no hauria estat possible sense haver estat feliç dins i fora de la feina.

I el Dr. Joan Genescà, que a part d'haver donat el seu vist-i-plau a l'entrevista de feina, té un paper molt important dins del Laboratori de Malalties Hepàtiques, on a cada moment demostra la seva passió per la investigació, ens cuida a tots els que en formem part i a més a més tinc la gran sort que avaluarà la meva tesi doctoral formant part del tribunal.

Els inicis diuen que són molt durs, i el meu el recordo duríssim ja que a mitjans d'agost quan tothom marxava a la platja jo entrava a treballar a les 8 del matí per passar visita amb el Joan a planta. Durant quinze dies vaig poder veure al Joan treballant amb emoció i devoció per la seva feina, formant a diferents resident en la seva carrera com la Bea, la Riti, l'Iñigo que han passat a fer la tesi amb ell. Vaig tenir la gran sort de poder veure a on aniria dirigit el que jo investigaria. Vaig poder veure pacients amb cirrosi, pacients amb episodis d'encefalopatia hepàtica i fins i tot un coma hepàtic. Quina gran sort de viure aquells moments, amb tots els metges analitzant els resultats de les proves per intentar compondre el trencaclosques d'un diagnòstic correcte. La meva més gran admiració per tots vosaltres.

Aquí apareix la Bea, que si no m'equivoco estava a punt de marxar de vacances i estava en el seu últim any de residència. Sin quererlo ni beberlo, es va encarregar que conegués a tothom, que en els moments que hi havia silencis difícils per un nouvingut ella els va omplir amb milers de temes diferents. Els teus agraïments no s'acaben aquí Bea, però vas marxar de vacances, així que tornaré més tard.

Cada dia després de la visita, tornàvem al despatx i jo crec que no he llegit tants llibres i articles com durant aquells dies, no feia res més que llegir i estudiar encefalopatia hepàtica, amoni, estrès, oxidació, inflamació, bla bla blaah i escriure un projecte

del que, al final després de la correcció del Joan, només en va quedar el títol de collita pròpia.

Passat aquest estiu tan meravellós del 2003, al setembre el Joan em va dir que no tenia lloc a l'hospital, pensava que ja em feia fora i no havia començat a cobrar! Però, resulta que no tenia un espai físic on poder estar, així que va parlar amb el Ramonet, ay, perdó el Dr. Ramón Bartolí de l'Hospital Germans Trias i Pujol perquè anés al seu laboratori a aprendre a fer models de cirrosi hepàtica i alhora anés agafant mans amb els animals.

Així que com tot estudiant, em vaig apuntar als cursos de doctorat i vaig començar a anar a Can Ruti. Quins mesos més bons i tan intensos! Mira que vaig conèixer a gent, mira que en vaig fer de coses, des de treballar en models de cirrosi hepàtica fins a treballar amb knock outs i mira si en vaig fer d'amics, en Josep, Eli, Vio, Anna, Gemma, Ramón. Aquella època genial que vaig passar allà es va acabar amb el Congrés Català de Digestologia que es va celebrar al desembre del 2003, el meu primer congrés i sense pressió perquè no tenia res a presentar.

El Nadal ja arribat, quina il·lusió i per tots vosaltres aquest petó (ah no, que això és de la Marina i encara no ha nascut), però si, el Nadal ja ha arribat, primer sopar de Nadal amb el servei, que la veritat, quina pena que s'hagi perdut aquest sopar amb tothom, tots els metges del servei, residents, infermeres i becaris, entenc que som molta gent, però que bonica és la germanor! Milers de gràcies per tu Bea, sabes muy bien que en esa cena parecía mi primer día en la universidad, miedo escénico, sequedad en la boca,

no saber que decir y casi se me secan los ojos por no pestañear! No coneixia a ningú i la Bea que em coneixia de dos dies a l'Agost em va dir, tu vine amb nosaltres. Vaig seure al seu costat i em va alleugerar el pes que posen les mirades i la presència dels jefes i el fet de conèixer una mica més a tots els metges de la planta amb qui al final varem passar una bona nit de germanor, com no a Luz de Gas.

S'acaben les vacances de Nadal i tornem a la feina, però ves per on, han trobat un lloc on poder seure i tenir el meu propi ordinador! I us preguntareu a on? Doncs bé, que us sembla si us dic que tenia finestres, on hi arribava una mica de claror, però que si plovia les gotes no arribaven a terra i la majoria de gotes que arribaven eren els orins i femtes dels coloms, ah i se m'oblidava fins i tot crec que estava sota terra! On és? Doncs el famós "zulo", on crec que si m'hagués passat alguna cosa no m'haurien trobat fins que hagués fet pudor. Però en aquella cova ja hi habitava algú, la Judit, qui m'ha ensenyat més truquis i qui m'ha ensenyat a moure'm per l'hospital com peix a l'aigua. Em va presentar a tothom que manega el funcionament de l'hospital, paletes, fusters, manteniment, a més de ser la primera companya de feina de la meva vida, amb qui varem riure, plorar, xerrar i més riure; gràcies per tot el que vas fer per mi en aquella etapa!

Febrer del 2004, quin mes tan important per mi; el Joan em va dir que havia de marxar a Montreal per anar a aprendre una tècnica quirúrgica anomenada anastomosi porto-cava o shunt para los amigos; quina pena que em va fer marxar, jo a l'altra banda de l'Atlàntic, però si no l'havia creuat mai!.

Quins dos personatges que vaig conèixer allà, només arribar a l'aeroport vaig conèixer al Dr. Nicolas Chatauret a qui tots coneixeu per Nico, el tio més treballador, metòdic, maniàtic, clar i sincer que mai he conegut, però el tio més amic i defensor dels seus amics que tothom li agradaria tenir a prop. Va ser ell qui em va ensenyar les verdaderes entranyes de la feina amb els animals i de l'encefalopatia hepàtica. A l'aeroport, quan jo arribava, ell marxava a Berlín, el Dr. Christopher Rose, o millor dit el Chris, el tio més amigable, intel·ligent, cool però alhora el tio amb més jeta, que mai coneixereu si en teniu oportunitat, però el tio té alguna cosa que el fa ser entranyable, algú que enganxa i un grandíssim amic. Allà també vaig poder conèixer el laboratori del Dr. Roger Butterwoth, un dels grans de l'encefalopatia hepàtica, un avi entranyable que no té res dolent, un senyor perfecte, qui em va acollir a casa seva durant la meva estada a Montreal, potser a canvi de netejar-li de neu el sostre de la seva casa, però va ser tot un matí sense importància! A vosaltres us hagués agradat anar de visita turística? No home no, millor és fer el canadenc treien neu de la teulada d'una casa.

La gent del seu laboratori, Javier, Mirei, Claudia i Nico van estar per mi tots els dies, però si em pregunteu com és Montreal, fins al 2010 no el vaig conèixer, ja que el Nico em tenia treballant tots els dies a l'estabulari, d'on no podia sortir perquè no tenia clau, de casa a l'estabulari de l'estabulari a dinar, de dinar a l'estabulari i de l'estabulari a casa i així com el dia de la Marmota. No vaig conèixer com era Montreal, però vaig tornar a Barcelona sabent fer shunts i microdiàlisi. Si no ho hagués fet així hauria tornat de buit.

Mentre era a Montreal la meua àvia paterna va morir el dia del seu aniversari, no vaig poder estar al funeral, però aquest fet va fer que la Mar fes més pinya amb la família, no només em té el cor robat a mi, sinó a tots.

Per fi tornava a Barcelona, amb ganes de començar a fer coses, ja feia molt de temps que m'havien agafat per fer recerca i fins ara només feia que anar amunt i avall. Però és que la gent em deia: buf, tranquil, la recerca necessita el seu temps, tot és molt lent i la veritat és que amb el temps he comprovat que a vegades per molt que vulguis córrer, tot té el seu tempo.

Decidit a iniciar el meu camí en la recerca em vaig dirigir a l'estabulari, on gairebé no hi havia ningú treballant i si el veiéssiu ara gairebé t'has de barallar per tenir un trocet de taula. Aquí és on conec la Marta Rosal, veterinària de l'Institut de Recerca i que és una treballadora insaciable, estima el que fa i que dedica el temps lliure a la feina a treballar més. Sabeu el que em va dir? que no podia començar a treballar fins que no passes el comitè ètic d'experimentació animal. Heus aquí que les paraules que tot és lent en la ciència, ja les començo a entendre. Per la gent que no sapiguen el que és el comitè ètic d'experimentació animal, doncs us puc dir que és la inquisició, quina por que vaig passar al presentar el meu projecte, pensava que el resultat del judici era "a la hoguera". Sort que la Marta va lidiar amb tot aquell personal i em va ajudar a preparar i passar el projecte i és que senyors/es que llegiu aquest rollo, si algun dia necessiteu saber alguna cosa sobre animals, fisiologia, comitès, cirurgies, la Marta és com una enciclopèdia. Marta, aquesta tesi té en gran part la teua ajuda, són molts projectes i idees que hem portat a terme que sense la teua ajuda no hauria estat possible.

Durant aquests primer any del 2004 vaig treballar sol, als matins compartia despatx amb la Judit, a les tardes estava sol. A més a més si estava a l'estabulari també estava sol tancat a la sala 5, mare meva quantes hores he passat allà dins.

Un dia en ple silenci, s'obre la porta, i ..." Hola, que haces? Puedo mirar? Me das un abrazo?" Y este mimosín quien será? Doncs bé aquest personatge tindrà gran importància pel laboratori, però no ara sinó als voltants del 2008. Si necessites algú perquè t'animi i t'acompanyi en qualsevol moment de soledat, sempre està el Mario per fer-te una abraçada; el pots trucar quan vulguis inclús a les 3 del matí perquè vingui a fer una copeta a la disco! Vaya crack!

Qui diu que dins de l'estabulari no es poden fer amiguets? A mi només em coneixia la gent que entrava a l'estabulari, però es fan amics sense veure com són, si si, no és broma, entre mascaretes, gorros, esclops i pijames fets a mida el que al final tens és amistat sense prejudicis, coneixes a la gent dins de l'estabulari per la forma de treballar, la sala on es posen, però en quant surts d'allà ni els reconeixes! Al cap del temps en surten molts com la Carmeta, Marcos, Carmen, Mario, Lidia, Jordi Bovè (àlies Bovins), Cèsar, Francisco, Raquel, Àlex, Montse, Cristina, Marielle i Marta de l'estabulari.

Al final pim pam, shunts vienen shunts van i sembla que ja ens podíem plantejar començar, però no, la ciència fa que tot vagi lent (no recordo qui m'ho va dir per primera vegada!!) i ara m'havia de convertir en expert en neurofisiologia animal i per ser-ho havia de recórrer a una especialista, quins inicis eh Núria Ragner, al final seré doctor abans que tu, però com ja saps aquesta tesi és part essencial teva, ja que la

neurofisiologia és la base. Moltes gràcies pels consells, ajudes i explicacions senzilles d'aquest món tan complex.

Durant l'agost del 2004, el meu iaio va morir deixant un fort forat, ja que la meva àvia materna ho havia fet al 1996. N'estava molt de mi, em cuidava i n'estava al corrent de tot el que feia, el meu confident, i junt amb ell, érem els inquilins de l'àtic (pis de dalt de casa dels meus pares).

El laboratori d'insuficiència hepàtica i malalties metabòliques era el meu cap, el Joan i jo, vaya doble skull format sobretot en la confiança que sempre ha tingut el Joan cap a mi i això ha fet que respongués de la millor manera que he sabut, hem passat èpoques més dures, però crec que ens ha sortit prou bé, no?.

Gener del 2005, el despatx ja estava arreglat, ens el van deixar més mono!! Les taules eren poiates reciclades, armaris i prestatges d'un laboratori groc! Amb la Judit amb qui s'ha creat una amistat ben forta, passi el que passi, encara que entri el Dr. Baselga fent crits, em vaig quedar de pedra sense saber que fer ni dir, ho recordes Judit? casi em pixo a sobre!

Doncs en aquell despatx va venir la Bea, just al costat meu, mirant les vistes d'un mur de totxo vermellenc entre els vidres bruts pels coloms. Quines tardes de conversa, quins riures, quin silenci, quins plors i quants journal club i quanta feina es va fer en aquells petit espai perdut a les entranyes de l'hospital general. Als matins estava amb la Judit i a les tardes amb la Bea, gràcies a les dues!

Però com es diu, on hi caben tres hi caben quatre, i el Nico va venir a fer el seu post-Doc a Barcelona, i així ja deixava de ser un monosíl·lab a l'estabulari! Ja tenia el recolzament d'una bèstia parda, i amb el Nico es van acabar les contemplacions, els descansos de 10 minuts i els dinars d'una hora; on vas si pots dinar en 15 i treballar 45!! A més a més, no podia escollir un model animal que no fos el de fallida hepàtica aguda; si el dia té 24 hores, doncs perquè no pots treballar 18? Així que com podeu veure el Nico i jo mateix varem treballar molt, però varem compartir moltes altres coses com futbol, runnings, sopars, viatges, congressos en els que vaig tenir la gran oportunitat de conèixer al Nico, la persona que més clar té les coses i que com a bon francès, tot el que comprava era de França o empreses franceses.

Fixa't tu per on, algú començava de nou a treballar al Laboratori de Malalties Hepàtiques amb el Joan Genescà i la Maria Martell, la Mar Coll. Jo tan sols coneixia al Joan, però sabia de l'existència d'un laboratori que forma part del servei on hi treballen tres grups diferents. La Mar és la primera becària del Joan i la Maria que iniciaven una nova línia de treball amb la hipertensió portal. A la Mar tan sols me la van presentar, així que fins que no la conegui no en parlaré, però si que us puc avançar en aquesta història, que ens hem fet amics.

El 5 de setembre del 2005 ja s'acosta, un dia màgic, bé millor dit un cap de setmana màgic. Com si d'una boda gitana es tractés, la Mar i jo ens varem casar als jardins de la Ciutadella de Pamplona un divendres a les vuit del vespre rodejat de 105 amics i els familiars més pròxims, però és que les celebracions es van fer durar fins al diumenge. Boda, festa, dormir, sopar a la sidreria al dissabte, festes als pobles pròxims i és que,

què us haig d'explicar del meu poble navarrico, un petit poble anomenat Aoiz, banyat pel riu Irati, rodejat de muntanyes i on viuen amics de veritat, amics que encara que passin els dies i no els vegis, o no et truquis saps que són allà i que no et fallaran mai. I on viuen familiars tan especials com el Miguel, la Maria Luisa, el Iosu i l'Ibai que m'han acollit a casa seva com si fos un fill o un autèntic germà i això no s'oblida mai.

Quina gran boda, rodejat dels amics del poble, dels amics de rem com el Riki, el Jaime, el Jordi o la Cristina amb qui he suat cada entrenament, amb qui m'he abraçat a cada derrota i amb qui he plorat cada victòria, amics de Barcelona, els anomenats d'Horta i amics de biologia amb qui cada any que passa som millor grup (amics de veritat, difícil de trobar en aquests temps), pares, mares, tiets, sogres i tot el repertori familiar i com no de la meva dona, que a pesar de la rocambolesca història que ens envolta, cada dia que passa som més forts i ens estimem més. Les arrels que subjecten el nostre tronc ja han estat sacsejades i el resultat ha estat que encara sigui més robust, un tronc que no para de créixer.

Com ha crescut el laboratori en molt poc temps, d'una època una mica fosca, s'iniciava un nou període de temps, s'iniciava una època daurada del Lab.

La Miss Neck va arribar al laboratori als voltants del gener del 2005, va arribar una nena petita, bufona i eixerida que fent xerinola no ha perdut mai el seu somriure, crec que no conec a ningú tan feliç (bé potser la Nahia s'hi acostava però encara no és el seu torn). Ella tota contenta feia la seva recerca centrada en la part més molecular de la ciència, però els nostres camins es van trobar quan la Mar va haver de fer models animals. I ara ho dic amb veu baixa, ella sempre deia que no treballaria amb rates, que li feien molt de fàstic. Encara em cauen les llàgrimes de recordar el primer dia a

l'estabulari a la sala 5. Casi plora de veritat, quins crits que feia, semblava l'Hotel Kruguer. Potser va ser perquè li vaig posar una rata a les espatlles i al girar-se es va trobar cara a cara amb els bigotis d'un petit rosegador blanc. La Mar i la Tere treballaven juntes amb les ratetes, li preparàvem les rates cirròtiques i elles extreien mostres, però abans de sacrificar-les, les dormien, les acariciaven, els hi posaven un coixí perquè no els fessin mal les cervicals.... tot un ritual per expiar les seves culpes per matar-les (perdó Marta y Àlex, eutanasiar-les). De la Mar es pot escriure un llibre, ja que té mil coses per explicar sempre, no calla, però ella és innocent, feliç, senzilla, olímpica, treballadora i feminista amb qui he pogut gaudir molt dins i fora de la feina. M'ha agradat això de l'època daurada del laboratori, així que aquests són els inicis i mica en mica anirà arribant la gent fins a formar el grup que hi ha ara.

Com ja he dit al laboratori hi ha tres grups, i del que no he dit res és del Josep Quer, qui s'ha guanyat el sobrenom de Tío Gilito, i és, no hi ha ningú tan bo com ell, té cura de tots, és comprensiu i honest. On s'ha vist un jefe de laboratori que es preocupi tan perquè no ens falti res, que no ens faltin sopars, paelles o qualsevol mena de material. Doncs bé, el Dr. Quer va agafar una becària, qui amb els seu to de veu canari no queda indiferent, la Maria Cubero, dedicada a la seva pantalla de Matrix i amb les seves frases típiques com "Damirin que eta haciendo?" ens ha animat sempre a tots, mai li falta un somriure o unes classes magistrals de com viatjar a casa o demanar cursos d'estadística a Hawaii; haig d'aprendre moltes coses de tu MariaQ.

Arribem al 2006 i al març per fi surt publicat el meu primer article, sembla impossible que tant d'esforç s'acabi en cinc pàgines d'una revista, però pel que veig, això, serà

tota la meua vida, obro la porta, entro a l'habitació, busco a veure que hi ha i tanco la porta, obro una altra i a seguir buscant dins de les habitacions que es van obrint. Sempre he admirat aquesta capacitat per buscar noves portes del Joan, trobar relacions, recordar-te d'un article, d'un autor, fer que formis part del brain storming que fas, és fascinant veure't treballar.

S'acostava el dia, però el Nico i jo ens fèiem de pregar i no va ser fins al setembre-octubre del 2006 que no ho varem fer. No se si era la por a lo desconegut o simplement que sortir del "zulo" per pujar al Laboratori de Malalties Hepàtiques era com sortir de l'ou que ens tenia protegits. Al final, el Joan ens va obligar a sortir del forat amb l'ordinador sota el braç cap a l'Institut de Recerca. Maria, no lo entiendo ni yo porque no subimos antes, así que aunque me lo preguntes más veces no sabría que decirte. Marie, mon amour, com ens has cuidat, com m'has cuidat durant la meua estància al laboratori. M'ha fet molta il.lusió que poguessis estar en el tribunal de la meua tesi, encara que sigui de suplent, qui millor que tu que saps el que hem fet. Mira que tenim fotos junts i sempre et queixes que surts malament, però en tenim una d'espectacular a la boda de la Mar que descriu perfectament molt més del que puc expressar en aquestes lletres. Gràcies de tot cor per ajudar-me en tota aquesta petita història que ha durat més de 7 anys.

El 6 novembre del 2006 podria ser un dels moments més feliços, un dia que em va canviar la meua vida. De ser una bala perduda a tenir sota la meua responsabilitat una nena, la Marina Oria Rutllant, tal i com es diu, fruit de l'amor d'una parella, però no fa

falta explicar a ningú com es fan, no és massa difícil, després es sumen altres factors com la sort, el moment

No puc explicar amb paraules uns sentiments tan intensos, en quan la vaig tenir als braços no vaig poder dir res, vaig mirar als metges i em vaig posar a plorar, encara ara quan recordo el moment, o quan escric aquestes paraules se'm posen els ulls vidriosos.

És la Marina, part de la Mar i part de mi, que a partir d'aquest instant passem a ser la seva mami i el seu papi amb qui varem compartir, compartim i compartirem una vida plena de sorpreses, ensurts, plors, jocs i rialles..... quina sort que tinc.

Ja han passat gairebé dos anys des que el Nico va arribar al grup, però la feina el retorna al seu país del que va sortir molt jovenet, torna a França per muntar la seva vida allà. Ens deixa un bon treball i una bona manera de treballar. Tornava a estar sol, però no durant molt de temps ja que al juny del 2007 va arribar la Laia Chavarria, va venir per obrir una nova línia de treball que al Joan sempre li ha agradat molt, la Ressonància Magnètica. La primera vegada que la vaig conèixer va ser a l'estabulari, si si, amb totes les seves gales, gorro, polaines, mascareta i bata de color verd, la millor manera per no tenir prejudicis, però això si, els seus ulls no deixen indiferent a ningú. Alguns li diuen Laia, altres Laila però per nosaltres és la RoboLaia, és un dels nostres, com la pel·lícula de Martin Scorsese, una més del grup, la noia del grup com diuen a polseres vermelles, acostumada a estar entre homes, reservada en la seva esfera personal, que lluita pel grup, una noia que encara no s'ha quedat calba tot i portar més de tres anys darrera d'un iman, una flor que s'ha fet estimar com la que més dins del grup.

El lab ja no era una parella, sinó un trio, però el cap del Joan encara tenia més idees per seguir explorant, quina ment privilegiada que no descansa mai. Així que li quedava un últim cartutx per disparar i el que ens faltava a la Laia i a mi era un post-Doc que portés la línia més molecular. Heus aquí el hombre perfecto, un gentleman, el hombre del bañador amarillo va venir el grup, el Lluís Palenzuela o Luigi encara que tots sabem altres molts sobrenoms que li han posat. Heus aquí l'home més metòdic i purista que hi ha en la recerca molecular, això si que són protocols, triplicats i controls perquè tot surti perfecte, amb una mica de diògenes però tan se val, la resta de nosaltres tampoc som extremadament maniàtics, i però la sala 5 de l'estabulari que no la toqui ningú!.

Quantes aventures, històries, congressos que hem compartit, inclús la seva despedida de solter vestit de tenista o la seva boda fent el seu moviment peculiar de cames tocant l'acordió, MariaQ no te rías de sus piernecillas tiqui-tiqui-tiqui, que te veo!. Ell ha estat qui ha posat el punt de cordura al grup, qui ha fet treballar de forma precisa i metòdica a tots, excepte quan es va produir l'Iniestazo el 6 de maig del 2009. Sap que no me m'oblidaré mai d'ell, hem cremat una etapa junts, una etapa intensa que no podria deixar indiferent a ningú i menys un cop et varem veure amb el banyador groc.

A mitjans de l'època daurada ens trobem, i el Josep no volia ser menys, així que va contractar a en Daniels, Damier (digueu aquest tota l'estona repetidament), o Damrio, bé, és igual el cognom és Cesic, Cehic, ostres tu Damirin, és que no deixes indiferent a ningú i més quan arriba al laboratori tot engominat amb el seu somriure profident, però que no us enganyi que és un pitufo gruñon. A pesar de les seves queixes i que el seu cotxe només deu tenir primera i sisena, és un autèntic amic. Ja sigui per coses

bones o dolentes he tingut la gran sort de compartir moltes estones amb ell, de poder conèixer-lo, hem fet esport, hem xerrat de mils temes diferents, hem buscat la seva jaqueta negra junts i hem rigut i rigut encara més.

Els grups anaven incrementant el seu nombre de persones, i és clar, la Maria i el Joan, no podien ser menys, així que van decidir contractar una tècnic, ostres, em sembla que aquesta noia la conec. Va fer l'entrevista i vaig sortir corrents a preguntar-li si la coneixia d'alguna cosa i..... bingo, havia estudiat amb mi biologia a la universitat encara que no havia parlat mai amb ella, que en soc de ruc no? Però és que en aquella època vaig estar entrenant, remant, entrenant i remant encara més així que entenc que no ens trobéssim massa a la carrera. Però que us puc dir de la rinxols d'or, doncs que a part de forjar mica en mica una amistat que semblava retrobada del passat, és com si pel sol fet d'haver estudiat junts i de tenir amics en comú, ja ens donava un punt de confiança mutu. L' Imma ha estat la meva confident, qui ha escoltat totes les meves històries sense mai queixar-se, ha estat la meva entrenadora personal, he confiat més en el que ella m'ha dit que no pas en el meu entrenador quan he sortit a nedar. Mentre nedo, encara que l'entrenador em digui alguna cosa, pensoque em va dir l' Imma que havia de fer? I és que seria el laboratori sense la Raurell, està bé, potser dinaríem tots més tard perquè la nena té gana, però que seria una festa sense la Suellen amb el seu Martini i la música de Coldplay de fons.

2008, un altre any en el que per fi publiquem el que durant anys hem estat treballant, un nou mètode que no podem patentar ja que el varem publicar primer. Però és el treball que més ens identifica, la base de la línia de treball del Joan i meva, una nova

eina que ens obre les portes a molts més estudis futurs. Una metodologia que dona un sentit i que permet tancar aquesta tesi. Per mi tot un èxit a base del treball ben fet.

“Marcus dame un abracico anda” això passava l’abril del 2008, tres mesos després que l’Imma arribés al laboratori. Que tal Mario como estás? Oye tu no necesitarías a un técnico? La veritat és que com el grup estava en la seva època més àlgida i el Joan estava una mica cansat del quartets va decidir buscar a un tècnic, el chico que trabajaría para todos. Doncs el Mario em va presentar al Jordi, encara que a mi m’agrada més dir-li Jorx. Si el Mario me’l recomana i ell n’està d’acord no se hable más. El que primer em va sorprendre del Jordi és que no podia caminar amb ell, tota l’estona el paraven i parlaven amb ell, el saludaven, era com estar amb la persona més popular del cole i joestaba con él! Em va preguntar que si era nou, però la veritat és que normalment estic a l’estabulari i quan surto vaig per l’ombra. Però és que el Jorx va ser com un flechazo, tot estava “correcte” des del principi, semblava com si ens coneixéssim de tota la vida, així que va haver bon enteniment des de l’inici. El grup d’encefalòpates ja estava al complet i com a un llibre d’aventures, a partir d’aquest moment és quan millor ha funcionat tot i més capítols boníssims hem anat llegint tan ràpid que ara em costa recordar tants i tants bons moments. Hem anat a congressos amb la Rita i la Maria com a València, que quina sort que tenim que el jefe sempre té unes monedes a la butxaca per pagar el “tasis”, hem anat a Madrid on, a pesar del que diguin les males llengües, varem ser els que més xerrades varem presenciar i on els nois del laboratori ens varem agafar les mans com bons companys de feina. El Jordi ha estat l’ànima de la festa, del retrobament, de fer amistat, de xerrar, de fer pinya, indispensable pel grup, ja que ha estat també el nexa d’unió entre tots els estudis.

Hem estat treballant dia i nit a l'estabulari, hem guanyat sis títols escoltant la ràdio a l'estabulari, hem guanyat un mundial posant Roja Directa. Però és que treballant mai ha tingut un no per resposta, ha estat a cada experiment que hem fet, fins l'últim minut encara que fos de matinada. Mai perd la seva forma de ser, ni perd els seus costums de sortir a pasllejar com els avis. Saps que ets part important d'aquesta tesi, saps que te l'has treballat com jo, cada minut de feina i cada hora sense dormir.

El 2009 ja ha arribat i la Nahia porta la felicitat, i és que si la Mar es felix de mena, la Nahia (millor dit deseo) només fa que riure i sempre té una resposta idònia per tots els moments ...si, de verdad? Que guay!...i és que la Nahia com diu ella, si que és guay, és com un dofí preparat per saltar les onades, no vol estar tancada en un aquari i sempre preparada per sortir al mar per ser lliure.

I ja som al complert, cada boig amb les seves bogeries, cada grup amb el seu tema, però qui diu que l'aroni no es porta bé amb el síndrome hiperdinàmic, són amics de veritat i saben que les mutacions de la regió NS3 del virus C estaran allà per fer-los companyia, sense dubtar-ho, ja sigui a la feina o fora prenent el sol a l'heliport i que la LOLA, OP, capsaicina o LDOPS, per noms diferents i jefes diferents que tinguin sempre romandran amics al Laboratori de Malalties Hepàtiques.

Durant el 2009 i pel meu aniversari la Mar i jo varem viatjar a New York, la ciutat dels somnis de qualsevol persona, on cada racó t'és conegut encara que no hi hages estat mai. La Bea, com no la Bea, que ja havia defensat la tesi l'any anterior, ens va deixar estar amb ella al seu apartament, compartir el seu espai i les seves vivències newyorkines, l'hauríeu d'haver vist, estava radiant, en una ciutat feta a la seva mida.

Són molts records gravats en centenars de fotos, vídeos, e-mails, articles, però és que el que queda gravat al cor, no deixa indiferent a ningú. Quin laboratori tenim ara...però encara que sembla que ara trontolli, ja sigui perquè marxa el Lluís, perquè la Mar serà mami i marxarà a un altre laboratori o jo mateix que m'estic organitzant per marxar a Londres; n'estic ben segur que l'esperit del lab i la dinàmica de treball i felicitat (que ja us dic jo que són compatibles) que hi ha ara no desapareixerà. A més a més ara es comencen a renovar neurones amb la Sarai, tècnics que venen i van com la Sílvia, Transi o Eulàlia i d'altres que aniran arribant. Els grups van creixent, com la Laura i la Maria infermeres dels grups d'hipertensió portal i d'encefalopatia, que van sempre juntes com el Zipi i Zape amb les que compartim feina i tinc la gran sort de conèixer i de ser amic.

Ara venen anys de molt treballar, estabulari, experiments, reunions, congressos, nits i nits fent experiments per la Laia, Lluís i per mi, sempre amb l'eficaç ajuda del Jordi. Que n'ha sortit de feina! Però que bé que ens ho hem passat i per mi això, no té preu. No explicaré totes les anècdotes que han passat dins i fora de l'estabulari perquè tots les recordem amb un somriure als llavis.

Ja s'acaba el 2010 i per fi ha sortit a la llum l'últim article publicat que forma part d'aquesta tesi, un treball que varem iniciar el Nico i jo i que el varem acabar tot el laboratori d'encefalòpates, la Laia, el Lluís, el Jordi, el Benja (que només va estar un mesos, però ja és com un més del grup) i el cap de tots nosaltres, el Joan.

El 15 d'abril del 2010 va morir el meu avi patern, la llei de vida s'imposava i va fer que en aquell instant em quedés sense avis. Aquells que han creat i han vist créixer a tota la família. Vaig poder anar al poble a enterrar-lo tal i com m'hagués agradat fer per la meva àvia.

2011 i el final del trajecte s'acosta, amb un últim article enviat on testem un nou fàrmac amb el nostre nou mètode que tant ens va costar crear. Ja em dispo a defensar la tesi tan bé com sàpiga, amb il·lusió i entusiasme com si fos el primer dia, nerviós, encara que digueu que no se'm nota (n'estic, us ho ben asseguro) i seré dret davant de tots vosaltres, els que heu vingut i els que no heu pogut, ajudant-me a presentar tot el que hem fet junts. Aquesta tesi és part de tots vosaltres, amb les vostres idees, ajudes, somriures, aplaudiments, rialles i la vostra companyia, amistat i amor incondicional. Gràcies per ajudar-me en el meu camí i encara que els nostres camins es separin, ben segur que es tornaran a trobar, i cada petjada que hem realitzat junts no s'oblidarà.

Per finalitzar aquests agraïments tan extensos i una mica diferents, i si heu arribat fins al final, veure-ho que les darreres paraules les dedico als tres pilars més forts que he tingut:

-A tu Joan, per la teva confiança dipositada, per tot el que m'ensenyes (cada reunió és una xerrada magistral), per tot el teu suport en els bons moments i en els dolents encara que no fossin de caire professional, per deixar-me crear com a científic i com a persona, pels entrenaments que hem fet junts, pels viatges tan enriquidors, per tota la

feina que hem realitzat, pels set anys més macos i excitants de la meva vida, pels set anys recollits en aquest llibre (tesi).

-A la família, a la que està en els bons moments i en els no tan bons, a la que t'estima encara que no estigui d'acord amb tu, la que t'aconsella i t'ajuda sense esperar res a canvi, la que mostra amor a cada minut. La família que sempre m'ha recolzat i ajudat en cada moment de la meva vida i com no en aquest anys de recerca científica. Sense ells hauria estat molt difícil. La mare que ara ja ha heretat el nom de iaia (lleï de vida), el pare (també és l'avi ara), la meva germaneta Irati, els meus tietos Dani i Elena amb la Carla i la Clàudia, los tíos Miguel i M^a Luisa, amb els meus cosinets-germans Ibai i Iosu, els tiets postissos Encarna i José amb el Ferran i l'Eva i com no als iaïos i avis que seran sempre amb mi.

-I la meva família, a la que s'ha creat durant els transcurs d'aquesta tesi, vaig entrar com a solter i en sortiré com a casat i amb una filla; és la meva família. La Mar, per qui vaig lluitar amb cor i ànima per poder estar al seu costat, qui m'entén en tot moment, qui m'ha permès entrenar, estudiar i investigar, qui m'ajuda cada dia per ser millor persona, qui em té enamorat i a qui admiro cada dia que passa. I la Marina, qui ha desbancat a la Mar com a reina de la casa, la nineta dels meus ulls, qui em té el cor robat i que sense saber-ho, m'ajuda a evolucionar en el meu camí cap a ser millor home i millor pare.

Us estimo a tots.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Martina', written in a cursive style with a long horizontal stroke extending to the left.

INTRODUCCIÓ

3 INTRODUCCIÓ

3.1 Aspectes generals de l'encefalopatia hepàtica

L'encefalopatia hepàtica és una síndrome neuropsiquiàtrica que consisteix en unes alteracions de la funció del sistema nerviós central degudes a insuficiència hepàtica o a la presència de col·laterals porto-sistèmiques. Aquesta definició tan general reflecteix l'existència d'un ampli espectre de manifestacions neurològiques associades a diferents malalties hepàtiques (Adams and Foley, 1953). Un punt en comú que tenen totes elles és la possible reversibilitat de les manifestacions neurològiques un cop les alteracions al fetge són corregides, així com la importància de les col·laterals porto-sistèmiques que causen la derivació de sang provinent de la circulació esplàncnica a la circulació sistèmica. L'encefalopatia hepàtica s'ha de diferenciar de la concurrència de símptomes neurològics i hepàtics secundaris a un mecanisme patogènic comú, com el dany cerebral i la lesió hepàtica produïts per alcohol o per coure (malaltia de Wilson). L'encefalopatia hepàtica s'ha de diferenciar també de les alteracions neurològiques produïdes directament per l'acumulació de bilirubina, hipoglucèmia, alteracions en la coagulació sanguínia o altres alteracions ben definides que són secundàries a la insuficiència hepàtica.

3.2 Classificació de l'encefalopatia hepàtica

L'encefalopatia hepàtica s'associa a malalties greus del fetge. En funció del tipus de malaltia hepàtica es classifica en tres formes clíniques (Ferenci et al., 2002):

- Tipus A: Encefalopatia hepàtica associada a fallida hepàtica aguda, com a resultat d'una inflamació severa i/o necrosi del fetge de ràpida evolució. Les causes més freqüents de fallida hepàtica aguda (fulminant) són la intoxicació per paracetamol

i les hepatitis virals agudes, (hepatitis B, hepatitis A). També poden causar hepatitis fulminant la intoxicació per *Amanita Phalloides*, la reacció idiosincràtica a fàrmacs o un nombre variat de malalties. Aproximadament, una tercera part és de causa desconeguda. L'hepatitis aguda fulminant és poc freqüent. S'estima que a Espanya tenen lloc 100 casos anuals (Escorsell et al., 2007).

- Tipus B: Encefalopatia hepàtica, com a resultat de col·laterals porto-sistèmiques sense malaltia del parènquima hepàtic, com les que apareixen després de trombosis portal o anomalies congènites de la circulació hepàtica. Aquest trastorn són molt poc freqüents, i la majoria d'ocasions no causen encefalopatia (Minguez et al., 2006).
- Tipus C: Encefalopatia hepàtica que acompanya a la cirrosi hepàtica. L' etiologia de la cirrosi hepàtica pot ser variada com per alcohol, infecció vírica, obstrucció biliar, drogues o toxines. La pressió portal incrementa com a resultat de la cirrosi; com a conseqüència de la hipertensió portal es formen col·laterals porto-sistèmiques que permeten el pas de toxines d'origen intestinal (com exemple amoni, manganès, citoquines) cap a la circulació sistèmica. La cirrosi hepàtica és una malaltia freqüent i és la principal causa d'encefalopatia hepàtica. Les causes més habituals de cirrosi hepàtica són el consum excessiu d'alcohol i les hepatitis virals, en especial l'hepatitis crònica C. La cirrosi hepàtica és responsable d' aproximadament 7000 morts i 1000 trasplantaments de fetge anuals a Espanya.

3.3 Manifestacions neurològiques

L'encefalopatia hepàtica que apareix en la fallida hepàtica fulminant (tipus A), progressa ràpidament des d'un estat de confusió lleu a coma profund en poques hores. Un aspecte característic és el desenvolupament d'edema cerebral que pot causar la mort per herniació del cervell secundària a un increment de la pressió intracranial (Kato et al., 1992; Traber et al., 1987).

L'encefalopatia hepàtica que s'observa de forma secundària a col·laterals porto-sistèmiques (tipus B) o a la cirrosi hepàtica (tipus C) pot tenir dues formes de presentació:

- a) L'episodi d'encefalopatia: un síndrome confusional agut. Freqüentment comença amb alteracions dels patrons de son i trastorns de la personalitat, seguit per alteracions motores que progressen cap a la letargia, estupor i coma. Són freqüents múltiples episodis, habitualment precipitats per algun factor com una hemorràgia gastrointestinal o l'ús de sedants. La duració de l'episodi d'encefalopatia és habitualment d'uns dies. Un cop s'ha superat, habitualment amb la correcció del factor precipitant, el pacient retorna a un estat similar al previ, sent capaç de ser autònom i portar una vida normal. S'estima que en Espanya poden tenir lloc uns 10.000 episodis anuals d'encefalopatia hepàtica, dels quals 5.000 són reversibles.
- b) L'encefalopatia hepàtica persistent és un trastorn cognitiu crònic que inclou des d'alteracions cognitives lleus a la demència. La seva forma més lleu i alhora la més freqüent s'anomena encefalopatia hepàtica mínima (Quero et al., 1996). Es caracteritza per alteracions neuropsicològiques en proves d'atenció i psicomotores.

L'encefalopatia hepàtica mínima té un efecte negatiu en la qualitat de vida (Tarter et al., 1984), disminueix la capacitat de realitzar una labor manual (Kardel et al., 1970) i incrementa el risc d'accidents de tràfic (Schomerus et al., 1981). Es considera que l'encefalopatia hepàtica mínima és un trastorn molt freqüent, s'ha estimat una prevalença del 50% en pacients amb cirrosi hepàtica, pel que podria afectar a 20.000 persones a Espanya.

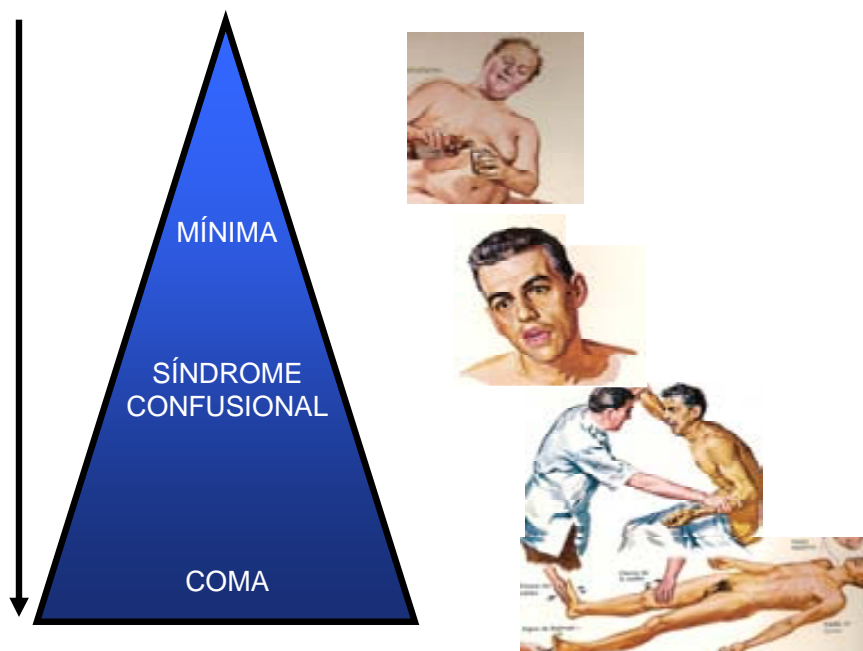


Figura 1: manifestacions neurològiques en l'encefalopatia hepàtica

3.4 Fisiopatologia de l'encefalopatia hepàtica

Es considera que l'encefalopatia hepàtica es desenvolupa per l'efecte d'unes toxines que no són eliminades pel fetge malalt (Butterworth, 1996). L'element patogenètic fonamental es l'accés de sang del territori esplàncnic, que en situacions normals es

conduïda per la vena porta, a la circulació general. Aquesta sang no és aclarida pel fetge i presenta una sèrie de substàncies que exercirien un efecte tòxic en el sistema nerviós central.

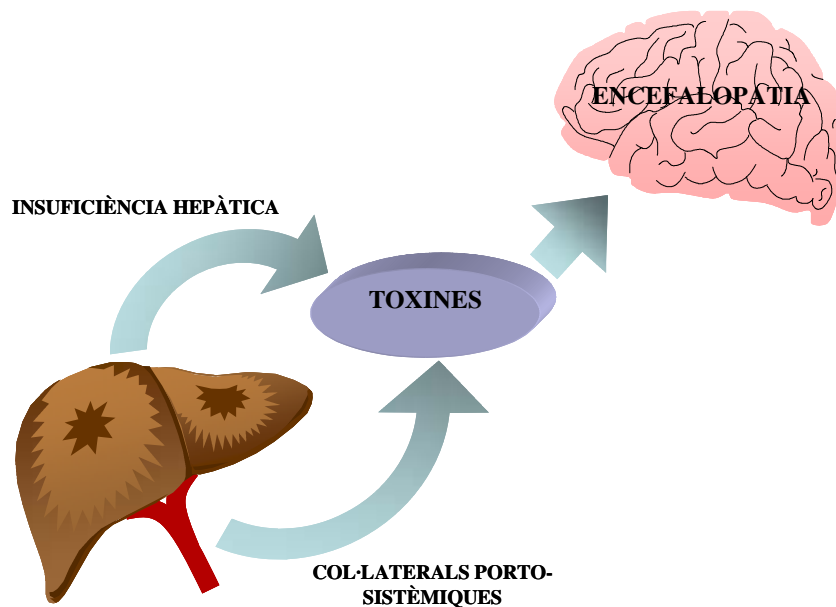


Figura 2: Esquema de l'efecte de tòxic en el cervell de les substàncies provinents del fetge i/o del territori esplàncnic per la presència de col·laterals porto-sistèmiques

3.5 Metabolisme de l'amoníac

La principal toxina que es considera responsable de l'encefalopatia hepàtica és l'amoníac. L'amoníac es genera en els intestins provinent dels compostos nitrogenats de la dieta, per la desaminació de la glutamina per la glutaminasa i pel metabolisme de les substàncies nitrogenades per part de la flora colònica. En condicions normals, l'amoníac es metabolitza en urea en el fetge i per la formació de glutamina en el múscul i en els astròcits (Cordoba and Minguez, 2008).

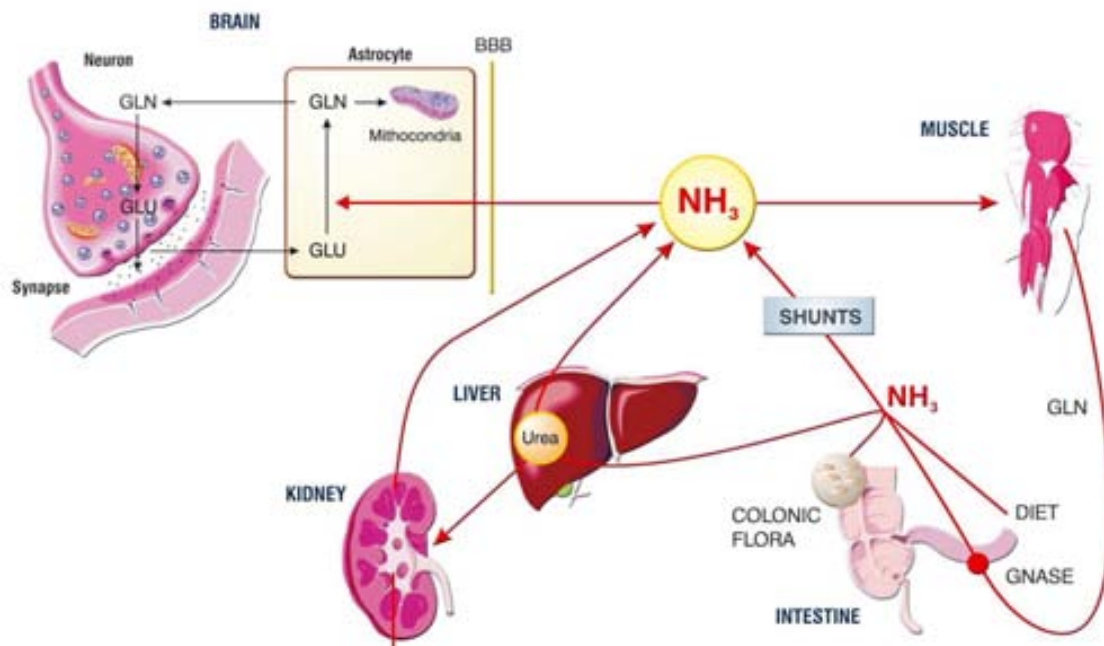


Figura 3: Tràfic entre òrgans i metabolisme de l'amoniac *Cordoba J, Sem Liv Dis 2008*

Les hipòtesis actuals postulen que l'amoniac ocasionaria alteracions en la neurotransmissió i que aquestes conduirien a les manifestacions clíniques de l'encefalopatia (Butterworth, 2000). Les principals alteracions consisteixen en un increment del to GABA (Cauli et al., 2009) i en diverses alteracions del sistema glutamatèrgic: increment de la concentració extracel·lular de glutamat, disminució dels receptors post-sinàptics, disminució del transportador astrocitari, alteracions post-receptor (Butterworth, 1997; Chan et al., 2000). S'ha proposat que l'amoniac podria interferir amb el trànsit entre neurona i astròcit de glutamat i monoamines (Butterworth, 1993), que són substrats i compostos neuroactius en molts sistemes de neurotransmissió excitadora. A més l'amoniac tindria efectes agonistes sobre la transmissió GABA, que és el principal sistema inhibitor.

3.6 Edema cerebral

Una hipòtesi recent postula que hi unes alteracions del tràfic de neurotransmisors entre neurona i astròcit degut a l'increment del volum d'aigua intracel·lular a l'astròcit (Haussinger et al., 2000). D'acord amb aquesta hipòtesi el metabolisme de l'amoniac en glutamina a l'astròcit conduiria a un increment de l'osmolaritat intracel·lular, que incrementaria l'aigua intracel·lular i donaria lloc a canvis en la funció astrocitària. La conseqüència d'aquest canvis és la modificació de la neurotransmissió a nivell de les sinapsis. Aquesta hipòtesi, que ha estat recolzada per troballes de ressonància magnètica en pacients (Cordoba et al., 2003), no té una confirmació experimental.

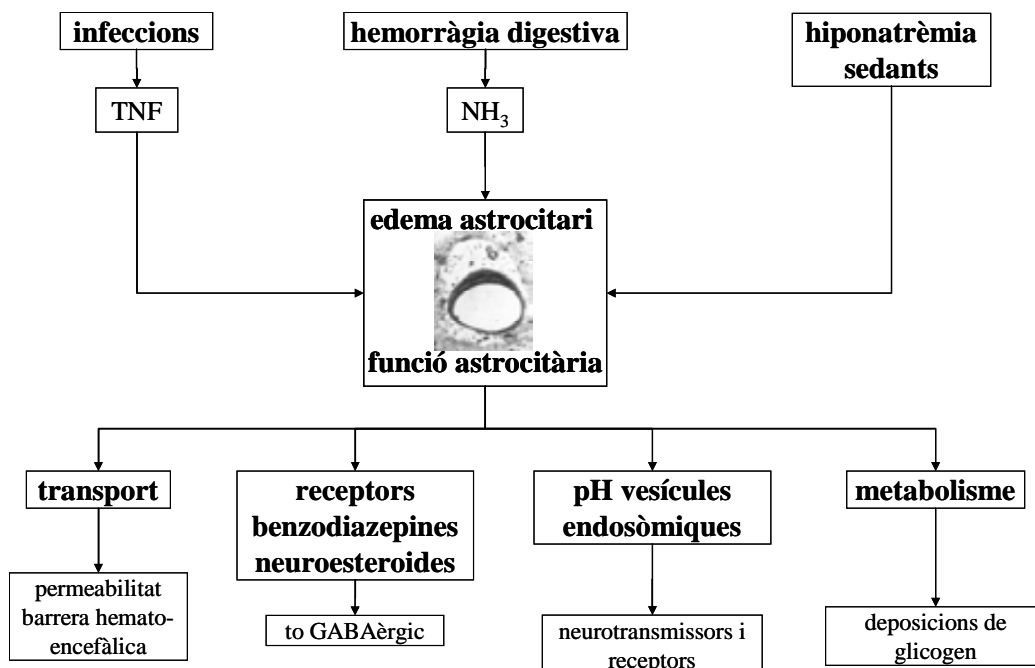


Figura 4: Principals mecanismes proposats on els factors precipitants poden provocar encefalopatia hepàtica induint alteracions en l'homeòstasi i la disfunció de l'astròcit.

3.7 Alteracions motores

Una manifestació freqüent de l'encefalopatia hepàtica és la presència d'alteracions motores. Les més comunes són l'asterixi i els signes piramidals, com els reflexes tendinosos exagerats i el signe de Babinski (Adams and Foley, 1953). S'ha relacionat la intensitat de les alteracions piramidals amb la gravetat de l'encefalopatia hepàtica (Andrefsky JC, 1997), pel que es podria utilitzar la funció d'aquesta via motora com un indicador del grau de disfunció neuronal present a l'encefalopatia hepàtica. Estudis realitzats amb ressonància magnètica en pacients han demostrat signes d'un increment de la intensitat de la senyal T₂ a la via cortico-espinal que s'associa amb els trastorns de funcionament d'aquesta via (Rovira et al., 2002). Aquesta hiperintensitat s'ha atribuït a edema astrocitari a nivell de la via cortico-espinal. Aquests resultats donen suport a la hipòtesi que l'edema astrocitari causa disfunció neuronal. Les fibres cortico-espinals consisteixen en unes fibres mielinitzades de conducció ràpida que s'originen en el còrtex motor i que realitzen sinapsis amb motoneurons espinals a través de neurotransmissió glutamatèrgica (Shaw and Eggett, 2000). D'aquesta manera les alteracions en la funció de la via piramidal podrien ser explicades per un empitjorament de la neurotransmissió glutamatèrgica secundària a edema astrocitari i reconciliar aquestes troballes amb les descripcions de trastorns de la neurotransmissió dependent de glutamat a l'encefalopatia hepàtica (Butterworth, 1997).

3.8 Tracte motor en la rata

Existeixen dos tractes descendents destinats al control motor en la rata: el tracte cortico-espinal i el tracte rubro-espinal el primer descendeix des del telencèfal fins a la medul·la espinal i el segon des del mesencèfal fins a la medul·la espinal (Paxinos,

2004). La majoria de les neurones del tracte cortico-espinal es localitzen a la capa 5 del còrtex motor primari. Aquestes neurones projecten cap a la regió cervical i des del tronc cap a la regió lumbar. Les neurones del tracte cortico-espinal no estan restringides al còrtex motor primari, sinó que també són presents a l'àrea motora suplementària, còrtex parietal, còrtex prefrontal i còrtex infra-límbic. El tracte cortico-espinal pateix una decussació a la medul·la caudal i descendeix per la base de la columna, encara que hi ha fibres que fan la decussació al funicle ventral. Els axons del tracte cortico-espinal acaben en totes les làmines espinals contralaterals, sobretot a entre les làmines 3-7 de l'asta dorsal on fan sinapsi amb les motoneurones. El tracte cortico-espinal juga un paper en el control del moviment, però no és essencial pels moviments fins de les extremitats.

El tracte rubro-espinal consisteix en els axons del conjunt de neurones magnocel·lulars i parvocel·lulars del nucli vermell que projecten cap a la medul·la espinal. Hi ha una organització somatotòpica en el nucli vermell. La majoria d'axons acaben en les làmines 5-7 de forma contralateral i estableixen contactes amb interneurones inhibidòries i excitatòries. Les lesions en el nucli vermell de la rata comporten alteracions locomotores, com dels moviments fins de les extremitats.

3.9 Models animals en l'encefalopatia hepàtica

L'estudi de l'encefalopatia hepàtica requereix disposar de models experimentals en animals de laboratori. Aquest models han de reproduir dos aspectes fonamentals presents en la malaltia humana: les manifestacions neurològiques i la presència d'insuficiència hepàtica. D'acord amb les guies de la "International Society for Hepatic Encephalopathy and Nitrogen Metabolism" (ISHEN) (Butterworth et al., 2009) és

possible classificar els models animals d'acord amb la malaltia hepàtica que provoca manifestacions neurològiques en dos grups:

3.9.1 Tipus A: Fallida hepàtica aguda

Les característiques essencials que han de tenir els models aguts d'encefalopatia hepàtica per considerar que reproduïxen la malaltia humana és que les manifestacions progressin fins l'aparició de coma i que a més aparegui edema cerebral i les seves complicacions (hipertensió intracranial, herniació cerebral). Idealment haurien de tenir potencialitat per revertir, però això no es considera un criteri imprescindible. Durant el progrés de la malaltia s'ha de desenvolupar un increment de la concentració d'amoníac i de glutamina en sang i cervell (Vaquero and Butterworth, 2007). La patologia hepàtica i cerebral ha de poder ser ben caracteritzada. A més a més les toxines emprades com a hepatotòxiques en els models experimentals han de tenir una mínima perillositat cap el personal. Un aspecte a tenir en compte durant el desenvolupament del model és que la temperatura ha d'estar controlada. La hipotèrmia evita l'aparició d'edema (Jalan et al., 1999; Stravitz and Larsen, 2009). També s'ha d'evitar l'aparició d'hipoglucèmia, que és secundària a la insuficiència hepàtica i causa per si mateixa manifestacions neurològiques. Es disposa de diversos models de fallida hepàtica aguda. Els més ben caracteritzats són els deguts a l'absència de vascularització hepàtica (models anhepàtics) i els hepatotòxics. Els model anhepàtics són models animals en el que es priva la circulació sanguínia al fetge. Això es pot aconseguir per isquèmia hepàtica o devascularització hepàtica, que consisteix en realitzar una anastomosi porto-cava seguit d'una lligadura de l'artèria hepàtica. Els animals més emprats són rates (Rose et al., 2000), conills (Andres et al., 1990) i porcs

(Rose et al., 2007). També és pot evitar el pas de la sang pel fetge realitzant una hepatectomia, deixant l'animal sense fetge, en el que se li ha realitzat una anastomosi porto-cava, lligadura de les venes suprahepàtiques, artèria hepàtica i conducte biliar prèviament a la extracció del teixit hepàtic. Aquest model es realitza sobretot en rates (Olafsson et al., 1995) i porcs (Knubben et al., 2008). Un altre model agut anhepàtic és el d'anastomosis porto-cava + infusió d'amoníac en el que en rates es realitza una anastomosi porto-cava a les que se'ls administra per infusió contínua amoníac (Cordoba et al., 1996).

Per altre banda també hi ha el models hepatotòxics en els que un tòxic és l'encarregat de provocar la insuficiència hepàtica aguda. Hi ha molt tipus de tòxics que s'administren a diferents tipus d'animals com la galactosamina en rates (Wright et al., 2010), conills (Andres et al., 1990) i porcs (Kalpana et al., 1999), acetaminofen en rates (Chen et al., 2009), gossos (Francavilla et al., 1989) i porcs (Newsome et al., 2010), tiocetamide en rates (Rama Rao et al., 2010) o azoximetà en ratolins (Belanger et al., 2006).

3.9.2 Tipus B i C: Fallida hepàtica crònica

Les característiques essencials que han de tenir els model crònics d'encefalopatia hepàtica són una fallida hepàtica crònica amb col·laterals porto-sistèmiques, que desenvolupi un ampli rang de símptomes que van des de l'encefalopatia hepàtica mínima fins al coma. L'estudi neuropatològic ha de mostrar astrocitosi Alzheimer tipus II a estadis avançats, han de desenvolupar hiperamonèmia, increment de l'amoni/glutamina, els episodis d'encefalopatia hepàtica poden estar associats o ser

sensibles a factors precipitants i també han de tenir una resposta clínica a tractaments establerts per l'encefalopatia hepàtica.

Dins dels model animals per fallida hepàtica crònica hi ha els models animals d'encefalopatia hepàtica basats en col·laterals porto-sistèmiques (Tipus B) i són els models d'anastomosis porto-cava pròpiament dit en rates (Lee and Fisher, 1961), gossos, conills (van Niekerk and Koopman, 1986) i porcs (Luo et al., 2003), els models d'anastomosi porto-cava congènits tant en gossos com en gats (Lamb and White, 1998), el model de lligadura calibrada de la vena porta en rates (Coll et al., 2008) en el que es fa una lligadura de la vena porta deixant un diàmetre determinat més petit per provocar hipertensió portal, el model d'anastomosis porto-cava + infusió amoníac contínua en rates com també el model de lligadura del conducte biliar (Jover et al., 2006)(manifesta alguns aspectes del Tipus C) en rates en les que es fa una lligadura i dissecció de la via biliar. Com a models experimental de fallida hepàtica crònica també hi ha els models animals d'encefalopatia hepàtica resultant d'una cirrosi hepàtica descompensada (Runyon et al., 1991)(Tipus C), però estan molt mal caracteritzats.

3.10 Validació dels models animals

La validació d'un model és un mètode científic per millorar la confiança en un model. No és la demostració de que el model és igual que la malaltia, sinó que és possible interpretar els valors que d'ell s'extreuen. No tots els models animals són vàlids en totes les situacions ni per tots els propòsits. La validació permet un ús específic del model, que pot estar obert a discussió (van der Staay et al., 2009).

El primer criteri que ha de complir un model animal és la fiabilitat del model, ens indica que els resultats són consistents quan s'analitzen sota les mateixes condicions. La

reproductibilitat ens indica quin és el grau de concordança entre els resultats del mateix experiments realitzats independentment en el mateix o diferents laboratoris. La validesa interna ve determinada en funció d'una bona fiabilitat i una bona reproductibilitat i és la referència de la qualitat de l'avaluació experimental del model animal.

Un segon criteri que ha de presentar un model animal és la validesa aparent, es creu que aquest criteri és un dels més importants dins de la validació d'un model. La validesa aparent és el grau de similituds que té un model animal amb els humans.

En tercer lloc un model animal ha de tenir validació predictiva, ja que ha de permetre una extrapolació dels efectes dels factors que milloren o empitjoren en humans.

La quarta condició que ha de tenir un bon model és la validesa de construcció per determinar el grau de similitud dels mecanismes tòrics implicats (fisiopatologia, comportament, etc...). D'aquesta manera s'acumulen evidències empíriques sobre les relacions teòriques que donen suport i fonamenten el concepte de les alteracions.

La cinquena condició que ha de complir un model animal és la validesa externa a on els resultats obtinguts amb un model animal son consistents en diversos laboratoris .

3.11 Limitacions dels models experimentals en l'encefalopatia hepàtica

Els models experimental d'encefalopatia hepàtica tenen limitacions, ja que en els models per fallida hepàtica aguda, tot i estar ben caracteritzada la patologia cerebral i hepàtica i que la seva determinació neuronal és clara, aquest models són terminals i no hi ha una reversibilitat de la patologia.

En els modes de fallida hepàtica crònica en canvi, un model òptim d'encefalopatia hepàtica per cirrosi descompensada (tipus C) no existeix ja que l'administració

d'alcohol no produeix cirrosi micronodular en petits animals de laboratori. Un model molt emprat és el de l'administració de tetraclorur de carboni o també el model de lligadura del conducte biliar. Però ambdós són dos models molt variables en l'aparició de la descompensació. A més a més sovint tenen factors de confusió: pateixen infeccions, es lesionen entre els animals, deixen de menjar en alguns casos, presenten icterícia i altres complicacions.

En els models animals d'encefalopatia hepàtica tipus B i C la determinació del grau d'encefalopatia és realitzada basant-se en estudis de comportament (Bengtsson et al., 1986), estudis locomotors (Jover et al., 2006), ritmes circadians (Cordoba et al., 1997), aprenentatge (Mendez et al., 2010), alteració de reflexes. Tots aquestes sistemes de determinació del grau d'encefalopatia són mètodes no quantificatius, sinó qualitius que depenen en part de l'experimentador i això afegeix més variabilitat a la del propi model animal.

Una de les principals limitacions és l'absència de models animals que permetin investigar el funcionament d'una via neuronal determinada (Chamuleau, 1996). La realització d'una anastomosi porto-cava en rates provoca alteracions neuroquímiques i conductuals que es consideren un model experimental d'encefalopatia hepàtica mínima. No s'ha pogut mesurar l'existència d'alteracions neurològiques en la cirrosi hepàtica experimental, que es considerin equivalents a l'encefalopatia hepàtica que apareix en pacients.

**ESTUDI 1: ALTERACIONS FUNCIONALS DE LA VIA
MOTORA EN MODELS EXPERIMENTALS
D'ENCEFALOPATIA HEPÀTICA**

4 ESTUDI 1: ALTERACIONS FUNCIONALS DE LA VIA MOTORA EN MODELS EXPERIMENTALS D'ENCEFALOPATIA HEPÀTICA

4.1 Hipòtesi i Objectius

4.1.1 Introducció

En l'encefalopatia hepàtica es desenvolupa un trastorn de la funció de la via motora central, que en humans correspon al tracte cortico-espinal. Postulem que el trastorn de la funció de la via motora central és l'expressió d'un trastorn en la neurotransmissió secundari a un increment de l'aigua intracel·lular en els astròcits. L'alteració de la neurotransmissió afectaria principalment a la transmissió glutamatèrgica com a conseqüència d'un defecte dels transportadors de glutamat astrocitaris, que es veurien alterats per l'increment d'aigua astrocitari. El trastorn de la neurotransmissió glutamatèrgica afectaria a la concentració de glutamat en la sinapsis entre la primera motoneurona (via cortico-espinal) i la segona motoneurona (perifèrica), i produiria la disfunció de la via cortico-espinal que és observada en l'encefalopatia hepàtica i que seria responsable dels dèficits motors que apareixen en pacients amb encefalopatia hepàtica.

4.1.2 Hipòtesi

Els models d'encefalopatia hepàtica secundària a insuficiència hepàtica presenten alteracions funcionals de la via motora.

4.1.3 Objectius

Estudi A: Efecte del propofol sobre els potencials evocats motors en rates normals.

- Registrar potencials motors induïts per estímul elèctric central i perifèric.
- Analitzar l'efecte de tres dosis de propofol sobre l'amplitud i latència dels potencials motors. Aquest experiment serà útil per decidir la dosi de propofol adient pels següents experiments.

Estudi B: Potencials motors en rates amb anastomosi porto-cava.

- Mesurar els potencials evocats motors en rates que han estat sotmeses a anastomosi porto-cava abans i després de la intervenció quirúrgica.
- Comparar els resultats amb un grup control de rates amb intervenció fictícia.

Estudi C: Potencials motors en rates amb cirrosi per tetraclorur de carboni.

- Mesurar els potencials evocats motors en rates en les que s'indueix cirrosi hepàtica amb tetraclorur de carboni a intervals periòdics des de l'aparició d'ascites.

4.2 Resum de l'estudi

Es van mesurar els potencials evocats motors amb un mètode neurofisiològic convencional amb l'animal anestesià i utilitzant un cargol cerebral per estimular a nivell central i elèctrodes d'agulla per estimular i registrar els potencials evocats motors.

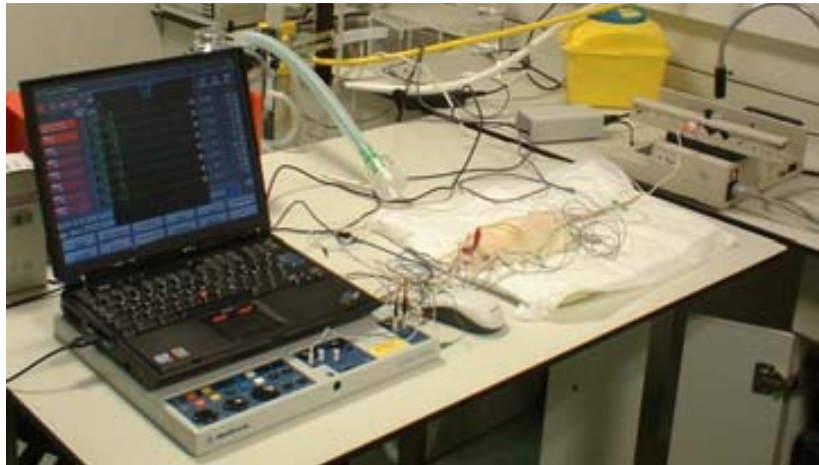


Figura 5: Imatge del mètode neurofisiològic convencional per l'estudi dels potencials evocats motors en animals d'experimentació .

Estudi A: Efecte del propofol sobre els potencials evocats motors a la rata

La disminució de la dosi de propofol va incrementar l'amplitud del potencial evocat motor. L'amplitud amb la dosi alta va ser de 43 ± 18 %, amb la dosi intermitja de 53 ± 16 % i amb la dosi baixa de 67 ± 9 %, així com la disminució de la dosi de propofol va disminuir la latència del potencial motor. La latència amb la dosi alta era de $5,23 \pm 0,21$ ms, amb la dosi intermitja de $5,07 \pm 0,24$ ms i amb la dosi baixa de $4,81 \pm 0,28$ ms.

Estudi B: Potencials evocats motors en rates amb anastomosi porto-cava

L'amplitud del potencial motor en les rates del grup d'anastomosi porto-cava (67 ± 11 %) i d'intervenció fictícia (62 ± 16 %) abans de la intervenció quirúrgica era similar a la de l'estudi A amb la dosis baixa de propofol. No hi va haver diferències entre els dos grups. Després de la intervenció quirúrgica es va produir una disminució de l'amplitud del potencial motor (41 ± 16 %) en el grup d'anastomosi porto-cava, però no el grup d'intervenció fictícia (62 ± 13 %). La latència del potencial motor en les rates del grup d'anastomosi porto-cava ($4,80\pm 0,21$ ms) i d'intervenció fictícia ($4,88 \pm 0,36$ ms) abans de la intervenció quirúrgica era similar. Aquests resultats són comparables als obtinguts en l'estudi A utilitzant la dosis baixa de propofol. Després de la intervenció quirúrgica no van haver canvis significatius en el grup d'anastomosi porto-cava ($4,60\pm 0,30$ ms). Tampoc va haver cap canvi en el grup d'intervenció fictícia ($4,88\pm 0,27$ ms).

Estudi C: Potencials motors en rates amb cirrosi per tetraclorur de carboni.

L'amplitud del potencial motor en les rates del grup de cirrosi amb ascites en el moment basal ($60\pm 7\%$) va ser similar a la del estudi A amb la dosis baixa de propofol (67 ± 9 %).

Després del desenvolupament d'ascites es va observar un lleu descens en l'amplitud del potencial evocat motor, que no va arribar a ser significatiu (52 ± 12 %).

La latència del potencial motor en les rates del grup de cirrosi amb ascites en el moment basal ($4,65\pm 0,43$ ms) era similar a la del estudi A amb la dosis baixa de

propofol ($4,81 \pm 0,28$ ms). Després del desenvolupament d'ascites es va observar un increment significatiu en la latència del potencial evocat motor ($5,15 \pm 0,67$ ms).

Una de les rates cirròtiques que ja feia dos setmanes que presentava ascites, va entrar en coma en el moment del registre neurofisiològic, abans de posar-li l'anestèsia. El seu comportament va ser igual al d'una rata de model de fallida hepàtica aguda per devascularització (Zwingmann et al., 2003). Aquesta rata, havia perdut els reflexes oculars, era incapaç d'incorporar-se de nou i presentava tremolors amb rigidesa muscular. A aquest animal se li va fer un estudi electrofisiològic sense anestèsia ja que es trobava en estat de coma. Posteriorment al registre la rata va morir. L'estudi microbiològic del líquid ascític obtingut d'aquesta rata en el moment de l'estudi neurofisiològic va mostrar existència d'*E.Coli*. Es va interpretar que la peritonitis bacteriana espontània induïa una encefalopatia hepàtica secundària. En aquesta rata els potencials evocats motors van mostrar grans alteracions tan en l'amplitud com en la latència. L'amplitud va disminuir de 62% a 16% i la latència va incrementar-se de 4,7 ms a 6,5 ms.

En conclusió, el nostre estudi demostra la presència d'alteracions funcionals de la via motora central en rates amb anastomosi porto-cava i en rates amb cirrosi induïda per tetraclorur de carboni. Aquestes troballes mostren que és possible reproduir en models experimentals les alteracions de la via cortico-espinal que presenten els pacients amb cirrosi i encefalopatia hepàtica mínima. Els trastorns observats són molt lleus i tenen l'inconvenient de que l'anestèsic pot haver afectat els resultats. Per aquest motiu considerem necessari investigar models d'encefalopatia hepàtica més greu, com el provocat per devascularització hepàtica, que podrien mostrar alteracions similars a les observades en aquest estudi en una rata amb cirrosi i peritonitis

bacteriana espontània. A més creiem que seria molt útil poder estudiar els animals sense anestèsia. La reproducció de les alteracions motores en models experimentals ofereix la possibilitat d'investigar els mecanismes involucrats en la patogènesi de l'encefalopatia hepàtica i provar noves estratègies terapèutiques.

Functional abnormalities of the motor tract in the rat after portocaval anastomosis and after carbon tetrachloride induction of cirrhosis

Marc Oria · Nuria Ragner · Nicolas Chatauret · Ramón Bartolí · Gemma Odena · Ramón Planas · Juan Córdoba

Received: 28 December 2005 / Accepted: 7 June 2006
© Springer Science+Business Media, Inc. 2006

Abstract *Introduction:* Hepatic encephalopathy is a neurologic syndrome secondary to liver failure that causes cognitive and motor abnormalities. Impairment in the function of the first neuron of the motor tract (corticospinal tract) has been demonstrated in patients with cirrhosis and minimal hepatic encephalopathy. *Aim:* Investigate the function of the first neuron of the motor tract in experimental models of minimal hepatic encephalopathy. *Material and methods:* Rats with portocaval anastomosis ($n = 8$) and rats with carbon tetrachloride induced cirrhosis ($n = 11$) underwent neurophysiological recording under light anesthesia with propofol. Motor evoked potentials were elicited applying a transcranial electric pulse and were recorded in the tibialis anterior muscle. The effect of the dose of anesthesia was assessed in a group of normal rats ($n = 10$). *Results:* Rats with portocaval anastomosis exhibited a decrease in motor evoked potentials amplitude following surgery (67 ± 11 to $41 \pm 16\%$, $P < 0.001$). Cirrhotic rats exhibited an increase in motor evoked potentials latency after the appearance of ascites (4.65 ± 0.43 to 5.15 ± 0.67 ms., $P = 0.04$). Increasing doses of propofol produced a decrease in the amplitude and an increase in the latency of motor evoked potentials. *Conclusion:* It is possible to reproduce functional abnormalities of the central motor tract in rats with portocaval anastomosis and carbon tetrachloride induced cirrhosis. The development of motor abnormalities in experimental models of minimal

M. Oria · N. Chatauret · J. Córdoba (✉)

Liver Unit, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Department of Medicine, Universitat Autònoma de Barcelona, Passeig Vall d'Hebron 119–129, 08035 Barcelona, Spain
e-mail: jcordoba@vhebron.net

N. Ragner

Department of Neurophysiology, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Universitat Autònoma de Barcelona, Spain

R. Bartolí · G. Odena · R. Planas

Digestive Unit, Hospital Germans Trias i Pujol, Universitat Autònoma de Barcelona, Spain

hepatic encephalopathy offers the possibility to investigate the mechanisms involved in the pathogenesis of hepatic encephalopathy and test therapeutic strategies.

Keywords Hepatic encephalopathy · Portocaval anastomosis · Cirrhosis · Motor evoked potential · Propofol

Introduction

Hepatic encephalopathy is a frequent neuropsychiatric syndrome secondary to liver failure (Adams and Foley, 1953; Butterworth, 2003; Adams and Foley, 1953). Cirrhosis is the most common cause, especially if associated with large portosystemic shunts, such as surgical shunts performed to prevent variceal bleeding. Patients that develop hepatic encephalopathy have a bad prognosis and are usually considered candidates for liver transplantation.

The clinical manifestations of hepatic encephalopathy include a decrease in the level of consciousness and motor alterations. A wide number of motor disturbances have been described. One of the most typical are signs of corticospinal tract impairment: paresis, exacerbated deep tendon reflexes and Babinski's sign (Adams and Foley, 1953; Andrefsky and Frank, 1997). These manifestations correspond to an impairment of the first neuron of the motor pathway. Studies in patients with cirrhosis and minimal hepatic encephalopathy have confirmed this impairment using neurophysiological techniques (transcranial motor stimulation) (Cordoba *et al.*, 2003b). Furthermore, the functional impairment has been associated with signs of increased brain water along the corticospinal tract detected by brain magnetic resonance (Rovira *et al.*, 2002). According to a current hypothesis that postulates that hepatic encephalopathy is the clinical manifestation of astrocyte swelling (Haussinger *et al.*, 2000), functional and imaging abnormalities of this tract normalize in parallel following liver transplantation (Cordoba *et al.*, 2003b).

Hepatic encephalopathy is reversible after the correction of liver failure and/or portosystemic shunting. A key factor in its pathogenesis is the exposure of brain to blood arising from the splanchnic circulation. Portal-vein derived toxins, such as ammonia, induce a series of neurochemical abnormalities that affect normal neurotransmission. However, the investigation of the pathogenic mechanisms is limited because the available experimental models reproduce only part of the human disease (Chamuleau, 1996).

This study was undertaken to investigate the functional motor tract abnormalities in two experimental models that could be used to investigate the pathogenesis of hepatic encephalopathy. First, we investigated whether motor evoked potential (MEP) could be affected in rats after portocaval anastomosis (PCA). Our aim was to explore if MEP could be an index of the neuronal dysfunction present in hepatic encephalopathy. Secondly, we repeated the same experiment in cirrhotic rats with ascites induced by carbon tetrachloride gavage. This model has the advantage that mimics better the situation in humans (presence of cirrhosis and ascites). However, minimal hepatic encephalopathy in this model has not been assessed due to the confounding effects of ascites and muscular weakening on behavioral correlates. The development of a neurophysiological index that correlates to the degree of hepatic encephalopathy would be very useful to measure directly neuronal function. In parallel to these experiments we investigated the effects of the anesthetic on MEP by assessing different doses of propofol in normal rats.

Material and methods

This study was performed in male Sprague-Dawley rats (Harlan, Barcelona Spain). Animals were housed in polycarbonate cages with humidity at 55% and temperature controlled at 22°C with a light/dark cycle of 12/12 h. Rats were fed a standard diet A04 (Panlab, Barcelona Spain) and water *ad libitum*. The experiments were approved by the Animal Care Committee and were conducted in the animal facilities of the *Institut de Recerca de l'Hospital Vall d'Hebron* and the *Institut de Recerca de l'Hospital Germans Trias i Pujol*.

Experimental design

The study consisted of a neurophysiological assessment of the function of the motor tract with the determination of MEP in rats under anesthesia with intravenous propofol administered through the tail vein (induction bolus: 200 μ l, followed by different maintenance doses). Three different groups of rats were studied.

Study A (effects of propofol on MEP in normal rats): Neurophysiological recordings were performed in ten rats (weighing 270 ± 21 g). Three different doses (1, 0.5, 0.25 mg/kg/min) of propofol were used. MEP were recorded 10 min after the change in the dose of propofol to reach stable plasma levels.

Study B (MEP in PCA rats): Thirteen rats were included in the PCA group (weighing 288 ± 23 g) and six in the sham-operated group (weighing 300 ± 40 g). The dose of propofol during the neurophysiological recording was 0.25 mg/kg/min. Five rats of the PCA group died after the intervention. The analysis of the data is limited to the 8 rats that had the MEP recorded one day before and 7 days after surgery.

Study C (MEP in cirrhotic rats): Eighteen rats (weighing 110 ± 10 g before the carbon tetrachloride gavage) initiated the protocol of induction of cirrhosis. For the neurophysiological recording the dose of propofol was 1 mg/kg/min; lower doses of propofol were insufficient to induce enough sedation. MEP were recorded before the initiation of the carbon tetrachloride gavage and were repeated at weekly intervals after the appearance of ascites until the rat died (1 to 4 weeks after the appearance of ascites). Eleven of the initial 18 rats developed ascites and underwent neurophysiological recordings. Five rats died before the appearance of ascites and two never did develop ascites. The last recordings were considered the final data and were used for the analysis, except for one rat that was spontaneously in coma (without anesthesia) at the time of the last neurophysiological recording. In this rat, the prior recording (one week before) was used instead.

Animal models

Portocaval anastomosis: The PCA was performed according to the guidelines of Lee, S.H. and Fisher, B. (Lee and Fisher, 1961) under isoflurane anesthesia. The PCA was constructed under aseptic conditions using a continuous suture technique (7/0 prolene suture) with the aid of a microscope. The total surgery time was below 15 min. Sham-operated rats underwent a similar intervention without vein section and had the portal vein clamped during 15 min.

Cirrhosis induced by carbon tetrachloride: The induction of cirrhosis followed the guidelines of B. Runyon with some modifications (Lorenzo-Zuniga *et al.*, 2003). The rats received 1.5 mmol/L of phenobarbital in the drinking water (*ad libitum*) and 20 μ L/kg/week of carbon tetrachloride in water by gavage (Popper and Sons, New Hyde Park, NY). The dose of carbon tetrachloride was calculated according to the weight determined 5 days before

its administration. Carbon tetrachloride gavage was started when the body weight reached 200 g. In the 100–200 grams period the animal received only phenobarbital in the drinking water. Ascites appeared at 8–14 weeks after the initiation of carbon tetrachloride. Rats with cirrhosis induced by carbon tetrachloride develop spontaneous bacterial peritonitis in a high percentage of animals. Before the neurophysiological recordings ascitic fluid was sampled and cultured to control for the possible effect of concurrent infection on neurophysiological recordings.

Neurophysiological studies

The motor potentials were evoked and recorded according to the guidelines of Schlag MG *et al.* (Schlag *et al.*, 2001) using chronically implanted cranial electrodes (stainless screws), that allow repeated stimulation at the same point.

Implantation of electrodes: For this purpose the animals were anaesthetized with inhalatory isoflurane anesthesia and the rat's head was fixed in a stereotaxic frame. The skull was perforated with a drill (Dremel, Madrid, Spain) with a drill bit 1.1 mm \varnothing , avoiding to touch the dura of the brain. A 4 mm long and 1.4 mm \varnothing electrode was positioned 1–2 mm posterior to lambda at a depth of 1.5 mm. The electrodes were fixed with dental cement.

Electrophysiological recordings: The electrophysiological recordings were performed with an electromyographer (Medtronic Keypoint Portable, Denmark). The central motor potentials were induced with electric pulse using the posterior cranial screw (cathode) and one needle electrode positioned in the skin of lower jaw (anode). For the induction of the compound motor action potential (CMAP), which corresponds to the potential evoked by peripheral stimulation, two needle electrodes were positioned at the sciatic nerve level. The potentials were recorded from one monopolar needle electrode positioned in the tibialis anterior muscle (cathode) and a monopolar needle electrode implanted in the footpath (anode). A ground electrode was positioned at the lumbar level. The recordings were started by measuring the maximum amplitude of the CMAP with supramaximal intensity stimulation of the sciatic nerve with a single pulse of 0.1 ms duration. In order to evoke the motor potentials (MEP), progressively increases electrical pulses of 0.1 ms duration were applied at the cranial screw level until the supramaximal intensity was reached, which is the intensity at which the amplitude of the MEP is maximal and does not further increase with higher intensities of stimulation. Once the supramaximal intensity was obtained, seven MEP were recorded at this supramaximal intensity (Fig. 1).

Statistical analysis

Results are expressed as mean \pm standard deviation. Intragroup comparisons of the same variable were performed with paired T-Student's test for two determinations and ANOVA for repeated measures for multiple determinations, followed by pairwise comparisons with the Holm-Sidak method. Comparisons of continuous variables between two groups were performed with the T-Student's test. The Sigma Stat package was used for statistical calculations.

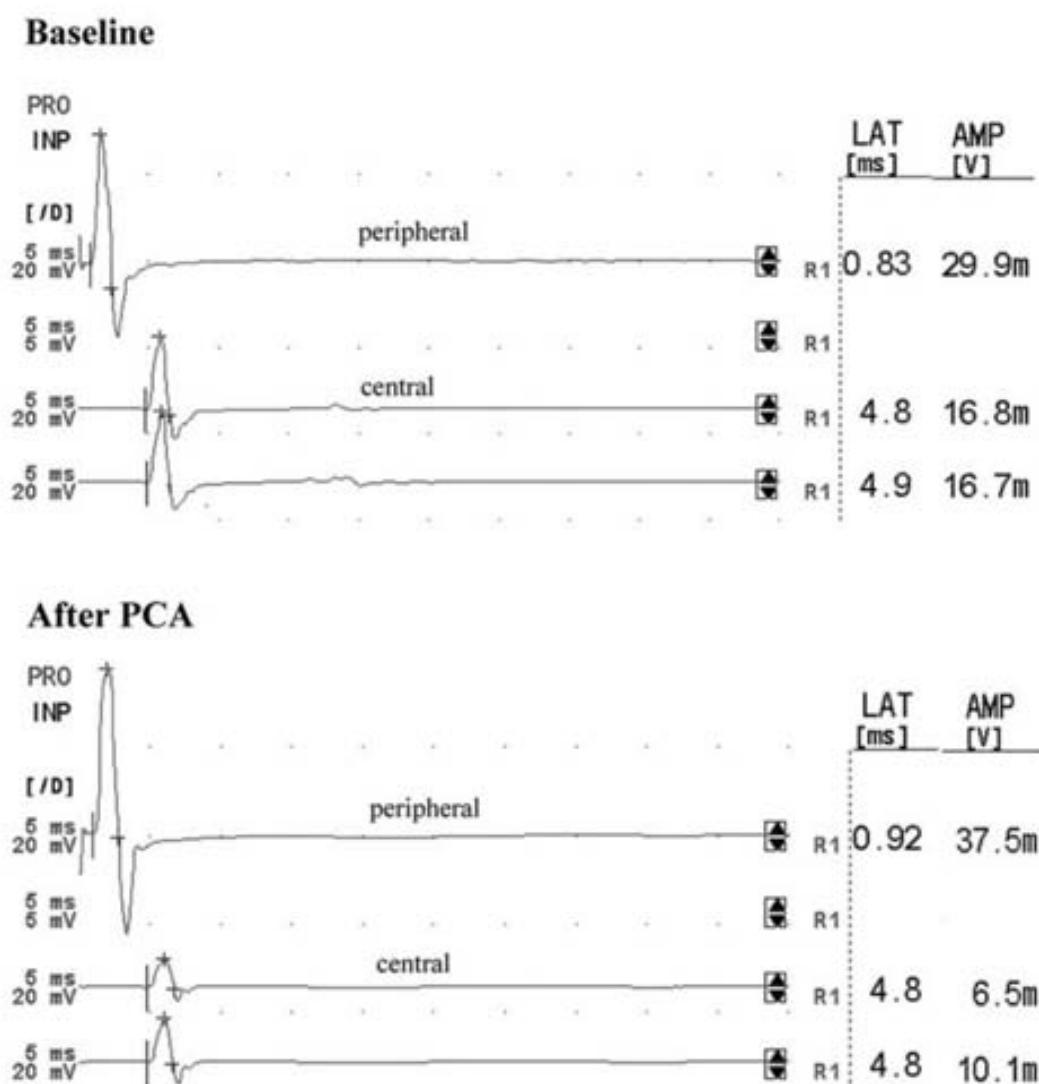


Fig. 1 Results of electrophysiological recordings in the same rat before (*baseline*) and after portocaval anastomosis (PCA). The upper trace corresponds to the CMAP after sciatic nerve stimulation (*peripheral*) and the two traces below it are examples of MEP after cranial stimulation (*central*). Once the supramaximal intensity was obtained, seven motor potentials were recorded at this supramaximal intensity. Note the marked decrease in the amplitude of the MEP after PCA. LAT: latency; AMP: amplitude

Results

Study A: Effects of propofol on MEP in normal rats

The amplitude and the latency of the MEP relates to the dose of propofol. Higher doses were associated with lower amplitudes (Fig. 2). The amplitude of the MEP at 0.25 mg/kg/min was $67 \pm 9\%$, at 0.5 mg/kg/min was $53 \pm 16\%$ and at 1 mg/kg/min was $43 \pm 18\%$ ($P < 0.001$). Higher doses were associated with longer latencies (Fig. 3). The latency of the MEP at 0.25 mg/kg/min was 4.81 ± 0.28 ms, at 0.5 mg/kg/min was 5.07 ± 0.24 ms and at 1 mg/kg/min was 5.23 ± 0.21 ms ($P < 0.001$).

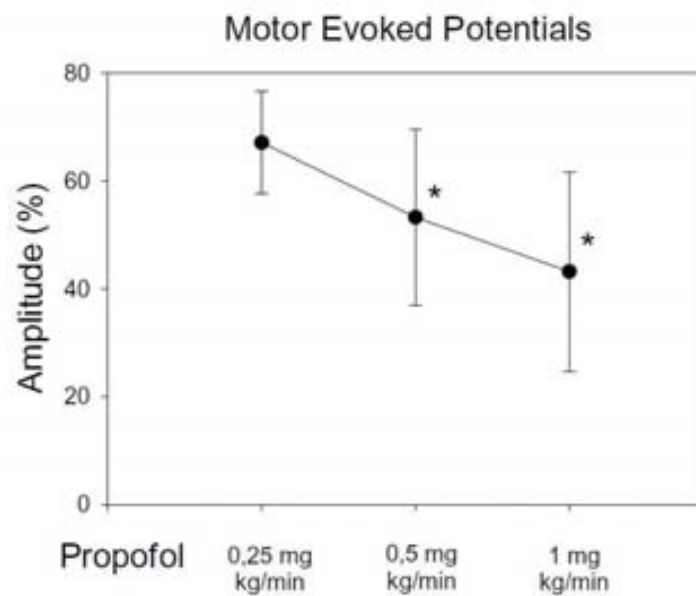


Fig. 2 Amplitude of the MEP ($x \pm SD$) under three different doses of propofol in normal rats ($n = 10$). Each rat received three different doses of propofol, starting with the higher dose. The electrophysiological recordings were performed 10 min after the change of dose. Increasing doses of propofol induced a decrease in the amplitude of the MEP (ANOVA $p < 0.001$; * $p < 0.01$ 0.25 mg/kg/min vs. 0.5 mg/kg/min and 1 mg/kg/min)

Study B: MEP in PCA rats

The amplitudes of the MEP at baseline (before surgery) were not significantly different between PCA and sham ($67 \pm 11\%$ vs. $62 \pm 16\%$, $P = 0.56$). These amplitudes were not significantly different from those measured in study A with the low dose of propofol ($P = 0.98$).

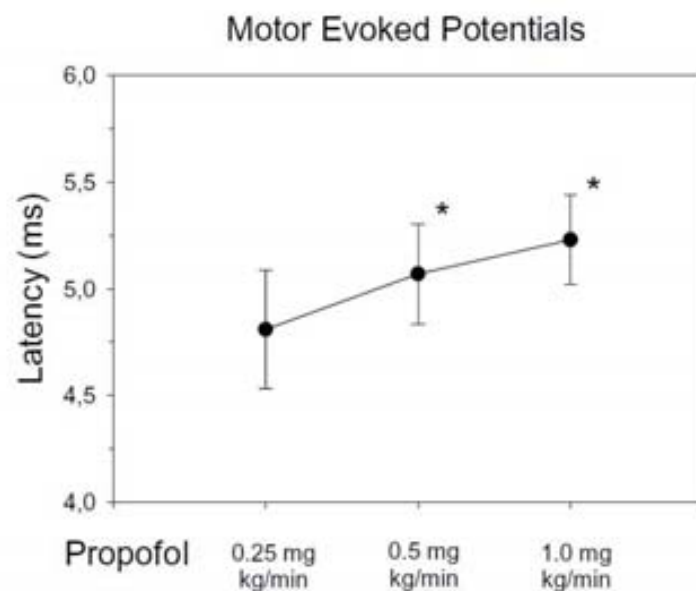


Fig. 3 Latency of the MEP ($x \pm SD$) under three different doses of propofol in normal rats ($n = 10$). Each rat received three different doses of propofol, starting with the higher dose. The electrophysiological recordings were performed 10 min after the change of dose. Increasing doses of propofol induced an increase in the latency of the MEP (ANOVA $p < 0.001$; * $p < 0.01$ 0.25 mg/kg/min vs. 0.5 mg/kg/min and 1 mg/kg/min)

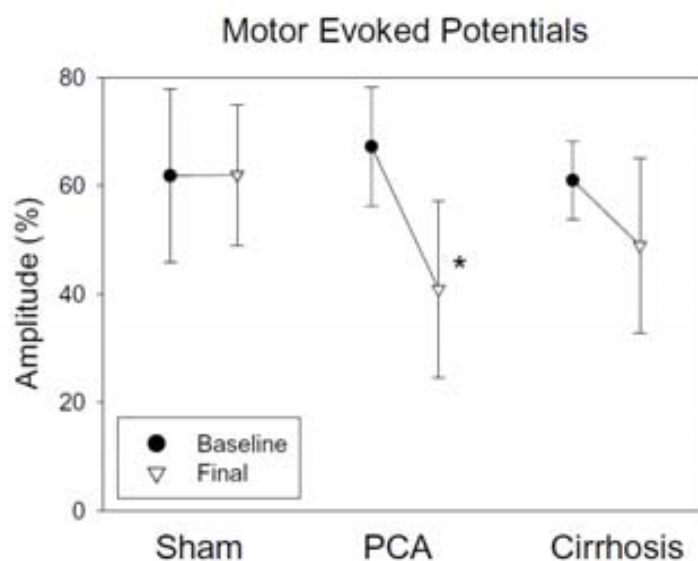
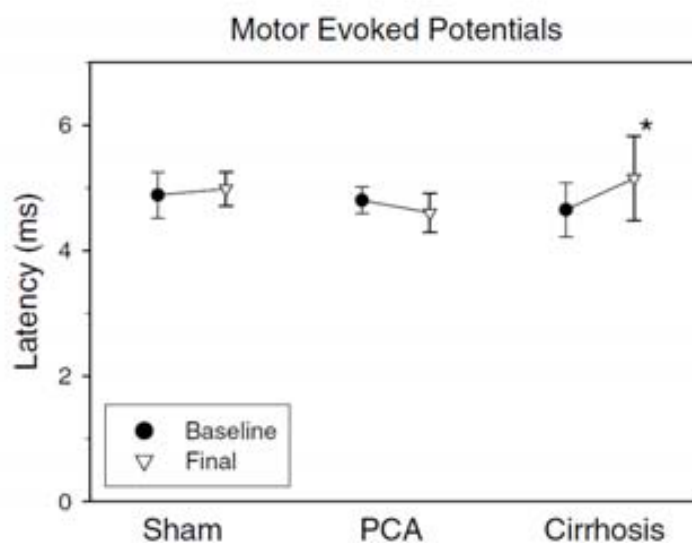


Fig. 4 Amplitude of the MEP ($x \pm SD$) in sham-operated rats ($n = 6$), rats with portocaval anastomosis (PCA, $n = 8$) and rats with carbon tetrachloride induced cirrhosis ($n = 11$). PCA rats exhibited a decrease in the amplitude of the MEP (* $p < 0.001$ final vs. baseline)

After surgery (Fig. 4), the amplitude of the MEP in the PCA decreased to $41 \pm 16\%$ ($P < 0.001$), while there were no significant changes in the sham-operated rats ($62 \pm 13\%$, $P = 0.97$).

The latencies of the MEP at baseline (before surgery) were similar in the PCA and sham rats (4.80 ± 0.21 vs. 4.88 ± 0.36 ms, $P = 0.96$) and were comparable to those observed in study A (propofol 0.25 vs. PCA: $P = 0.98$; propofol 0.25 vs. sham: $P = 0.95$). After surgery (Fig. 5), there were no significant changes in the latencies neither in the PCA (4.60 ± 0.30 ms, $P = 0.3$) or sham-operated rats (4.88 ± 0.27 ms, $P = 0.52$).

Fig. 5 Latency of the MEP ($x \pm SD$) in sham-operated rats ($n = 6$), rats with portocaval anastomosis (PCA, $n = 8$) and rats with carbon tetrachloride induced cirrhosis ($n = 11$). Cirrhotic rats exhibited an increase in the latency of the MEP (* $p = 0.04$ final vs. baseline)



Study C: MEP in cirrhotic rats

In the cirrhotic group, at baseline (before carbon tetrachloride) the amplitudes ($60 \pm 7\%$) and the latencies (4.65 ± 0.43 ms) of the MEP did not differ from those obtained in study A with the low dose of propofol. Following the appearance of ascites (Figs. 4 and 5), there was an increase in the latency of the MEP (final recording: 5.15 ± 0.67 ms, $P = 0.04$) and a trend towards a decrease in the amplitudes of the MEP (final recording: $48 \pm 16\%$, $P = 0.13$).

One cirrhotic rat that presented ascites for two weeks, went into coma before the anesthesia induction. The behavior of the rat was similar to rats with acute liver failure induced by hepatic ischemia (Zwingmann *et al.*, 2003). The cirrhotic rat had lost both the righting and the corneal reflexes and presented tremor with muscular rigidity. Electrophysiological recordings were performed without anesthesia since the animal was immobile and unresponsive to pain (Fig. 6). Alterations in the amplitude and also in the latency were observed. The amplitude of the MEP decreased from 62% at baseline to 16% during coma and similarly the latency of the MEP increased from 4.7 ms to 6.5 ms. This recording was not included in the analysis of the data of the cirrhotic group.

Discussion

The present study demonstrates the development of functional abnormalities of the motor tract in the rat after portocaval anastomosis and after the development of cirrhosis induced by carbon tetrachloride. In PCA rats we observe a decrease in the amplitude of the MEP and in cirrhotic rats an increase in the latency of the MEP.

The rat with PCA has no intrinsic liver disease but has been extensively used for the study of hepatic encephalopathy, because it reproduces part of the neurological manifestations (Erceg *et al.*, 2005; Cordoba *et al.*, 1997; Hawkins *et al.*, 1996; Bengtsson *et al.*, 1988). This rat shows apparently a normal behavior, but presents neurochemical disturbances and subtle cognitive abnormalities, such as disruption in the circadian rhythm of activity and learning impairment. For these reasons, the rat after PCA is considered a model of minimal hepatic encephalopathy (Mullen and McCullough, 1989). Our study provides additional data to support the validity of this model because it reproduces a neurological dysfunction present in patients with cirrhosis and minimal hepatic encephalopathy (Cordoba *et al.*, 2003b).

The rat with cirrhosis induced by carbon tetrachloride reproduces the disease of the liver that is present in patients. However, the neurological manifestations are less documented. In this model the development of coma usually occurs shortly (hours) before death. At this stage neuropathological studies find typical signs of hepatic encephalopathy (Pilbeam *et al.*, 1983). At lower stages behavioral correlates of the human disease have not been assessed. Furthermore, the assessment of hepatic encephalopathy may be confounded by the mobility limitations caused by ascites and muscle wasting (Picardi *et al.*, 1997). The impairment in the function of the central motor tract that we have found in rats with apparent normal behavior is consistent with the presence of mild forms of hepatic encephalopathy. The further impairment of the MEP with the progression to coma induced by spontaneous bacterial peritonitis in a rat is in accordance with this interpretation.

Neurophysiological recordings have the advantages that they are objective and reproducible methods to assess encephalopathy. In addition, they are more specific than behavioral indexes. However, neurophysiological methods have received scant attention (Popken *et al.*, 1983). The induction of MEP by electric stimulation is a widely used method to investigate the function of the central motor tract (Haghighi *et al.*, 1996b; Keller *et al.*, 1992; Haghighi *et al.*, 1990b; Lopez-Vales *et al.*, 2005; Zandieh *et al.*, 2003b). We have

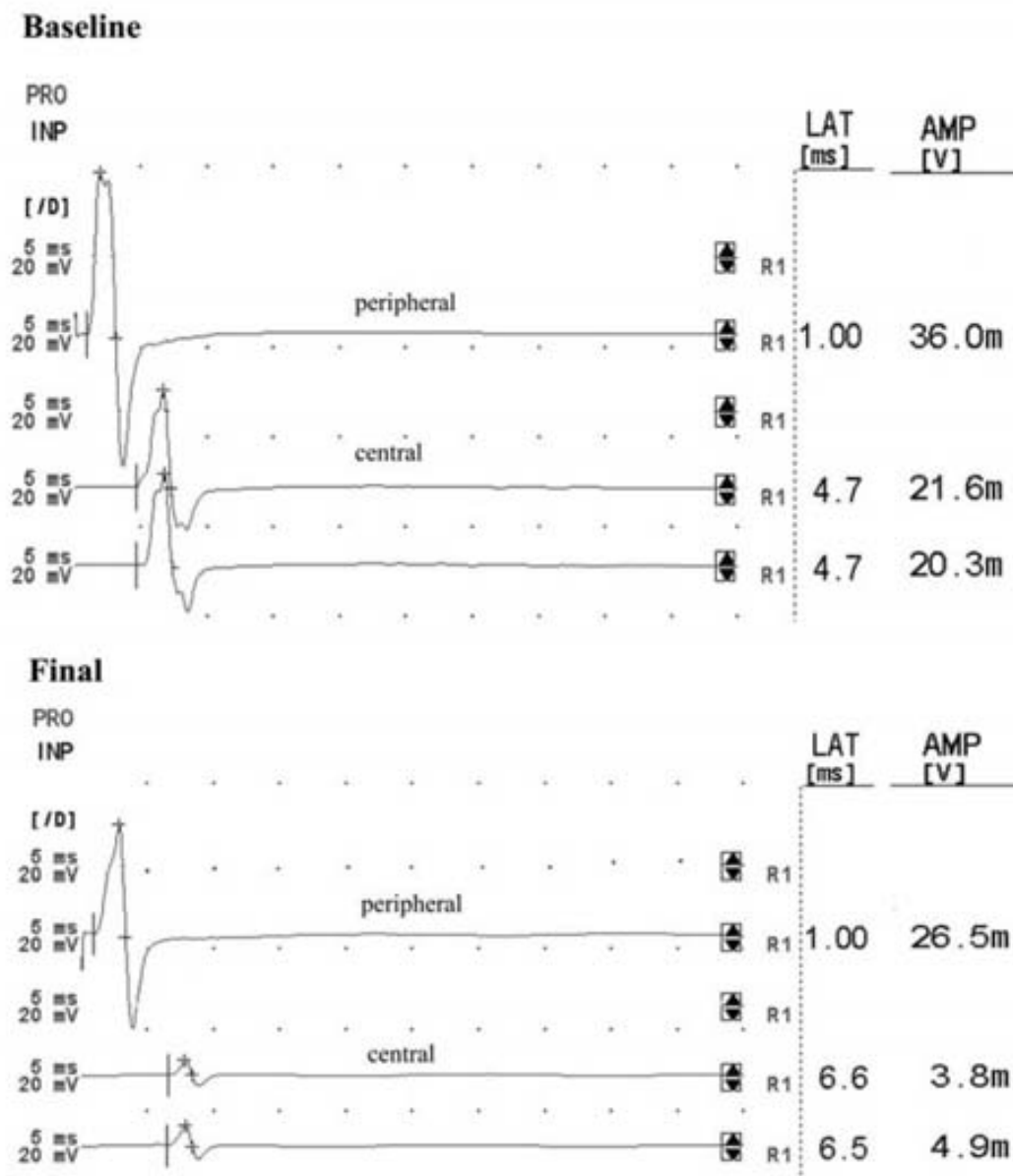


Fig. 6 Results of electrophysiological recordings in a rat with cirrhosis and ascites induced by carbon tetrachloride. The upper panel shows the recording at baseline (before initiating the administration of carbon tetrachloride) and the lower panel shows the final recording. At the time of the final recording the rat was spontaneously in coma (without anesthetic) and presented infection of the ascites (spontaneous bacterial peritonitis). Note the marked impairment in the MEP after central stimulation: prolongation in the latency and decrease in the amplitude. LAT: latency; AMP: amplitude

observed impairment of two variables that define the MEP (amplitude and latency) in two models of hepatic encephalopathy. These results imply that this method could probably be a good system to monitor hepatic encephalopathy in experimental models. An advantage of this method is the capacity to relate its function to a specific neuronal pathway. In comparison, behavioral indexes relate to complex neuronal circuits that are difficult to investigate (i.e. hypothalamic circuits modulate the circadian rhythm of locomotor activity).

The functional abnormalities of the motor tract found in these two models parallel those reported in humans (Cordoba *et al.*, 2003b). The decrease in the amplitude of the MEP is

in accordance with a lower neuronal excitability or an increase in the inhibitory tone (Hess *et al.*, 1987). The decrease in neuronal excitability may reflect alterations of glutamatergic neurotransmission. Glutamate is the main neurotransmitter in the corticospinal tract and abnormal glutamatergic neurotransmission has been demonstrated in hepatic encephalopathy (Butterworth, 2000). In respect to the other parameter of the MEP that was impaired, the increase in the latency implies a decrease in the speed of motor conduction. The main factor that determines motor conduction is the degree of myelination of the motor fibers. Cirrhotic patients exhibit a decrease in the central motor conduction time recorded by transcranial magnetic stimulation (Cordoba *et al.*, 2003b). However, histological studies have not described significant alterations of myelin in these patients. A possible explanation is that astrocyte swelling, a common abnormality in hepatic encephalopathy, produces functional alteration in the myelin. Accordingly, changes of central motor conduction time have been correlated with the presence of increased water along the corticospinal tract detected by magnetic resonance (Rovira *et al.*, 2002).

Hepatic encephalopathy does not exclusively affect the motor tract. Disturbances of multiple neuronal pathways can be demonstrated by different neurophysiological techniques (i.e. evoked potentials, EEG), even in minimal HE (Montagnese *et al.*, 2004). The results of magnetic resonance imaging and transcranial magnetic stimulation suggest that this tract may be more vulnerable to the neuronal impairment that characterizes HE (Cordoba *et al.*, 2003a). Our results in two experimental model are in accordance with this interpretation. The reasons for a higher vulnerability are unknown, but may include higher energetic demands at this level or the fact that glutamate is the preferential neurotransmitter of this pathway.

A potential source of confusion in our study is the use of anesthetics, which are necessary to induce MEP in rats. Alterations of MEP have been observed with those anesthetics that are commonly used in these experiments: deflurane (Haghighi *et al.*, 1996a), isoflurane (Haghighi *et al.*, 1990a) and ketamine/xylazine (Zandieh *et al.*, 2003a). We decided to use propofol (Fishback *et al.*, 1995), because it has a short life and the depth of anesthesia can be rapidly change by modifying the rate of infusion. Furthermore, pharmacokinetic studies in patients with cirrhosis indicate that plasmatic levels are not affected by liver failure (Servin *et al.*, 1990). In our study, high doses of propofol caused a proportional decrease in the amplitude and an increase in the latency of the MEP. To palliate this effect, the electrophysiological recordings were made under the minimal dose of propofol that maintained the rat sedated. Although the anesthetic dose can affect the measurements of MEP, it is unlikely that the alterations in the amplitude and the latency reported in this study are the consequence of an effect of the anesthesia since we found different abnormalities in each model (amplitude in PCA rats, latency in cirrhotic rats).

Conclusions

Our study reports functional abnormalities of the central motor tract in the rat with PCA and in the rat with cirrhosis. These findings demonstrate that it is possible to reproduce in two animal models, the corticospinal tract abnormalities present in cirrhotic patients with minimal hepatic encephalopathy. Monitoring motor abnormalities in animal models of liver failure offers the possibility to investigate the pathogenic mechanisms involved in hepatic encephalopathy and test new therapeutic strategies.

Acknowledgments Study supported by Instituto de Salud Carlos III (C03/02; G03/155; FIS 05-1109; FIS 05-900). NC is a recipient of intraeuropean Marie Curie fellowship (2005-515397).

References

- Adams RD, Foley JM (1953) The neurological disorder associated with liver disease. *Res Publ Assoc Res Nerv Ment Dis* 32:198–237
- Andrefsky JC, Frank JJ (1997) Hepatic failure, encephalopathy, and deep tendon reflexes. *Neurology* 48:245
- Bengtsson F, Bugge M, Brun A, Falck B, Henriksson KG, Nobin A (1988) The impact of time after portacaval shunt in the rat on behavior, brain serotonin, and brain and muscle histology. *J Neurol Sci* 83:109–122
- Butterworth RF (2000) Hepatic encephalopathy: a neuropsychiatric disorder involving multiple neurotransmitter systems. *Curr Opin Neurol* 13:721–727
- Butterworth RF (2003) Pathogenesis of hepatic encephalopathy: new insights from neuroimaging and molecular studies. *J Hepatol* 39:278–285
- Chamuleau RA (1996) Animal models of hepatic encephalopathy. *Semin Liver Dis* 16:265–270
- Cordoba J, Gottstein J, Blei AT (1997) Stenosis of a portocaval anastomosis affects circadian locomotor activity: A multivariable analysis. *Am J Physiol* 273:G1218–G1225
- Cordoba J, Raguer N, Flavia M, Vargas V, Jacas C, Alonso J, Rovira A (2003a) T2 hyperintensity along the cortico-spinal tract in cirrhosis relates to functional abnormalities. *Hepatology* 38:1026–1033
- Cordoba J, Raguer N, Flavia M, Vargas V, Jacas C, Alonso J, Rovira A (2003b) T2 hyperintensity along the cortico-spinal tract in cirrhosis relates to functional abnormalities. *Hepatology* 38:1026–1033
- Erceg S, Monfort P, Hernandez-Viadel M, Rodrigo R, Montoliu C, Felipe V (2005) Oral administration of sildenafil restores learning ability in rats with hyperammonemia and with portacaval shunts. *Hepatology* 41:299–306
- Fishback AS, Shields CB, Linden RD, Zhang YP, Burke D (1995) The effects of propofol on rat transcranial magnetic motor evoked potentials. *Neurosurgery* 37:969–974
- Haghighi SS, Madsen R, Green KD, Oro JJ, Kracke GR (1990a) Suppression of motor evoked potentials by inhalation anesthetics. *J Neurosurg Anesthesiol* 2:73–78
- Haghighi SS, Madsen R, Green KD, Oro JJ, Kracke GR (1990b) Suppression of motor evoked potentials by inhalation anesthetics. *J Neurosurg Anesthesiol* 2:73–78
- Haghighi SS, Sirintrapun SJ, Keller BP, Oro JJ, Madsen R (1996a) Effect of desflurane anesthesia on transcortical motor evoked potentials. *J Neurosurg Anesthesiol* 8:47–51
- Haghighi SS, Sirintrapun SJ, Keller BP, Oro JJ, Madsen R (1996b) Effect of desflurane anesthesia on transcortical motor evoked potentials. *J Neurosurg Anesthesiol* 8:47–51
- Haussinger D, Kircheis G, Fischer R, Schliess F, vom Dahl S (2000) Hepatic encephalopathy in chronic liver disease: a clinical manifestation of astrocyte swelling and low-grade cerebral edema? *J Hepatol* 32:1035–1038
- Hawkins P, DeJoseph MR, Hawkins RA (1996) Eliminating metabolic abnormalities of portacaval shunting by restoring normal liver blood flow. *Am J Physiol* 270:E1037–E1042
- Hess CW, Mills KR, Murray NM (1987) Responses in small hand muscles from magnetic stimulation of human brain. *J Physiol* 388:397–419
- Keller BP, Haghighi SS, Oro JJ, Eggers GW, Jr (1992) The effects of propofol anesthesia on transcortical electric evoked potentials in the rat. *Neurosurgery* 30:557–560
- Lee SH, Fisher B (1961) Portacaval shunt in the rat. *Surgery* 50:668–672
- Lopez-Vales R, Garcia-Alias G, Fores J, Udina E, Gold BG, Navarro X, Verdu E (2005) FK 506 reduces tissue damage and prevents functional deficit after spinal cord injury in the rat. *J Neurosci Res* 81:827–836
- Lorenzo-Zuniga V, Bartoli R, Planas R, Hofmann AF, Vinado B, Hagey LR, Hernandez JM, Mane J, Alvarez MA, Ausina V, Gassull MA (2003) Oral bile acids reduce bacterial overgrowth, bacterial translocation, and endotoxemia in cirrhotic rats. *Hepatology* 37:551–557
- Montagnese S, Amodio P, Morgan MY (2004) Methods for diagnosing hepatic encephalopathy in patients with cirrhosis: a multidimensional approach. *Metab Brain Dis* 19:281–312
- Mullen KD, McCullough AJ (1989) Problems with animal models of chronic liver disease: suggestions for improvement in standardization. *Hepatology* 9:500–503
- Picardi A, de Oliveira AC, Muguerza B, Tosar A, Quiroga J, Castilla-Cortazar I, Santidrian S, Prieto J (1997) Low doses of insulin-like growth factor-I improve nitrogen retention and food efficiency in rats with early cirrhosis. *J Hepatol* 26:191–202
- Pilbeam CM, Anderson RM, Bhathal PS (1983) The brain in experimental portal-systemic encephalopathy. I. Morphological changes in three animal models. *J Pathol* 140:331–345
- Popken RJ, Kropveld D, Oosting J, Chamuleau RA (1983) Quantitative analysis of EEG power spectra in experimental hepatic encephalopathy. *Neuropsychobiology* 9:235–243
- Rovira A, Cordoba J, Sanpedro F, Grive E, Rovira-Gols A, Alonso J (2002) Normalization of T2 signal abnormalities in hemispheric white matter with liver transplant. *Neurology* 59:335–341

-
- Schlag MG, Hopf R, Redl H (2001) Serial recording of sensory, corticomotor, and brainstem-derived motor evoked potentials in the rat. *Somatosens Mot Res* 18:106–116
- Servin F, Cockshott ID, Farinotti R, Haberer JP, Winckler C, Desmots JM (1990) Pharmacokinetics of propofol infusions in patients with cirrhosis. *Br J Anaesth* 65:177–183
- Zandieh S, Hopf R, Redl H, Schlag MG (2003a) The effect of ketamine/xylazine anesthesia on sensory and motor evoked potentials in the rat. *Spinal Cord* 41:16–22
- Zandieh S, Hopf R, Redl H, Schlag MG (2003b) The effect of ketamine/xylazine anesthesia on sensory and motor evoked potentials in the rat. *Spinal Cord* 41:16–22
- Zwingmann C, Chatauret N, Leibfritz D, Butterworth RF (2003) Selective increase of brain lactate synthesis in experimental acute liver failure: results of a [^1H -C] nuclear magnetic resonance study. *Hepatology* 37:420–428

**ESTUDI 2: NOVA METODOLOGIA PER MESURAR LA
FUNCIONALITAT DE LA VIA MOTORA SENSE
ANESTÈSIA.**

5 ESTUDI 2: NOVA METODOLOGIA PER MESURAR LA FUNCIONALITAT DE LA VIA MOTORA SENSE ANESTÈSIA.

5.1 Hipòtesi i Objectius

5.1.1 Introducció

La neurofisiologia és una bona eina per estudiar la funcionalitat de la via motora en la rata tal i com es va demostrar en l'estudi 1. Per altra banda, està ben descrit i es va corroborar en l'estudi anterior, que els anestèsics tenen un efecte directe sobre les variables amplitud i latència dels potencials evocats motors. En el nostre cas, com utilitzem models experimentals d'insuficiència hepàtica, i la totalitat o part dels de la metabolització de l'anestèsia es dur a terme en el fetge, aquest procés podria interferir en els resultats; la insuficiència hepàtica podria incrementar la concentració sanguínia dels anestèsics. La implantació d'elèctrodes subcutanis permetria estudiar la funcionalitat de la via motora en rates despertes i en lliure moviment, evitant l'efecte inhibitor dels anestèsics.

5.1.2 Hipòtesi

Es possible desenvolupar una metodologia per estudiar els potencials evocats motors en la rata sense anestèsia.

5.1.3 Objectius

- 1- Desenvolupar una nova metodologia per monitoritzar els potencials evocats motors en rates despertes i en lliure moviment basada en la implantació d'elèctrodes subcutanis.
- 2- Estudiar la tolerància i la reproductibilitat dels registres neurofisiològics.
- 3- Un cop la metodologia estigui desenvolupada, estudiar l'efecte dels anestèsics més comuns en experimentació en neurofisiologia. Es van escollir dosis estàndards d'anestèsics i repetir els experiments amb dosis més baixes per veure el seu efecte.

5.2 Resum de l'estudi

El manuscrit descriu una nova metodologia experimental per estudiar la funcionalitat de la via motora. Aquesta nova metodologia està basada en la implantació de sis elèctrodes subcutanis més un cargol transcranial. Pel registre dels potencials evocats motors central i perifèric, un elèctrode és implantat al múscul tibial anterior (càtode) i un a l'empenya (ànode). Per la inducció del potencial d'acció motor compost després de l'estimulació del nervi perifèric dos elèctrodes són implantats prop del nervi ciàtic. Per la inducció dels potencials evocats motors centrals un elèctrode s'implanta a la barbata (ànode) i com a càtode s'utilitza un cargol implantat sobre de la dura a 1-2 mm posterior al punt craniomètric lambda i fixat amb ciment dental. Com a terra s'implanta un elèctrode a l'esquena de l'animal. Tots els elèctrodes es passen subcutàniament fins a l'esquena per evitar que l'animal se'ls pugui treure i s'identifiquen cada un amb un color.

Per analitzar la tolerància dels elèctrodes per part dels animals es va fer un estudi (n=6) a les que es va mesurar la pressió arterial mitja per veure el nivell d'estrès dels animals a 4 diferents temps. Basal, durant l'estimulació per obtenir el registre perifèric i central, i durant la manipulació de l'animal. Els elèctrodes van ser ben tolerats per part dels animals, mostrant poc nivell d'estrès durant l'estimulació perifèrica i central. En canvi va demostrar major estrès durant la manipulació de l'animal per part d'un experimentador.

Per a demostrar l'estabilitat dels potencials evocats motors, es van implantar els elèctrodes subcutanis a rates normals (n=10) i es van fer registres durant els primers 4 dies després de la implantació y després un cop per setmana durant un total de 3 setmanes. Alguns animals es van treure els elèctrodes i a la tercera setmana quedaven 6 animals per l'estudi. Els registres es van mostrar estables durant totes les setmanes excepte durant els primers 3 dies. L'alteració durant els primers dies es poden atribuir a l'efecte de la cirurgia i per tant per l'estudi repetit s'ha de tenir present la implantació dies previs a l'estudi.

Un cop la metodologia estava definida i s'havia demostrat la tolerància dels elèctrodes i l'estabilitat dels resultats durant almenys 3 setmanes es va realitzar un estudi dels efectes de 3 anestèsics més usats en estudis neurofisiològics (propofol, ketamina combinada amb xilacina i pentobarbital) a tres dosis diferents, essent la dosis alta la dosis recomanada per anestesiar els animals. Els 3 anestèsics mostren un efecte de tipus dosi-depenent en les variables latència i amplitud dels potencials motors però no tenen un efecte sobre els potencials evocats perifèrics. Gràcies a la seva ràpida metabolització el propofol sembla ser el millor per a fer estudis neurofisiològics a dosis baixes.

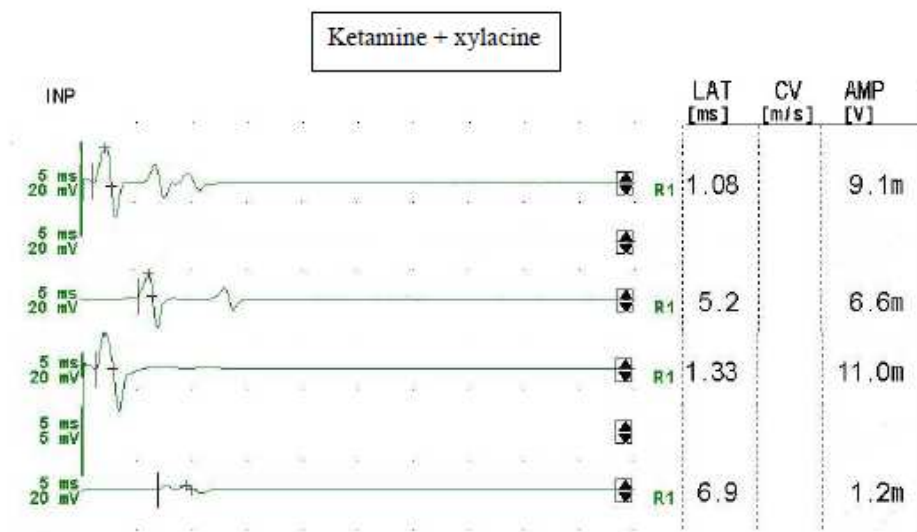


Figura 6: Exemple de registre neurofisiològic d'una rata control sota l'efecte de l'anestèsic Ketamina+Xilacina. Registre 1 i 4 són el registre perifèric (registre control) i el registre 2 a dosi baixa i registre 4 a dosi alta.

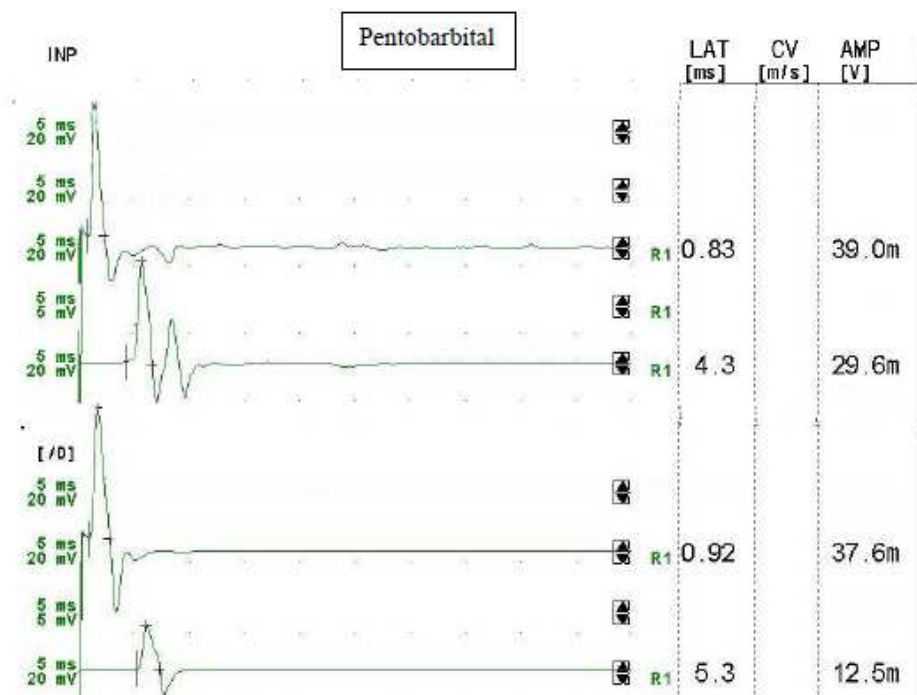


Figura 7: Exemple de registre neurofisiològic d'una rata control sota l'efecte de l'anestèsic Pentobarbital. Registre 1 i 4 són el registre perifèric (registre control) i el registre 2 a dosi baixa i registre 4 a dosi alta.

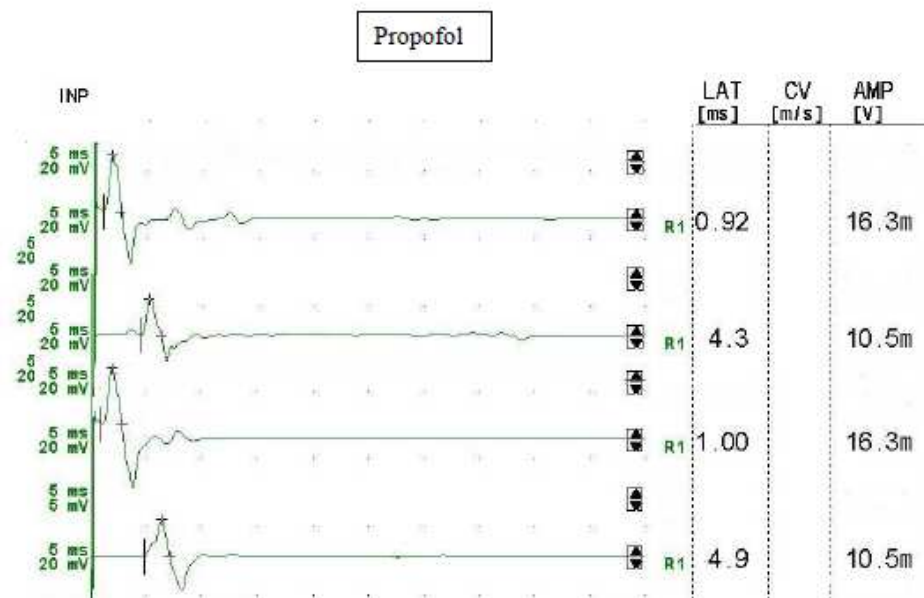


Figura 8: Exemple de registre neurofisiològic d'una rata control sota l'efecte de l'anestèsic Propofol. Registre 1 i 4 són el registre perifèric (registre control) i el registre 2 a dosi baixa i registre 4 a dosi alta.

La contribució més important d'aquest estudi és que estableix un mètode per mesurar els potencials evocats motors en rates despertes i sense restricció de moviment, que evita l'ús d'anestèsics. El model mostra uns registres excel·lents dels potencials evocats motors. Aquest estudi mostra que els diferents anestèsics tenen un efecte important sobre els potencials evocats motors. Aquest mètode pot ser de gran ajuda per seleccionar anestèsics durant les cirurgies que requereixen el monitoratge dels

potencials evocats motors. Per altra banda aquesta nova metodologia permetria la investigació de noves teràpies en l'estudi de les lesions medul·lars.

JOURNAL OF NEUROTRAUMA 25:266–275 (March 2008)
 © Mary Ann Liebert, Inc.
 DOI: 10.1089/neu.2007.0393

A New Method for Measuring Motor Evoked Potentials in the Awake Rat: Effects of Anesthetics

MARC ORIA,^{1,2,3} NICOLAS CHATAURET,¹ NURIA RAGUER,^{2,3,4}
 and JUAN CÓRDOBA^{1,2,3}

ABSTRACT

The goal of this investigation was to develop a method to study the neurophysiological integrity of the central motor tract using motor evoked potentials in the awake rat and assess the effects of different anesthetics in this model. Rats were implanted with six subcutaneous electrodes (pediatric myocardial pacing leads) and one cranial screw. Motor evoked potentials of the hind limb were elicited after cranial and sciatic nerve stimulation. Experiments were repeated on different days during three weeks studying the effect of three different anesthetics (propofol, ketamine/xylazine, pentobarbital) at three different doses. Stimulation of motor evoked potentials in the awake rat was well tolerated with no effects on behavior. The electrodes could be kept chronically in place without signs of infection. The repeated recordings on different days showed high reproducibility after the fourth day following implantation of the electrodes. All three anesthetics induced an increase in the latency and a decrease in the amplitude of the motor evoked potentials which were dose dependent. Propofol (up to 1 mg/kg · min⁻¹) affected motor evoked potentials to a lesser extent than the other anesthetics. Based upon these findings, we believe that our approach provides a new method of chronically implanting electrodes in the rat to assess the neurophysiological function of the motor tract without the need of anesthetics. This model may prove useful in the investigation of various diseases that affect the motor pathways without the confounding effects of anesthesia.

Key words: anesthetics; chronic implantation; experimental models; free moving; motor evoked potentials

INTRODUCTION

MOTOR EVOKED POTENTIALS (MEP) assess the physiological integrity of central nervous system motor pathways (Merton et al., 1980). In clinical practice, they are used to understand the extension and prognosis of different neuronal injuries (Hendricks et

al., 2002) and monitor possible lesions during surgical procedures, particularly at the level of the spinal cord (Nagle et al., 1996). As an investigational tool, MEP are used in the experimental model of spinal cord injury (Fehlings et al., 1987), where they can demonstrate the effects of different therapeutic approaches (Fehlings et al., 1989).

¹Servicio de Medicina Interna-Hepatología, Hospital Vall d'Hebron, Barcelona, Spain.

²Departament de Medicina, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain.

³Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBEREHD), Barcelona, Spain.

⁴Servicio de Neurofisiología Clínica, Hospital Vall d'Hebron, Barcelona, Spain.

MEASURING MOTOR EVOKED POTENTIALS IN THE AWAKE RAT

Several functional and neurophysiological rat models have been developed to investigate injury to central motor tracts (Sipski, 2003). Behavioral tests are important to demonstrate significant recovery after spinal cord injury, but may lack sensitivity to detect mild forms of improvement (Shi et al., 1997). In addition, neurophysiological studies are essential to indicate which tracts are affected and how they regenerate following therapy (Yu et al., 2001). One of the limitations of using MEP to study the motor tract is the need for conducting the tests under anesthesia, because anesthetics have a direct effect on the induction of MEP. Anesthetics may explain the high variability of MEP parameters reported in different studies (Kawaguchi et al., 1996; Keller et al., 1992; Zandieh et al., 2003). The comparison of the characteristics of MEP elicited under different doses or at different times after initiation of anesthesia have led to promote some anesthetics over others (Goss-Sampson et al., 1991).

Another indication of monitoring MEP could be the detection of neuronal dysfunction in metabolic diseases. We have found impairment of MEP in two experimental models of hepatic encephalopathy (Oria et al., 2006). However, one possible source of confusion

in these studies is that liver failure influences the metabolism of the anesthetic. For this reason, our aim was to develop a method to monitor the function of the motor tract in freely moving rats. We developed this method using subcutaneous electrodes and tested the tolerance and the reproducibility of the recordings. Once the new method was developed, our aim was to assess to what extent anesthetics commonly used in neurophysiological experiments affect MEP. We tried standard doses of three anesthetics and repeated the experiments under lower doses, to show that even light anesthesia may affect MEP.

METHODS

General Aspects

This study was performed in Sprague-Dawley male rats (Harlan, Barcelona, Spain), weighing 250–275 g. Animals were housed individually in polycarbonate cages with humidity and temperature controlled at 55% and 22°C, respectively, with a light/dark cycle of 12h/12h. Animals were fed standard rat chow (A04, Panlab SA, Barcelona, Spain) and drinking water *ad libitum*.

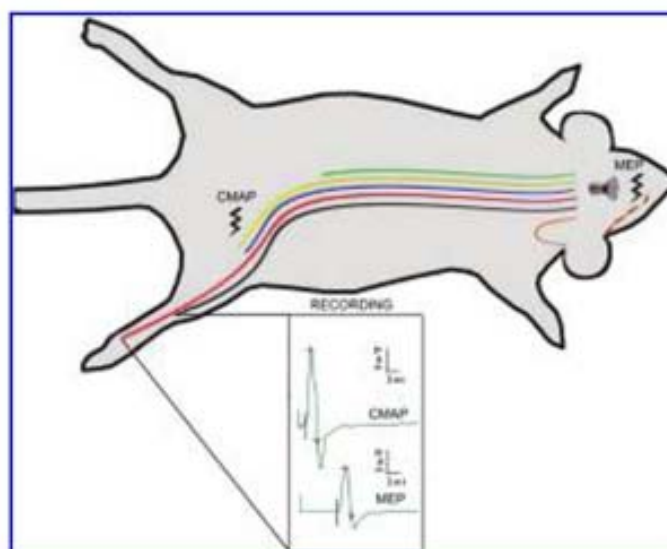


FIG. 1. Schematic representation of the subcutaneous electrodes used for the neurophysiological recordings in the rat. The electrodes implanted in the tibialis anterior muscle (black line: cathode) and the foot pad (red line: anode) were used for recording the motor evoked potential (MEP). The electrodes implanted adjacent to the sciatic nerve (yellow line: cathode) and close to the sciatic nerve, under the skin (blue line: anode) were used for the induction of compound motor action potential (CMAP). The MEP were induced after stimulation on a cranial screw (cathode) and an electrode implanted in the lower jaw (orange line: anode). An additional electrode was implanted in the lumbar region for ground (green line). MEP and CMAP were induced by electric stimulation (ξ)

ORIA ET AL.

The experiments were conducted in agreement with the guidelines for animal research of the Spanish legislation, were approved by the Animal Care Committee of the Catalan Government, and were conducted in the animal facilities of the Institut de Recerca de l'Hospital Vall d'Hebron

Development of the Model

We developed a method of chronically implanted electrodes to perform neurophysiological recordings without anesthetics in the rat. This method was a modification of a prior model (Schlag et al., 2001). The main difference in our method is the implantation of subcutaneous electrodes, instead of the use of needles for peripheral nerve stimulation and recording of evoked potentials.

Placement of electrodes. After multiple assays with different electrodes, we choose pediatric myocardial pacing leads (6492 model unipolar temporary atrial pacing lead; Medtronic Inc., Minneapolis, MN). The pacing lead consists of an electrode and an insulated multi-filament conductor which are crimped together. The distal extreme contains a blue monofilament, proximately coiled, for fixation of the lead. The filament is attached to the electrode and terminates distally in an atraumatic myocardial curved needle, which is used for fixation of the electrode. The coil and the lead are inserted in the tissue (muscle or subcutaneous tissue) by gentle traction of the needle. Once the electrode is fixed with a knot, the straight end of the monofilament is cut off and the curved myocardial needle is discarded. The electrode has a diameter of 0.6 mm and provides a surface area of 5.0 mm². This small diameter and the high flexibility of the electrode provide good tolerance and minimal trauma during implantation. The proximal extreme has a connector pin (muscle) of 0.86 mm, which is connected to the electromyograph. The connection was performed through a specifically designed cable of 0.5 m length (Medtronic) that has a female connector in one extreme and a touchproof connector in the other end. The latter connects to the electromyograph.

In our method, a total of six subcutaneous electrodes were implanted under inhalational isoflurane anesthesia (Fig. 1). For the recording of MEP and compound motor action potential (CMAP), one electrode was implanted in the tibialis anterior muscle (cathode) and one implanted subcutaneously at the foot pad level (anode). For the induction of CMAP following peripheral nerve stimulation, one electrode was implanted in the muscle (cathode) and another subcutaneously (anode), both near the sciatic nerve. For the induction of MEP (after central stimulation) one electrode was implanted sub-

cutaneously at the level of the lower jaw (anode) and a cranial screw was used for the cathode. For ground, an electrode was implanted subcutaneously in the lumbar region.

First, 5–10-mm incisions were made at the level of the shoulder blades (to exit the connectors) and at all the sites of placement of electrodes (mentioned above). Second, a blunt mosquito was used to make tunnels in the skin going from the shoulder blade incision towards each of all the other incisions. Once the mosquito had reached the opening at the implantation site of the electrode, it was used to pull the connector end of the pace lead under the skin and to exit it in the back of the animal. This procedure was repeated for the six electrodes. Once the electrodes were all passed subcutaneously, they were inserted by gentle traction of the atraumatic myocardial needle either in the muscle or in the skin epidermis made accessible by the surgical incision. In those cases, the coiled thread was located out of the tissue and a knot was performed to secure the electrode into place. The needle end of the suture was then cut off and discarded. The connector of each electrode was uniquely identified by colored tapes. Once all the electrodes were implanted, all but the shoulder blade incisions were closed up using 4.0 absorbable suture. The total length of the pace lead was 15 cm; the excess wire was hidden under the skin in the back of the animal at the level of the shoulder blade incision. The incision was closed up once only the connectors and 1 cm of wire were left protruding from the skin. The tip of the connector pin exited the skin of the back of the neck of the animal. All electrode wires (with connector pins) were taped together and sutured to the skin to avoid rat interference. Placement of electrodes was performed under surgical antisepsis. The surgical wound was cleansed periodically (every 2–3 days) with povidone-iodine.

Cranial screw. The cranial screw was implanted as the cathode for eliciting MEP. For this purpose the animals were anesthetized with inhalational isoflurane and the rat's head was fixed in a stereotaxic frame (Kopf Instruments, San Diego, CA). The skull was drilled (Dremel, Madrid, Spain) with a 1.1-mm-diameter drill bit (ref. 505.111; Panoptica, Barcelona, Spain), avoiding the perforation of the dura of the brain. The screw was made from stainless steel, had a length of 10 mm, a diameter of 1.4 mm, and a cap of 2.8 mm (ref. 00.028; Panoptica). The cranial screw was positioned 1–2 mm posterior to lambda at a depth of 1.5 mm and was fixed with dental cement. The connection of the cranial screw to the electromyograph was performed through a cable that had in one extreme an alligator clip and a touchproof connector in the other extreme.

MEASURING MOTOR EVOKED POTENTIALS IN THE AWAKE RAT

Electrophysiological recordings. During all the neurophysiological recordings, the rats were freely moving in their individual cages. The cables of the electromyograph were hanging from a swivel and were connected to the connector pins at the time of the electrophysiological recordings.

The MEP were induced and registered with an electromyograph (Medtronic Keypoint Portable). The band-pass used for recording the evoked potentials was 2 Hz to 10 KHz. Throughout the experiments, the duration of the pulse was 0.1 msec. The recordings were started by measuring the maximum amplitude of the CMAP. This was achieved by stimulating the sciatic nerve with a single pulse of supramaximal intensity. In order to induce MEP, progressively increasing stimulating intensities were applied at the cranial screw level until the MEP amplitude was maximal and did not further increase with higher intensities of stimulation. The mean of four motor potentials were recorded at the supramaximal intensity. The amplitude and latency of MEP and CMAP were calculated according to standard definitions (Fig. 2). The CMAP and MEP latencies were expressed in milliseconds (msec) and amplitudes in millivolts (mV). To standardize results, MEP amplitude was also expressed as the rate of peripheral response MEP/CMAP (%).

Short-term study. The feasibility and the tolerance to neurophysiological recordings were formally evaluated in a group of six rats. During the recording, arterial pressure was monitored as an index of acute stress. For this purpose, animals were anesthetized with inhalational isoflurane and the right common carotid was cannulated with a PE 50 catheter (Intramedic Clay Adams; Becton Dickinson, Sparks, MD) and flushed with 1% heparin solution. The catheter was introduced 1 cm in the carotid, fixed with a 3/0 silk suture, and passed subcutaneously to the back of the animal to avoid removal of the catheter. The catheter was connected to a transducer system (Cardiacap/5; Datex Ohmeda, Louisville, CO) and calibrated with respect to atmospheric pressure. Four different arterial pressure measurements were assessed: (1) basal (before recording), (2) while manipulating the rat, (3) during induction of CMAP, and (4) during induction of MEP.

Long-term study. The stability of the neurophysiological recordings was assessed in a group of 10 rats. Each rat underwent seven repeated measures following implantation of electrodes: daily during the first 4 days and once a week during the following 3 weeks.

Administration of Anesthetics

The study employed neurophysiological assessment of measuring the effects of commonly used anesthetics on

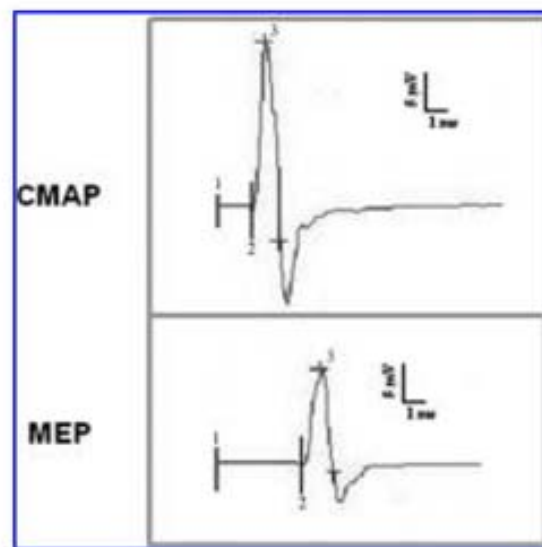


FIG. 2. Typical trace obtained after peripheral stimulation (compound motor action potential [CMAP]) and after central stimulation (motor evoked potential [MEP]) in the awake rat. Amplitude (mV) was measured from the initiation of the negative wave (2) to its maximal height (crest, 3). Latency (msec) was measured from the administration of the electrical pulse (1) to the beginning of the negative wave (2).

motor tract function. Three different groups of rats ($n = 6$ for each anesthetic) were studied with three different anesthetics at three different doses. The anesthetic study was performed 3 days after the implantation of electrodes, and the three different doses were assessed with 1 day of rest between each study, beginning with the lowest dose. The neurophysiological recordings were performed 10–15 min after the administration of the anesthetic. The higher doses were selected according to standard recommendations (Flecknell, 1987); the other two doses corresponded to 25% and 50% of the higher doses. Propofol was administered intravenously as a bolus dose of 10 mg/kg, followed by different maintenance doses (0.25, 0.5, and 1 mg/kg/min). Pentobarbital was administered intraperitoneally at the following doses: 20, 40, and 80 mg/kg. Ketamine/xylazine was administered intraperitoneally at the following doses: 20/2.5, 40/5, and 80/10 mg/kg.

Statistical Analysis

Results are expressed as mean \pm standard deviation. Intragroup comparisons of the same variable were performed with paired Student's *t*-test for two determinations, and repeated-measures analysis of variance (ANOVA) was used for multiple comparisons, followed

by pairwise comparisons with the Holm-Sidak method. The Sigma Stat package was used for statistical calculations.

RESULTS

Characteristics of the Model

Short-term study. Electric stimulation induced MEP of similar morphology (Fig. 2) as described for MEP of brainstem origin in prior studies under anesthetics (Zandieh et al., 2003). The recordings were well tolerated by the rats, which were behaving normally without exhibiting evasive behaviors. Some rats exhibited subtle signs of stress (change in respiratory rhythm, occasional tiny squeaks) during sciatic nerve stimulation; this was

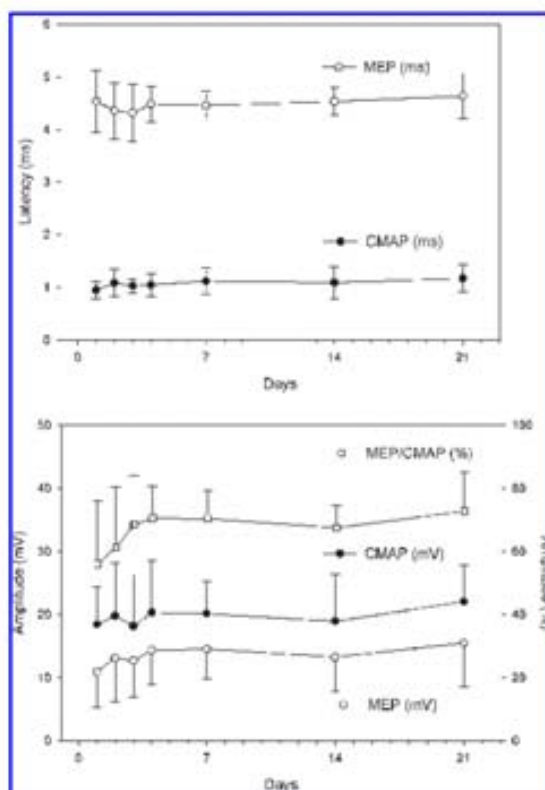


FIG. 3. Latencies (upper figure) of motor evoked potential (MEP, msec) and compound motor action potential (CMAP, msec) and amplitudes (lower figure) of MEP (mV), CMAP (mV), and MEP/CMAP (%), expressed as mean \pm standard deviation (SD) ($n = 10$), during 21 days after the implantation of the electrodes. The recordings were performed without anesthesia.

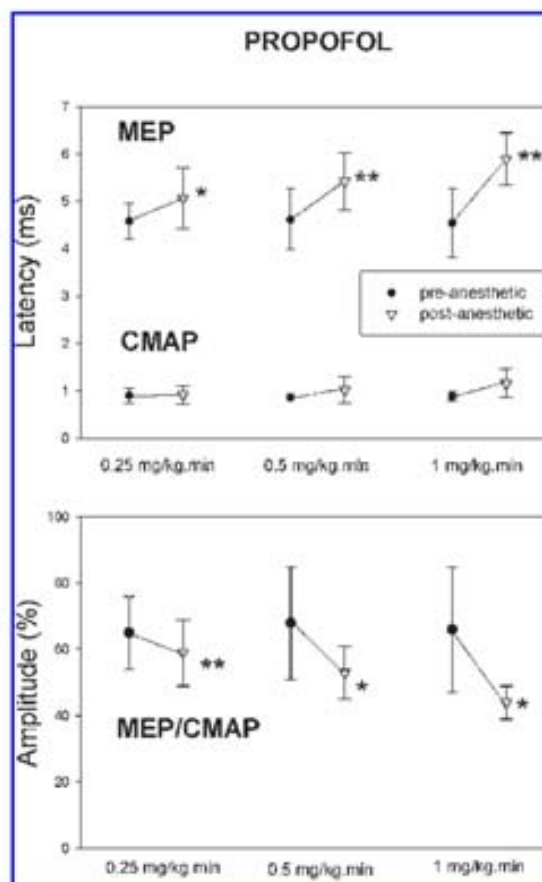


FIG. 4. Latencies (upper figure) of motor evoked potential (MEP, msec) and compound motor action potential (CMAP, msec) and amplitude (lower figure) of MEP/CMAP (%), expressed as mean \pm standard deviation (SD) ($n = 6$), before and after the administration of propofol at three different doses: 0.25, 0.5, and 1 mg/kg/min. An effect of dose on latency was shown by repeated-measures analysis of variance (ANOVA) ($p = 0.03$). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (paired t -test pre-anesthetic vs. post-anesthetic).

not observed during central stimulation. Mean arterial pressure (baseline 131 ± 11 mm Hg) increased during peripheral electric stimulation (139 ± 11 mm Hg, $p < 0.01$ vs. baseline) to similar values to those observed while touching the rat (139 ± 11 mmHg, $p < 0.01$ vs. baseline). The increase in mean arterial pressure after central electric stimulation (136 ± 13 mm Hg) did not reach statistical significance.

Long-term study. The behavior and state of the animals were normal during the 3 weeks of repeated stimulations.

MEASURING MOTOR EVOKED POTENTIALS IN THE AWAKE RAT

Initial signs of stress in some rats disappeared over time. The rats gained weight and exhibited normal health. The latencies and amplitudes of CMAP and MEP remained stable during repeated stimulation, except for the 3 first days (Fig. 3). The amplitude of the MEP/CMAP increased progressively from $56 \pm 20\%$ at the first day to $61 \pm 19\%$ at the second day, $68 \pm 15\%$ at the third day, and $70 \pm 10\%$ at the fourth day ($p = 0.04$, ANOVA for repeated measures). After the third day, the mean coefficient of variation of the MEP latency was 4% and of the MEP/CMAP amplitude was 9%.

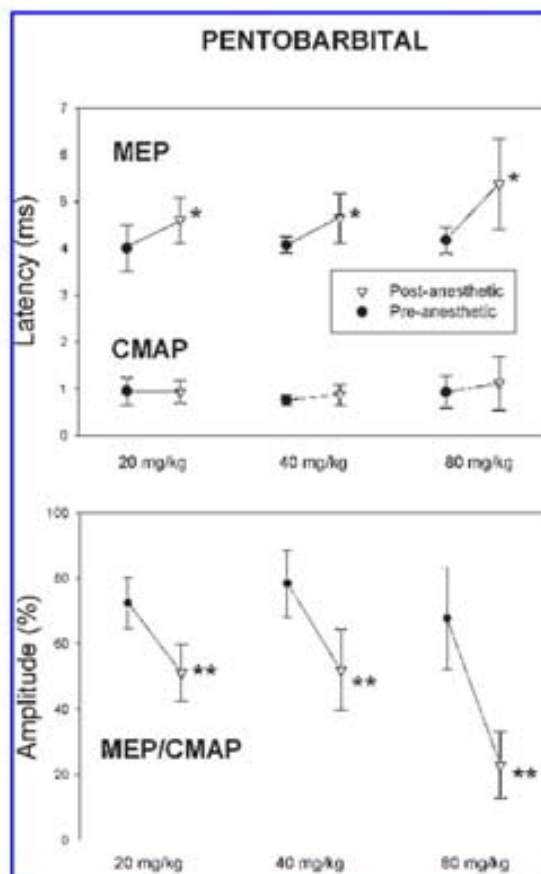


FIG. 5. Latencies (upper figure) of motor evoked potential (MEP, msec) and compound motor action potential (CMAP, msec) and amplitude (lower figure) of MEP/CMAP (%), expressed as mean \pm standard deviation (SD) ($n = 6$), before and after the administration of pentobarbital at three different doses: 20, 40, and 80 mg/kg. An effect of dose on latency ($p = 0.05$) and amplitude ($p = 0.03$) was shown by repeated-measures analysis of variance (ANOVA). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (paired t -test pre-anesthetic vs. post-anesthetic).

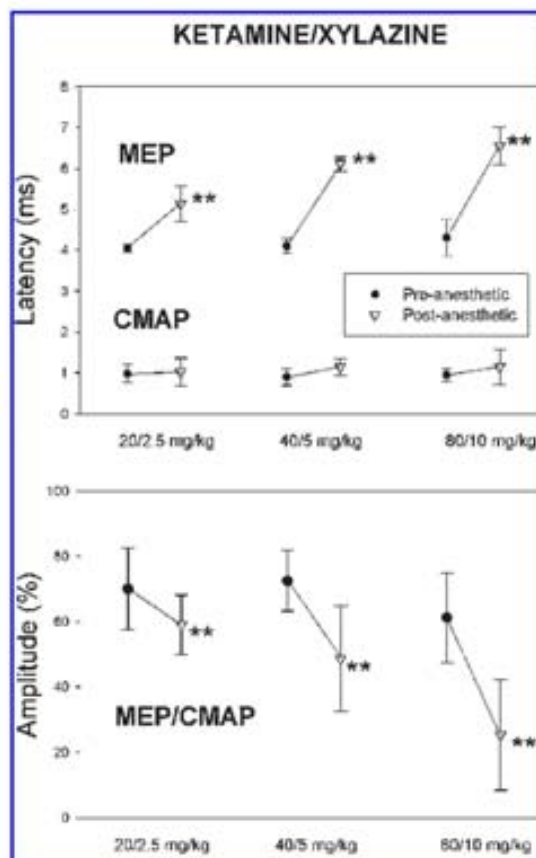


FIG. 6. Latencies (upper figure) of motor evoked potential (MEP, msec) and compound motor action potential (CMAP, msec) and amplitude (lower figure) of MEP/CMAP (%), expressed as mean \pm standard deviation (SD) ($n = 6$), before and after the administration of ketamine/xylazine at three different doses: 20/2.5, 40/5, and 80/10 mg/kg. An effect of dose on latency ($p < 0.001$) and amplitude ($p < 0.001$) was shown by repeated-measures analysis of variance (ANOVA). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (paired t -test pre-anesthetic vs. post-anesthetic).

Effects of Anesthetics

Pre-anesthetics. The latencies of the MEP and CMAP and the amplitudes of MEP/CMAP prior to the administration of the different anesthetics (Figs. 4–6) were not statistically significant different between the three groups of rats and did not differ from the results obtained in the long-term study performed without anesthetics. The intragroup mean coefficient of variation (variability of the pre-anesthetic recordings of the same rat in 3 different days) of the MEP latency was 5% and of the MEP/CMAP amplitude was 12%.

ORIA ET AL.

Post-anesthetics. The latencies of the MEP after the administration of the different anesthetics showed an increase that was proportional to the dose used (Figs. 4–6). Similarly, the anesthetic induced a decrease in the MEP amplitudes, that was significant for ketamine/xylazine (medium and high doses) and for Pentobarbital (Table 1). Since the anesthetics did not cause any significant effect on the amplitude of the CMAP, the ratio of amplitude MEP/CMAP showed a decrease (Figs. 4–6). The comparison of the intergroup mean coefficient of variation (variability within the three groups of rats) before and after the administration of the anesthetic did not show statistically significant differences either for MEP latencies (pre-anesthetic at 8% vs. post-anesthetic at 9%) or MEP/CMAP amplitudes (pre-anesthetic at 18% vs. post-anesthetic at 24%).

DISCUSSION

MEP have been widely used in experimental models. The main goals have been as follows: (a) investigation of motor pathways (Zappulla et al., 1988), (b) assessment of neuronal recovery after spinal cord injury (Fehlings et al., 1989), and (c) selection of anesthetics for monitoring motor tract injury during spinal surgery (Zentner et al., 1997). Although the origin and conduction pathway of MEP are controversial (Yu et al., 2001), they are useful to monitor spinal cord injury and can be performed in addition to behavioral and histological investigations (Fehlings et al., 1995). MEP identified discomplete spinal cord injury (Dimitrijevic et al., 1983), a state characterized by some control of supraspinal neurons to motor function below the level of cord injury. This notion led to new therapeutic approaches, such as the demonstra-

tion that aminopyridine improves the impulse conduction of the injured cord (Qiao et al., 1997). Since recovery after spinal cord injury was slow, it was necessary to develop methods for repeated monitoring of MEP in the same animal under different experimental conditions and for long periods of time.

The most important limitation of chronic monitoring is achieving reproducible MEP. The location of induction and recording electrodes is one of the critical factors. This may be in part resolved with the use of cranial screws, that allow the repeated induction of depolarization at the same point without the need of craniotomy (Gruner et al., 1993). Another important source of variability is anesthesia. Differences in results between studies may be explained by the characteristics of anesthesia. It has been demonstrated that it is necessary to achieve a certain plane of anesthesia to obtain good reproducibility and that the depth of anesthesia to record adequately is different for somesthetic or motor evoked potentials (Zandieh et al., 2003). The influence of anesthesia requires a high precision in controlling the dose and the time of recording. Additional problems are the registering of MEP in models that may affect anesthesia metabolism, such as rats with liver failure and the impossibility to investigate cortical excitability under anesthesia.

The present study demonstrates the feasibility to monitor MEP in the rat without anesthesia. MEP are induced after transcranial electric stimulation of central motor pathways. Although not specifically investigated in our study, the characteristics of the MEP are in accordance with a brainstem origin (Schlag et al., 2001). In rodents, the main motor pathway corresponds to the rubrospinal tract (Zappulla et al., 1988). In comparison to other experimental preparations, our method is simple to perform and can be generalized to many laboratories. There is no

TABLE 1. AMPLITUDE OF CMAP AND MEP (mV)

	CMAP		MEP	
	Pre-anesthetic	Post-anesthetic	Pre-anesthetic	Post-anesthetic
Propofol 0.25	24.3 ± 7.2	22.7 ± 5.9	15.2 ± 6.6	13.4 ± 4.9
Propofol 0.5	19.7 ± 3.0	20.9 ± 3.6	12.7 ± 4.2	11.2 ± 3.9
Propofol 1	18.3 ± 1.5	20.4 ± 1.2	10.9 ± 2.6	8.8 ± 0.8
Ketamine/xylazine 20/2.5	19.1 ± 11.7	19.9 ± 12.41	13.8 ± 8.9	11.9 ± 7.7
Ketamine/xylazine 40/5	19.5 ± 11.0	17.1 ± 9.6	14.5 ± 8.8	9.0 ± 6.7**
Ketamine/xylazine 80/10	20.0 ± 9.7	18.6 ± 8.6	12.2 ± 6.2	4.5 ± 4.7*
Pentobarbital 20	22.6 ± 10.2	23.4 ± 10.2	16.0 ± 6.3	11.2 ± 5.3**
Pentobarbital 40	23.0 ± 9.2	22.7 ± 8.7	18.4 ± 8.0	11.6 ± 4.9**
Pentobarbital 60	26.4 ± 8.3	24.3 ± 9.7	18.4 ± 7.4	5.8 ± 6.7**

* $p < 0.05$. ** $p < 0.01$ (pre-anesthetic vs. post-anesthetic).

CMAP, compound motor action potential; MEP, motor evoked potential.

MEASURING MOTOR EVOKED POTENTIALS IN THE AWAKE RAT

need for craniotomy and the implantation of the different electrodes is done under anesthesia in one session of less than 30 min. The surgery is easy to perform and consists simply of drilling a screw to the skull and implanting subcutaneous commercially available electrodes. Four days later, the animal is ready for use. The only precaution is to cover the extreme of the electrode and keep the animals in individual cages to avoid displacements of the electrodes by the same or other animals. The method is safe; prior to its development, we were concerned about the tolerance to electric stimulation without anesthesia. To assess tolerance during the experiments, we carefully monitored rat behavior and did not observe any major signs of stress. The rats gained weight and did not exhibit escape behaviors.

The lack of the interfering effect of anesthesia allows a good reproducibility of MEP with this method. We have observed a low coefficient of variation. The best results are obtained comparing the same rat on repeated testing (coefficient of variation, <12%). The intra-group coefficient of variation is higher (8–24%), which may be explained by rat differences in the response to electric stimulation or more probably, small differences in the location of recording electrodes between different rats. The fact that for specific rat the electrodes are placed in the same location for a long period of time, may account for an important part of the elevated reproducibility. In addition, due to the lack of anesthesia, the MEP obtained with our method are of lower latency and higher amplitude than in other studies. These characteristics may make this method more sensitive to detect injury or regeneration of the motor tract.

One of the aims of our study was to show that even low doses of anesthetics affect the MEP. We chose anesthetics that are commonly used in experimental studies (Haghighi et al., 1990; Keller et al., 1992; Zandieh et al., 2003); the higher dose corresponds to the usual dose reported in most studies. We observed an effect of the anesthetics on the latency and amplitude of MEP. In contrast, CMAP induced by peripheral nerve stimulation were not affected by the anesthetics at the doses used in this study. The stability of CMAP is useful to define MEP/CMAP, which appears to be a better variable than MEP to assess amplitude. The effect of propofol and of low-dose ketamine/xylazine on the amplitude of the MEP became statistically significant after adjusting for CMAP. This adjustment controls better differences between rats and allows to perform studies with fewer number of animals.

The differences in the effects of anesthetics on central and peripheral induced potentials can be explained by their mechanism of action (Belelli et al., 1999). Propofol and pentobarbital enhance inhibitory transmission via the γ -aminobutyric acid A (GABA_A) receptor. Ketamine in-

hibits glutamatergic neurotransmission blocking the channel of the NMDA receptor and xylazine inhibits noradrenergic neurotransmission by activating presynaptic adrenergic alpha-2 receptors. Inhibition of neurotransmission may decrease the efficiency of synaptic conduction between the first (central) and second (peripheral) neuron of the motor pathway and consequently decrease the amplitude and increase the latency of MEP. Anesthetics may also have an effect on voltage-gated channels, which may impair the transmission of the action potential through the nerve and block peripheral nerve conduction, affecting CMAP. However, this effect is not the primary mechanism of action of the anesthetics used in the current study (Jones et al., 1996). The influence of anesthesia may have limited the value of MEP in detecting injury to the spinal cord (Sloan, 1998). Several studies have been conducted to demonstrate the superiority of a specific anesthetic (Nathan et al., 2003; Sloan, 1998). We did not use a neurological scale to monitor the depth of anesthesia and for this reason a direct comparison between the anesthetics is not possible. However, in all experiments the rats appeared to be deeply anesthetized, except at low doses of propofol (0.25 mg/kg · min), in which they were easily arousable. Higher doses induced a grade of anesthesia similar to the one observed with the other two anesthetics. However, the extent of the effect of anesthesia on MEP was more marked with high doses of pentobarbital and ketamine/xylazine than with propofol. This finding is in accordance with the tendency to promote propofol based anesthesia over other anesthetic regimens (Nathan et al., 2003). The short half-life of propofol makes this anesthetic very appealing because the depth of anesthesia may be rapidly modified with a change in the rate of infusion.

An additional application of our method is the investigation of the effects of liver failure on the motor tract. Patients with advanced cirrhosis of the liver exhibit a dysfunction of the motor tract, which corresponds to a manifestation of hepatic encephalopathy (Cordoba et al., 2003). We have reproduced this abnormality in rats with carbon tetrachloride induced cirrhosis and in rats with four weeks porto-caval anastomosis, which are experimental models of minimal hepatic encephalopathy (Oria et al., 2006). However, liver failure may enhance the effects of anesthetics. Preliminary data confirm the superiority of using a model without anesthesia to study rats with liver failure (Chatauret et al., 2007).

In conclusion, we have developed a new method to assess the function of the motor tract in awake rats eliminating the effects of anesthesia. The method consists of induction and recording of MEP with chronically implanted subcutaneous electrodes. It is easy to apply and shows adequate reproducibility, which makes it feasible

ORIA ET AL.

for repeated assessment in models of metabolic or structural injury to central motor tracts.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by Instituto de Salud Carlos III (PI050900). N.C. is a recipient of an Intra-European Marie Curie Fellowship (2005-515397).

REFERENCES

- Belelli, D., Pistis, M., Peters, J.A., and Lambert, J.J. (1999). General anaesthetic action at transmitter-gated inhibitory amino acid receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* **20**, 496–502.
- Chatauret, N., Oria, M., Ragner, N., and Cordoba, J. (2007). Caracterización de las alteraciones de la función motora asociadas con los estadios iniciales de encefalopatía en la rata con devascularización hepática: un nuevo método para evaluar tratamientos. *Gastroenterol. Hepatol.* **30**, 142–143.
- Cordoba, J., Ragner, N., Flavia, M., et al. (2003). T2 hyperintensity along the cortico-spinal tract in cirrhosis relates to functional abnormalities. *Hepatology* **38**, 1026–1033.
- Dimitrijevic, M.R., Faganel, J., Lehmkuhl, D., and Sherwood, A. (1983). Motor control in man after partial or complete spinal cord injury. *Adv. Neurol.* **39**, 915–926.
- Fehlings, M.G., Tator, C.H., Linden, R.D., and Piper, I.R. (1987). Motor evoked potentials recorded from normal and spinal cord-injured rats. *Neurosurgery* **20**, 125–130.
- Fehlings, M.G., Tator, C.H., and Linden, R.D. (1989). The effect of nimodipine and dextran on axonal function and blood flow following experimental spinal cord injury. *J. Neurosurg.* **71**, 403–416.
- Fehlings, M.G., and Tator, C.H. (1995). The relationships among the severity of spinal cord injury, residual neurological function, axon counts, and counts of retrogradely labeled neurons after experimental spinal cord injury. *Exp. Neurol.* **132**, 220–228.
- Flecknell, P. (1987). *Laboratory Animal Anaesthesia*, Academic Press: London.
- Goss-Sampson, M.A., and Kriss, A. (1991). Effects of pentobarbital and ketamine-xylazine anaesthesia on somatosensory, brainstem auditory and peripheral sensory-motor responses in the rat. *Lab. Anim.* **25**, 360–366.
- Gruner, J.A., Wade, C.K., Menna, G., and Stokes, B.T. (1993). Myoelectric evoked potentials versus locomotor recovery in chronic spinal cord injured rats. *J. Neurotrauma* **10**, 327–347.
- Haghighi, S.S., Madsen, R., Green, K.D., Oro, J.J., and Kracke, G.R. (1990). Suppression of motor evoked potentials by inhalation anesthetics. *J. Neurosurg. Anesthesiol.* **2**, 73–78.
- Hendricks, H.T., Zwarts, M.J., Plat, E.F., and Van Limbeek, J. (2002). Systematic review for the early prediction of motor and functional outcome after stroke by using motor-evoked potentials. *Arch. Phys. Med. Rehabil.* **83**, 1303–1308.
- Jones, S.J., Harrison, R., Koh, K.F., Mendoza, N., and Crookard, H.A. (1996). Motor evoked potential monitoring during spinal surgery: responses of distal limb muscles to transcranial cortical stimulation with pulse trains. *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.* **100**, 375–383.
- Kawaguchi, M., Shimizu, K., Furuya, H., Sakamoto, T., Ohnishi, H., and Karasawa, J. (1996). Effect of isoflurane on motor-evoked potentials induced by direct electrical stimulation of the exposed motor cortex with single, double, and triple stimuli in rats. *Anesthesiology* **85**, 1176–1183.
- Keller, B.P., Haghighi, S.S., Oro, J.J., and Eggers, G.W., Jr. (1992). The effects of propofol anesthesia on transcortical electric evoked potentials in the rat. *Neurosurgery* **30**, 557–560.
- Merton, P.A., and Morton, H.B. (1980). Stimulation of the cerebral cortex in the intact human subject. *Nature* **285**, 227.
- Nagle, K.J., Emerson, R.G., Adams, D.C., et al. (1996). Intraoperative monitoring of motor evoked potentials: a review of 116 cases. *Neurology* **47**, 999–1004.
- Nathan, N., Tabaraud, F., Lacroix, F., et al. (2003). Influence of propofol concentrations on multipulse transcranial motor evoked potentials. *Br. J. Anaesth.* **91**, 493–497.
- Oria, M., Ragner, N., Chatauret, N., et al. (2006). Functional abnormalities of the motor tract in the rat after portocaval anastomosis and after carbon tetrachloride induction of cirrhosis. *Metab. Brain Dis.* **21**, 297–308.
- Qiao, J., Hayes, K.C., Hsieh, J.T., Potter, P.J., and Delaney, G.A. (1997). Effects of 4-aminopyridine on motor evoked potentials in patients with spinal cord injury. *J. Neurotrauma* **14**, 135–149.
- Schlag, M.G., Hopf, R., and Redl, H. (2001). Serial recording of sensory, corticomotor, and brainstem-derived motor evoked potentials in the rat. *Somatosens. Mot. Res.* **18**, 106–116.
- Shi, R., and Blight, A.R. (1997). Differential effects of low and high concentrations of 4-aminopyridine on axonal conduction in normal and injured spinal cord. *Neuroscience* **77**, 553–562.
- Sipski, M.L. (2003). From the bench to the body: key issues associated with research aimed at a cure for SCI. *J. Rehabil. Res. Dev.* **40**, 1–7.
- Sloan, T.B. (1998). Anesthetic effects on electrophysiologic recordings. *J. Clin. Neurophysiol.* **15**, 217–226.
- Yu, K., Rong, W., Li, J., et al. (2001). Neurophysiological evidence of spared upper motor conduction fibers in clinically complete spinal cord injury: discomplete SCI in rats. *J. Neurosci.* **189**, 23–36.

MEASURING MOTOR EVOKED POTENTIALS IN THE AWAKE RAT

- Zandieh, S., Hopf, R., Redl, H., and Schlag, M.G. (2003). The effect of ketamine/xylazine anesthesia on sensory and motor evoked potentials in the rat. *Spinal Cord* **41**, 16-22.
- Zappulla, R.A., Hollis, P., Ryder, J., et al. (1988). Noncortical origins of the spinal motor evoked potential in rats. *Neurosurgery* **22**, 846-852.
- Zentner, J., Thees, C., Pechstein, U., Scheufler, K.M., Wurker, J., and Nadstawek, J. (1997). Influence of nitrous oxide on motor-evoked potentials. *Spine* **22**, 1002-1006.

Address reprint requests to:
Juan Córdoba, M.D.
Servicio de Medicina Interna-Hepatología
Hospital Valle Hebrón
Paseo Valle Hebrón 119-129
08035 Barcelona, Spain

E-mail: jcordoba@vhebron.net

**ESTUDI 3: VALIDACIÓ DELS POTENCIALS EVOCATS
MOTORS COM UN SISTEMA OBJECTIU D'AVALUAR
L'ENCEFALOPATIA HEPÀTICA EXPERIMENTAL.**

6 ESTUDI 3: VALIDACIÓ DELS POTENCIALS EVOCATS MOTORS COM UN SISTEMA OBJECTIU D'AVALUAR L'ENCEFALOPATIA HEPÀTICA EXPERIMENTAL.

6.1 Hipòtesi i objectius

6.1.1 Introducció

En el segon treball s'ha validat la metodologia de mesurar la funcionalitat de la via motora a través dels potencials evocats motors. Els model experimentals d'encefalopatia hepàtica estan limitats per la dificultat de mesurar objectivament la funció neuronal. Els potencials evocats motors serveixen per mesurar la funcionalitat de la via motora i en pacients cirròtics s'ha demostrat una alteració. Així doncs creiem que els potencials evocats motors podria ser una bona eina per avaluar l'encefalopatia hepàtica experimental d'una manera objectiva i sense interferències.

6.1.2 Hipòtesi

La funció de la via motora és una mesura vàlida de l'encefalopatia hepàtica experimental en la rata.

6.1.3 Objectius

- 1- Investigar la presència d'una disfunció de la via motora en diferents models d'encefalopatia hepàtica:
 - a. Rates amb fallida hepàtica aguda per devascularització hepàtica.

- b. Rates amb anastomosi porto-cava que desenvolupen encefalopatia hepàtica episòdica precipitada per sang en el tracte digestiu o per inflamació.
 - c. Rates amb cirrosi hepàtica causada per lligadura del conducte biliar.
- 2- Estudiar la relació entre els potencials evocats motors i l'edema cerebral tractant les rates amb fallida hepàtica aguda amb hipotèrmia o manitol.
 - 3- Estudiar la relació entre els potencials evocats motors i el metabolisme de l'amoní en els models de cirrosi i en els models precipitats en rates amb anastomosi porto-cava.

6.2 Resum de l'estudi

Els potencials evocats motors es registren després d'estimular a nivell cranial i els potencials perifèrics o potencials d'acció motors compostos s'indueixen estimulant el nervi ciàtic. Aquests experiments s'han dut a terme utilitzant la metodologia descrita en l'estudi número 2, on es realitza l'estudi funcional en rates despertes sense anestèsia gràcies a la implantació de 6 elèctrodes subcutanis. L'aigua cerebral es mesura a través de columnes de kerosè i bromobensè per gravimetria, els metabòlits cerebrals s'analitzen per ressonància magnètica espectroscòpica i els aminoàcids obtinguts per microdiàlisi del còrtex cerebral per HPLC.

En el model de devascularització hepàtica es van observar alteracions en els potencials evocats motors en relació a la intensitat de les manifestacions neurològiques. Alteracions similar es van trobar en rates amb anastomosis porto-cava després de l'administració de sang al duodé o lipopolisacàrids, però en canvi no es van trobar en rates amb lligadura del conducte biliar.

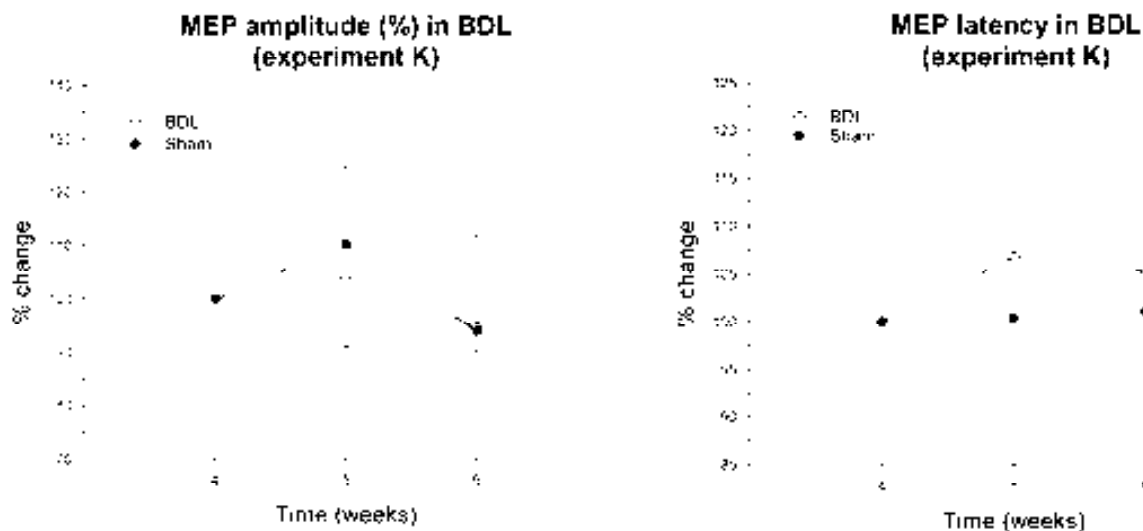


Figura 9: Registres neurofisiològics dels potencials evocats motors (MEP) de rates amb lligadura del conducte biliar (BDL) a les setmanes 4, 5 i 6 després de la lligadura.

Resultats expressat en % canvi respecte el registre perifèric (control) (n=6)

Hipotèrmia (35°C) i manitol prevenen el desenvolupament de l'edema cerebral en la fallida hepàtica aguda, però només la hipotèrmia evita l'alteració de la variable amplitud dels potencials evocats motors.

Les alteracions en els potencials evocats motors causades per l'administració de sang al tracte digestiu en rates amb anastomosis porto-cava estan associades a l'increment d'ammoni, glutamat i glutamina en el microdialitzat cerebral.

Aquestes dades ens indiquen que la monitorització dels potencials evocats motors de la encefalopatia hepàtica en models experimentals es una metodologia vàlida i objectiva.



Figura 10: Exemples de registres neurofisiològics d'una rata control (sham+saline), d'una rata amb fallida hepàtica aguda (ALF+Saline), d'una rata amb anastomosi porto-cava i administració de sang al duodè i lipopolisacàrid endovenós (PCA+GIB+LPS) i d'una rata amb anastomosis porto-cava i administració de sang al duodè (PCA+GIB). Els registres estan fets a diferents temps (1- al finalitzar l'estudi).

Aquesta nova metodologia ens ha mostrat la poca eficàcia del manitol, una teràpia que disminueix l'edema cerebral i a més a més ens ha relacionat les alteracions de la funció neuronal amb l'amoní i els seus metabòlits.

Motor-Evoked Potentials in Awake Rats Are a Valid Method of Assessing Hepatic Encephalopathy and of Studying its Pathogenesis

Marc Oria,^{1,2,3} Nicolas Chatauret,¹ Laia Chavarria,^{1,2,3} Jordi Romero-Giménez,¹ Lluís Palenzuela,^{1,3} Benjamin Pardo-Yules,^{3,7} José Antonio Arranz,⁵ Guillermo Bodega,⁶ Núria Ragner,^{3,4} and Juan Córdoba^{1,2}

Experimental models of hepatic encephalopathy (HE) are limited by difficulties in objectively monitoring neuronal function. There are few models that examine a well-defined neuronal pathway and lack the confounding effects of anesthetics. Motor-evoked potentials (MEPs) assess the function of the motor tract, which has been shown to be impaired in patients with cirrhosis. MEPs were elicited by cranial stimulation (central) and compound motor action potential by sciatic nerve stimulation (peripheral) in several models of HE in the rat. The experiments were performed using subcutaneous electrodes without anesthetics. Brain water content was assessed by gravimetry, brain metabolites were measured by magnetic resonance spectroscopy, and amino acids in microdialysates from the frontal cortex were analyzed by high-performance liquid chromatography. Abnormalities of MEP were observed in acute liver failure (ALF) induced by hepatic devascularization in relation to the progression of neurological manifestations. Similar disturbances were seen in rats with portocaval anastomosis after the administration of blood or lipopolysaccharide, but were absent in rats with biliary duct ligation. Hypothermia ($\leq 35^{\circ}\text{C}$) and mannitol prevented the development of brain edema in acute liver failure, but only hypothermia avoided the decrease in the amplitude of MEP. Disturbances of MEP caused by the administration of blood into the gastrointestinal tract in rats with portocaval anastomosis were associated with an increase in ammonia, glutamine, and glutamate in brain microdialysate. **Conclusion:** Assessment of MEP in awake rats is a valid method to monitor HE in models of ALF and precipitated HE. This method shows the lack of efficacy of mannitol, a therapy that decreases brain edema, and relates disturbances of the function of the motor tract to ammonia and its metabolites. (HEPATOLOGY 2010;00:000-000)

Experimental models are necessary to study the pathophysiology of hepatic encephalopathy (HE) and to test new drugs.¹ These models induce diverse grades of liver failure and may be combined with portosystemic shunting and precipitating factors to simulate the different types of HE: (1) associated with acute liver failure (ALF); (2) resulting from portosystemic shunting; or (3) accompanying chronic liver failure (CLF).² There are various methods to assess the neurological manifestations.^{3,4} Among them, neuro-

physiological recordings have the advantage of providing an objective assessment of neuronal function.⁵

In previous studies in patients with cirrhosis, we have described, using magnetic resonance (MR), signs compatible with low-grade edema along the corticospinal tract.⁶ These abnormalities were related to functional impairment detected by transcranial magnetic stimulation and reversed after liver transplantation.⁷ Similar disturbances were found in rats with portocaval anastomosis (PCA) or carbon tetrachloride-induced

Abbreviations: ALF, acute liver failure; ANOVA, analysis of variance; BDL, bile duct ligation; CLF, chronic liver failure; CMAP, compound motor action potential; CNS, central nervous system; GIB, gastrointestinal bleeding; GIS, gastrointestinal saline; HAL, hepatic artery ligation; HE, hepatic encephalopathy; HPLC, high-performance liquid chromatography; LPS, lipopolysaccharide; MEP, motor-evoked potential; mIno, myo-inositol; MR, magnetic resonance; PCA, portocaval anastomosis.

From the ¹Servei de Medicina Interna-Hepatologia, ²Departament de Neurofisiologia, and ³Departament Bioquímica, Hospital Vall d'Hebron, Barcelona, Spain; ⁴Departament de Medicina, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain; ⁵Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBERehd), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain; ⁶Departamento de Biología Celular y Genética, Facultad de Biología, Universidad de Alcalá, Alcalá de Henares, Spain; and ⁷Unidad de Gestión Clínica Enfermedades Digestivas, Hospital Universitario Valme, Sevilla, Spain.

Received April 26, 2010; accepted August 17, 2010.

cirrhosis.⁸ Because anesthesia could have affected these results, we developed a method to assess the function of the motor tract using subcutaneous electrodes, which provides reproducible results on repeated examination for at least 6 weeks.⁹

The aim of the current study is to investigate the presence of dysfunction of the motor tract in different models of HE, using the method that we developed for awake rats. Motor-evoked potentials (MEPs) were measured in: (1) rats with ALF induced by hepatic devascularization; (2) rats with PCA that develop episodic HE precipitated by the administration of blood into the gastrointestinal tract or inflammation, and (3) rats with CLF caused by bile duct ligation (BDL). In addition, rats with ALF were treated with hypothermia and mannitol to study the relationship between MEP and brain edema and rats with PCA underwent brain microdialysis and magnetic resonance (MR) spectroscopy of brain extracts to study the association between MEP and ammonia-related metabolites.

Materials and Methods

Animal Models

This study was performed in Sprague-Dawley male rats (Harlan, Udine, Italy) weighing 200–250 g, housed in polycarbonate cages under standard laboratory conditions. All procedures were performed in accordance to Spanish legislation and approved by the Catalan Animal Research Committee.

PCA + Hepatic Artery Ligation (HAL). PCA and sham operation were performed as described¹⁰ under isoflurane anesthesia using a 7/0 Prolene suture. Animal body temperature was kept stable at $37.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$ and glucose was kept above 100 mg/mL.

PCA + Gastrointestinal Blood (GIB). Bovine blood was administered through a duodenal catheter 15 days after PCA. The tip of the catheter (V-green 25G-0.5 mm; Vygon, UK) was inserted in the duodenum via a hole distal to the pylorus and was fixed with a purse-string suture (4/0 silk). The other extreme was tunneled subcutaneously to the back of

the rat and exteriorized. Twenty-four hours after the insertion of the catheter, four doses of 6 mL of bovine erythrocyte packed cells or saline (gastrointestinal saline [GIS]) were administered at 0 hours, 1 hour, 2 hours, and 3 hours. Bovine erythrocyte packed cells were prepared by a single centrifugation step of 15 minutes at 4500 rpm at 4°C and stored at -80°C prior usage.

BDL. The intervention was performed under isoflurane anesthesia and consisted on the localization, ligation, and section of the common bile duct. Formalin (100 $\mu\text{L}/100$ mg body weight) was injected inside the bile duct to prevent the formation of biliary cysts. In sham animals the bile duct was isolated, but was not ligated.

Experimental Design

ALF in Rats With PCA+HAL

Experiment A. Assessment of MEP at baseline, 6 hours, precoma (loss of righting reflex), and coma (loss of corneal reflex) in PCA+HAL rats ($n = 10$). Controls (sham+sham, $n = 6$) were studied at parallel times (baseline, 6 hours, 11 ± 1 hour, and 15 ± 3 hours).

Experiment B. Measurement of water in cortex and brainstem in control rats ($n = 8$) and PCA+HAL rats sacrificed at baseline, 6 hours, precoma, and coma ($n = 8$ at each stage).

Experiment C. Assessment of the effect of hypothermia on MEP and brain water. PCA+HAL rats were kept at 35°C ($n = 9$) or 37°C ($n = 8$) after HAL. MEP were assessed at baseline, 6 hours, and 8 hours in PCA+HAL rats and sham+sham rats at 37°C ($n = 6$). Rats were sacrificed after the last assessment of MEP to measure water in cortex and brainstem.

Experiment D. Mannitol (2 mol/kg) or iso-osmotic saline were infused in the jugular vein through a catheter for 10 minutes at 6 hours after HAL or sham intervention ($n = 8$ per group). MEPs were assessed at baseline, 6 hours, and 1 hour after the administration of mannitol or saline. Rats were sacrificed after the last

The authors participated in this work as follows: (1) Study concept and design: M.O., N.C., N.R., and J.C. (2) Acquisition of data: M.O., N.C., J.A.A., L.C., J.R., L.P., and B.P. (3) Analysis and interpretation of data: M.O., N.C., J.A.A., L.C., and J.C. (4) Drafting of the manuscript: M.O. and J.C. (5) Critical revision of the manuscript for important intellectual content: L.P., G.B., and J.C. (6) Statistical analysis: M.O. and J.C. (7) Obtained funding: J.C. (8) Technical or material support: J.R., B.P., and G.B. (9) Study supervision: J.C.

Supported by the Fondo de Investigaciones Sanitarias P1050900 and P1080698 (J.C.). CIBERehd is supported by Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain. Address reprint requests to: Juan Córdoba, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Pasig Vall d'Hebron 119-129, 08035 Barcelona, Spain. E-mail: jcordoba@vhebron.net; fax: 34-93-274 6068.

Copyright © 2010 by the American Association for the Study of Liver Diseases.

View this article online at wileyonlinelibrary.com.

DOI 10.1002/hep.23938

Potential conflict of interest: Nothing to report.

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article.

assessment of MEP to measure water in cortex and brainstem.

Precipitated HE in Rats With PCA+GIB

Experiment E. MEPs were induced at baseline and 2 hours, 4 hours, 6 hours, 8 hours, and 24 hours after the initiation of the administration of blood (GIB) or saline (GIS) ($n = 8$ per group).

Experiment F. Neurological manifestations (assessed with a reflex score) were determined at specified time-points (0, 2 hours, 4 hours, 6 hours, 8 hours, and 24 hours) in PCA rats after the administration of blood (GIB) or saline (GIS) ($n = 6$ per group).

Experiment G. Measurement of water in cortex and brainstem in PCA+GIB rats at 6 hours post-blood administration and sham controls ($n = 8$ per group).

Experiment H. Amino acids and ammonia were measured in microdialysate samples of brain cortex in PCA rats at 8 hours after the administration of blood (GIB) or saline (GIS) ($n = 6$ per group).

Experiment I. Brain metabolites were measured by MR-spectroscopy in tissue samples of sham, PCA rats before blood administration (time = 0), and PCA rats sacrificed at 6 and 24 hours after blood administration ($n = 6$ per group).

Experiment J. MEPs were elicited in PCA rats that received blood (GIB) at baseline (before administration of blood) and following the administration of lipopolysaccharide (LPS) (3 mg/kg of *Klebsiella pneumoniae* L4268; Sigma-Aldrich in 0.5 mL of saline intraperitoneally) at 2 hours, 4 hours, 6 hours, 8 hours, and 24 hours ($n = 8$) (PCA+GIB+LPS). The results were compared to those of PCA rats that received saline through a duodenal catheter plus LPS ($n = 10$) (PCA+GIS+LPS).

CLF in Rats With BDL

Experiment K. MEPs were elicited at 4, 5, and 6 weeks after BDL or sham intervention ($n = 6$ per group).

Neurophysiological Study

Six subcutaneous electrodes and a cranial screw were implanted for recording centrally-originated MEPs and peripherally-originated compound motor action potential (CMAP).⁹ Electrophysiological recordings were performed at least 5 days after the placement of electrodes in rats that moved freely in their individual cages. MEPs were induced by cranial stimulation and CMAP by sciatic nerve stimulation and registered with an electromyograph (Medtronic Keypoint Portable, Denmark). Two parameters were obtained averaging four motor potentials recorded at supramaximal intensity: latency of MEP (milliseconds) and amplitude of

MEP adjusted to peripheral response (MEP/CMAP, %). Results are expressed as percent change compared to baseline.

Neurological Manifestations

A group of rats (experiment F) were monitored neurologically by testing 13 different reflexes including pain, grasping, position, and corneal reflexes, similarly as described.¹¹ For each reflex present one point was given; thus, a normal rat had a reflex score of 13 points. Three different assessors, blinded to the experimental group, rated the presence or absence of each of the reflexes at specified time points.

Water Measurement

Water content in central nervous system (CNS) tissue was measured gravimetrically using a density gradient of bromobenzene-kerosene in a 100-mL column precalibrated with K_2SO_4 .¹² Six samples of cortex (gray matter) or brainstem (white matter) of approximately 1 mm³ were placed in the fluid of the column and the equilibration points were measured after 2 minutes. The specific density of the tissue was calculated and the results were expressed as percentage of water content.

Brain Microdialysis

Rats were anesthetized under isoflurane anesthesia and placed in a stereotaxic frame (Kopf Instruments, Tujunga, CA). An incision was made over the skull, which was drilled (Dremel, Madrid, Spain) with a 1.1-mm diameter drill bit (Panoptica, Barcelona, Spain). A disposable plastic/siliconized intracerebral guide cannula (CMA-12) was inserted through the hole to the required depth (coordinates: +3.2 mm sagittal, -1.5 mm lateral, and -2.5 mm depth relative to the bregma, based on the atlas of Paxinos and Watson). The guide was fixed with dental cement and closed with a dummy guide. Twenty-four hours after the insertion of the cannula, the dummy probe was removed and microdialysis probes (CMA-12; 2 mm long, 0.5 mm optical diameter) were carefully inserted. The system used was CMA/Microdialysis (Stockholm, Sweden). The rats were housed in a bowl for freely moving animals (CMA-120). A microinjector pump CMA-400 perfused the probes at a constant flow of 2 μ L/minute. The artificial cerebrospinal fluid (NaCl 145mM, KCl 3.0 mM, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 1 mM, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 2.26 mM; pH-adjusted to 7.4) was prepared freshly using deionized water. Samples of microdialysate were collected after 1 hour in fractions of 30 minutes and collected using a CMA-142 microfraction

collector. Microdialysis fractions were frozen immediately and stored at -80°C until analysis.

Biochemical Measurements

Ammonia was measured with Cobas Integra Analyzer (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN) by standard methodology and physiologic free amino acids were analyzed by reverse-phase high-performance liquid chromatography (HPLC) as phenylthiocarbamylated derivatives using a binary solvent gradient at 50°C and spectrophotometric detection at 254 nm. Prior to chromatography, an internal standard (norleucine) was added and samples were deproteinized by ultrafiltration and derivatized with phenylisothiocyanate (Pico-Tag methodology and instruments: Waters, Milford, MA).

Brain Metabolites

MR spectroscopy was performed in a 9.4-T magnet interfaced to an AVANCE spectrometer (Bruker, Wissembourg, France) using a 5-mm probe tuned to ^1H . Metabolites of brain tissue were extracted as described¹³ and were dissolved in 600 mL of D_2O . ^1H -spectroscopy was acquired using a WATERGATE sequence (spun rotors = 20 Hz, $T_{2\text{eff}} = 59$ seconds, 64 scans, 30°C). Areas of each metabolite were measured by integration using XWINNMR software (Bruker, Wissembourg, France) and compared to the area of trimethyl-silyl-propionic acid (TSP; Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Germany) added as internal standard.

Statistical Analysis

Results are expressed as mean \pm standard deviation (SD). Intragroup comparisons of the same variable were performed with paired Student *t* test for two determinations and repeated measures analysis of variance (ANOVA) for multiple comparisons, followed by pairwise comparisons with the Holm-Sidak method or the nonparametric Dunn's test. Intergroup comparisons were performed with ANOVA. Intraclass correlation coefficient and Cronbach's alpha coefficient were calculated to estimate the consistency of assessing the reflex score among different assessors. The Sigma Stat package was used for statistical calculations.

Results

Effects of ALF. ALF induced progressive abnormalities in the amplitude and the latency of MEP (experiment A). The amplitude decreased at 6 hours and became lower at coma; the latency increased at pre-

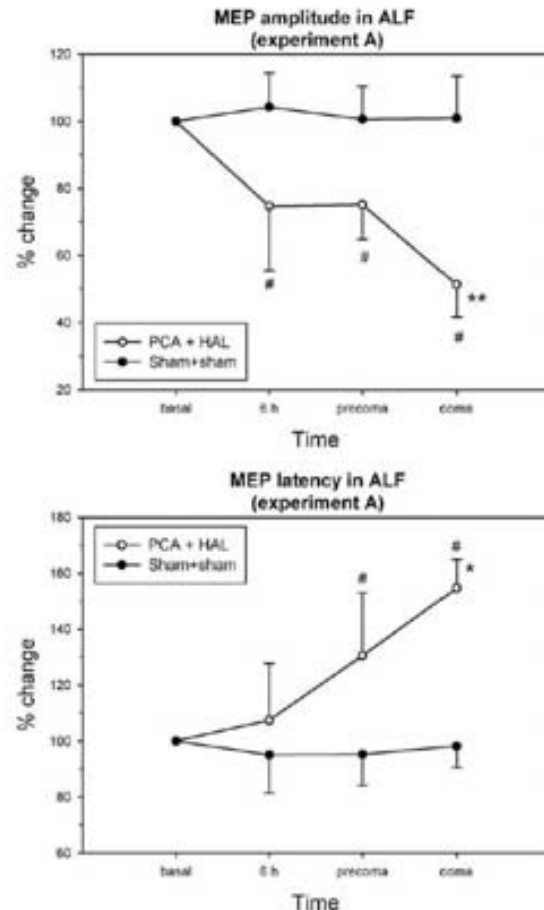


Fig. 1. Amplitude and latency (% change from baseline) expressed as mean \pm SD in ALF rats ($n = 10$). The recordings were performed at baseline, 6 hours, precoma, and coma stages. # $P < 0.05$ (paired *t* test PCA+HAL versus sham+sham), * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ (ANOVA, repeated measures).

coma and was higher at coma (Fig. 1; Supporting Information Fig. 1).

ALF was associated with an increase of water in CNS (experiment B). The increase was already present at 6 hours in brainstem and at precoma in cortex; further increases were achieved in coma (Table 1).

Effects of Interventions on ALF. Hypothermia protected from some of the neurophysiological abnormalities induced by ALF (experiment C). After the induction of hypothermia (35°C), the amplitude of MEP did not decrease (Table 1) compared to the normothermic control (37°C). On the other hand, there was an increase in the latency, which may be explained by the direct effects of temperature on the velocity of nervous conduction.¹⁴ Hypothermia prevented the

Table 1. Tissue Water Content in Central Nervous System Assessed by Gravimetry

	Cortex (%)	Brainstem (%)
Acute liver failure (experiment B)		
a) Sham+sham	81.64 ± 0.29	75.33 ± 0.48
b) PCA+HAL-6 hours	81.79 ± 0.17	75.86 ± 0.21
c) PCA+HAL-precoma	81.98 ± 0.23	76.05 ± 0.29
d) PCA+HAL-coma	82.40 ± 0.32	76.35 ± 0.48
Intergroup differences; P < 0.05	a versus c,d; b,c versus d	a versus b,c,d; b versus d
Effect of hypothermia (experiment C)		
e) Sham+sham	81.73 ± 0.64	75.64 ± 0.78
f) PCA+HAL-37°C for 8 hours	82.17 ± 0.40	76.14 ± 0.26
g) PCA+HAL-35°C for 8 hours	81.54 ± 0.33	75.52 ± 0.35
Intergroup differences; P < 0.05	f versus g	f versus g
Effect of mannitol (experiment D)		
h) Sham+sham-7 hours-postsaline	81.91 ± 0.20	75.62 ± 0.19
i) Sham+sham-7 hours-postmannitol	81.81 ± 0.32	75.51 ± 0.36
j) PCA+HAL-7 hours-postsaline	82.09 ± 0.22	76.20 ± 0.41
k) PCA+HAL-7 hours-postmannitol	81.46 ± 0.25	74.81 ± 0.40
Intergroup differences; P < 0.05	k versus j,h,i; j versus i	k versus j,h,i; j versus i,h

increase in water content (experiment C); after 8 hours of hypothermia, water content in cortex and brainstem were lower than in normothermic controls (Table 1).

Mannitol did not modify the neurophysiological changes present in ALF (experiment D). One hour after starting the administration of mannitol the amplitude and latency of MEP were not significantly different from rats with ALF that received saline infusion (Table 2). However, the administration of mannitol decreased water content of ALF rats in cortex and brainstem (Table 1).

Effects of GIB in PCA. GIB in PCA rats caused changes in neurophysiological parameters in the same direction as ALF, but of lower intensity and shorter duration (experiment E). The amplitude of MEP was significantly lower at 4 and 6 hours and the latency was significantly prolonged at 6, 8, and 24 hours (Fig. 2; Supporting Information Fig. 1). The neurological manifestations recorded by the reflex score showed lower values in PCA+GIB at 2 hours and 6 hours (Fig. 3). However, there was a low agreement between assessors (intraclass correlation coefficient = 0.33 and Cronbach's alpha coefficient = 0.45). Water in brain did not differ between PCA+GIB sacrificed at 6 hours (cortex = 81.16% ± 0.44%, brainstem = 74.52% ± 0.87%) and sham controls (cortex = 81.57% ± 0.36%, brainstem = 74.86% ± 0.72%).

GIB in PCA rats induced changes in plasma ammonia that increased from 153 ± 27 μM at baseline to 291 ± 75 μM at 6 hours and to 214 ± 72 μM at 24 hours. The increase in ammonia was also found in samples of microdialysis (Fig. 4) and was accompanied

by an increase in glutamine and glutamate and a decrease in isoleucine (experiment H). These changes in ammonia-related metabolites were not observed in whole brain tissue (experiment I). The spectrum of PCA rats showed the characteristic increase in glutamine and a decrease in myo-inositol (mIns) (Table 3). However, spectrums of brain cortex and brainstem (data not shown) of PCA rats at 6 and 24 hours after GIB did not differ from PCA without GIB (data at time = 0).

Effects of LPS in PCA. The administration of LPS in rats with PCA+GIS was followed by a decrease in the amplitude of MEP at 2 hours, 4 hours, 6 hours, and 8 hours compared to baseline (experiment J). The combined administration of LPS and GIB (PCA+GIB+LPS) caused, in addition to a decrease in the amplitude, an increase in the latency of MEP that was significant at 6 hours and 8 hours (Fig. 5; Supporting Information Fig. 1).

Effects of CLF. MEP did not differ between BDL and sham rats at 4 weeks (amplitude [MEP/CMAP%]: 78.62 ± 5.41 versus 70.73 ± 3.21; latency (ms): 4.21

Table 2. Effects of Interventions on MEP

	Δ Amplitude (%)	Δ Latency (%)
Effect of hypothermia (experiment C)		
a) Sham-8 hours	100.15 ± 17.65	104.15 ± 7.16
b) PCA+HAL at 37°C for 8 hours	61.71 ± 17.89*	110.00 ± 9.60*
c) PCA+HAL at 35°C for 8 hours	93.25 ± 19.58	126.86 ± 8.46*
Intergroup differences; P < 0.01	a vs. b; b vs. c	a vs. c; b vs. c
Intragroup differences; P < 0.05	*versus time = 0	
Effect of mannitol (experiment D)		
d) Sham+sham		
at 6 hours (presaline)	111.14 ± 19.72	100.23 ± 4.53
at 7 hours (postmannitol)	103.61 ± 22.54	101.34 ± 7.64
e) Sham+sham		
at 6 hours (presaline)	100.08 ± 2.77	100.01 ± 3.89
at 7 hours (postsaline)	101.30 ± 10.77	105.56 ± 9.02
f) PCA+HAL		
at 6 hours (presaline)	71.67 ± 12.01*	116.60 ± 8.55*
at 7 hours (postmannitol)	49.81 ± 12.23**	122.21 ± 11.86*
g) PCA+HAL		
at 6 hours (presaline)	61.42 ± 22.73*	114.94 ± 11.76*
at 7 hours (postsaline)	62.79 ± 22.23*	118.01 ± 10.24*
Intergroup differences		
P < 0.01	at 6 hours: d versus f,g; e versus f,g	at 6 hours: d versus f,g; e versus f,g
	at 7 hours: d versus f,g; e versus f,g	at 7 hours: d versus f,g; e versus f,g
Intragroup differences		
P < 0.05	*versus time = 0	
P < 0.01	**f 7-hour versus 6-hour	

Values at time = 0 (100%, absolute values not shown) were compared as absolute values to values at 6-hour, 7-hour, and 8-hour time points. Δ, percentage compared to values at time = 0 (baseline).

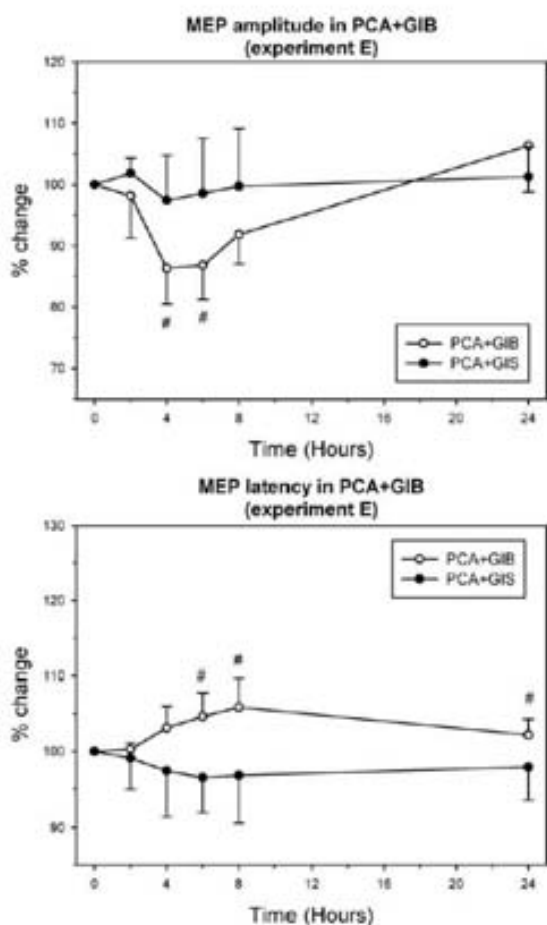


Fig. 2. Amplitude and latency (% change from baseline) expressed as mean \pm SD in PCA+GIB rats ($n = 8$) and PCA+GIS rats ($n = 8$). The recordings were performed at baseline, 2 hours, 4 hours, 6 hours, 8 hours, and 24 hours. # $P < 0.05$ (paired t test PCA+GIB versus PCA+GIS).

± 0.42 versus 4.52 ± 0.22), at 5 weeks (amplitude [MEP/CMAP%]: 81.79 ± 10 versus 77.97 ± 10.03 , latency (ms): 4.48 ± 0.36 versus 4.54 ± 0.36), and at 6 weeks (amplitude [MEP/CMAP%]: 74.53 ± 6.89 versus 67.14 ± 16.19 , latency (ms): 4.4 ± 0.21 versus 4.57 ± 0.9) (Supporting Information Fig. 2).

Discussion

The present study demonstrates the development of functional abnormalities of the motor tract in the rat with HE associated with ALF and HE precipitated by bleeding or LPS, and the lack of disturbances in CLF.

The hepatic devascularized rat is a ALF model that manifests a reproducible progression of encephalopathy

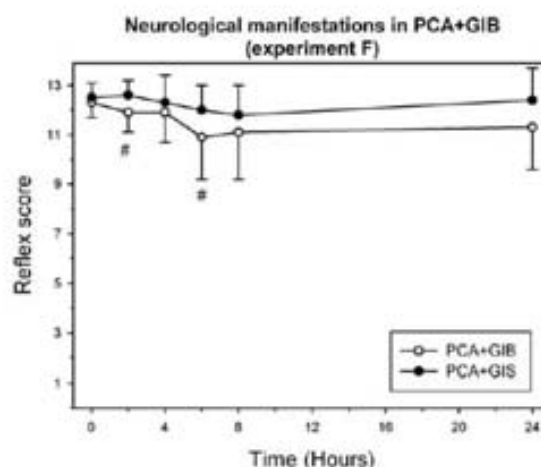


Fig. 3. Neurological manifestations monitored by three assessors with the reflex score (maximal value = 13) in PCA+GIB rats and controls (PCA+GIS). The recordings were performed at baseline, 2 hours, 4 hours, 6 hours, 8 hours, and 24 hours. # $P < 0.05$ (paired t test PCA+GIB versus PCA+GIS).

and brain edema.¹⁵ MEP showed a decrease in the amplitude and an increase in the latency in relation to the time of progression. Neurophysiological abnormalities were present at the first recording (6 hours); in this early stage the rat shows a series of manifestations that are difficult to quantify (decrease in activity, less reaction to pain).

The rat with PCA and the rat with BDL represent models of HE associated with chronic liver impairment. Behavioral abnormalities, probably representatives of minimal HE, are very mild (e.g. decrease in

Aminoacids in GIB (experiment H)

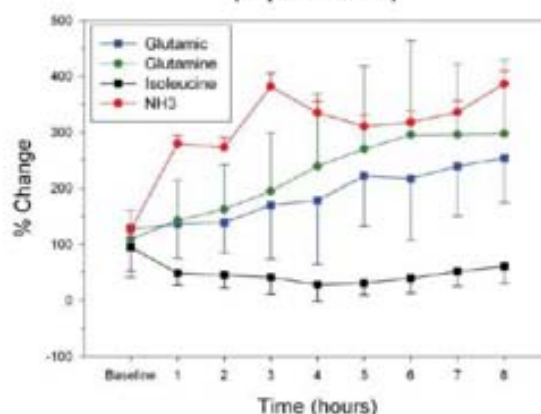


Fig. 4. Brain amino acids and brain ammonia (% difference compared to PCA+GIS) in microdialysate samples at baseline and hourly for 8 hours ($n = 6$ per group).

Table 3. Brain Metabolites by Magnetic Resonance Spectroscopy

	Cr	mins	Gln	Glu	NAA
Effect of GB (experiment I)					
a) Sham	4.27 ± 1.07	3.79 ± 0.83	2.66 ± 0.56	5.43 ± 1.09	4.15 ± 1.10
b) PCA+duodenal catheter (time = 0 hours)	3.84 ± 1.01	2.06 ± 0.35	6.63 ± 2.06	5.75 ± 1.46	4.64 ± 1.25
c) PCA+GIB at 6 hours	4.07 ± 0.68	2.19 ± 0.59	7.01 ± 1.67	6.02 ± 0.81	4.82 ± 0.78
d) PCA+GIB at 24 hours	3.92 ± 1.84	2.12 ± 1.19	6.70 ± 1.73	4.66 ± 0.88	3.95 ± 0.91
Intergroup differences, <i>P</i> < 0.01		a versus b,c,d	a versus b,c,d		

Values in $\mu\text{mol/g}$ of tissue.

Abbreviations: Cr, creatinine; Gln, glutamine; Glu, glutamine; mins, myo-inositol; NAA, n-acetylaspartate.

motor activity, learning impairment).¹⁶ In the present study the function of the motor tract in these models is preserved. Thus, the behavioral disturbances that have been described involve other neuronal circuitries. Because behavioral abnormalities in models of CLF are subtle, these rats are usually submitted to challenges with aggravating factors.¹⁷ The goal is to model a situation that is frequent in clinical practice: episodic HE induced by precipitating factors. We observed that GIB and LPS in PCA rats induces a reversible impairment of MEP. During this period the rats exhibit mild manifestations of encephalopathy, similar to those observed in the early stages of ALF. These neurological manifestations are difficult to reproduce as shown by the low correlation coefficients found in our study when comparing different assessors; it is recommended a Cronbach's alpha coefficient >0.7 to consider that a specific method has an acceptable reproducibility.

Monitoring MEP fulfills several criteria which indicate that is a good method to assess HE.¹⁸ The first condition is the reproducibility of MEP, which is demonstrated in control rats assessed every 2 hours for 8 hours, daily for 2 days, or weekly for 6 weeks. A second advantage of this method is that it has face validity. Disturbances of MEP resemble the abnormalities seen in humans, in which the dysfunction of the voluntary motor tract parallels the severity of HE.^{7,19,20} Similarly, MEP showed: (1) marked disturbances in ALF rats in coma; (2) milder changes in ALF at 6 hours and in PCA after GIB; and (3) lack of disturbances in BDL, which require a complex test to detect neurobehavioral abnormalities.¹⁶ These findings indicate that the amplitude and latency of MEP could be used as objective quantifiers of HE in experimental models.

Third, we observed that monitoring MEP has predictive validity, because it allows extrapolation of the effects of factors that improve or worsen HE in humans. We found that hypothermia, the only intervention that has shown clear efficacy in the treatment of ALF,^{21,22} prevented the disturbances in the ampli-

tude of MEP in ALF rats. In addition, monitoring MEP in PCA rats was able to detect the effect of bleeding and inflammation, two factors known to precipitate HE.² The administration of blood to PCA rats

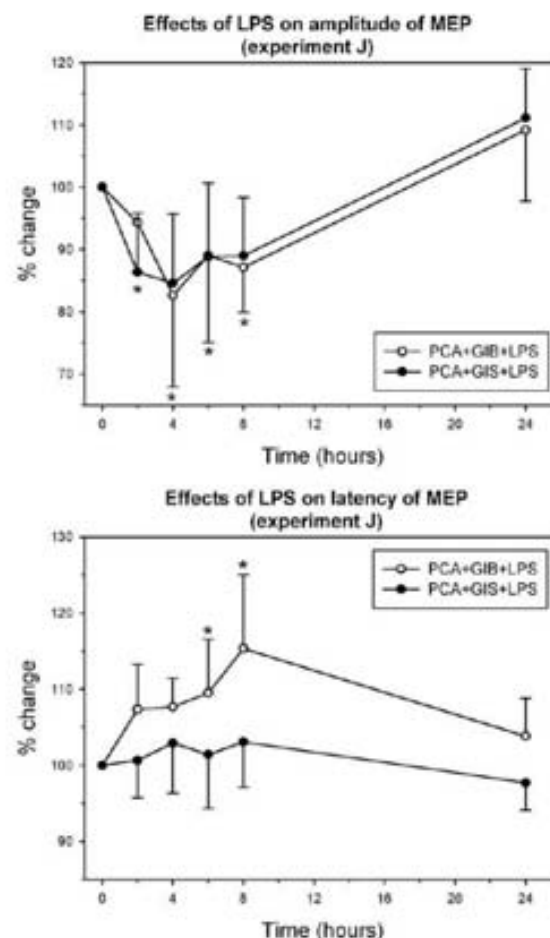


Fig. 5. Amplitude and latency (% change from baseline) expressed as mean \pm SD in PCA+GIB+LPS (*n* = 8) and PCA+GIS+LPS rats (*n* = 10). The recordings were performed at baseline, 2 hours, 4 hours, 6 hours, 8 hours, and 24 hours. **P* < 0.05 (ANOVA, repeated measures).

decreased amplitude and increased latency in a reversible manner. LPS alone decreased the amplitude without modifying latency and LPS in combination with blood decreased amplitude and increased latency.

The fourth condition that is fulfilled by this method is its construct validity, a theory-driven, experimental substantiation of the neurobehavioral abnormality. Current hypotheses propose that HE is secondary to the effects of ammonia and their metabolites in brain tissue.²³ Ammonia is metabolized to glutamine in astrocytes and induces cellular swelling²⁴ that causes brain edema, which is now well documented in patients with HE.²⁵ A higher sensitivity to develop edema, compared to the rest of the brain, has been observed in the corticospinal tract in humans and has been related to motor tract dysfunction.⁷ In ALF, we found an increase in brain water in the brainstem, where the rubrospinal tract (the motor tract of the rat) is located. This increase happened before the rise in the cortex and was present at 6 hours, at the same time that MEP were impaired.

Another feature that is in accordance with current hypotheses is the observation of changes in ammonia and amino acids levels in PCA rats after GIB. Bleeding increases blood ammonia through a mechanism that involves the activation of protein catabolism and relates to a drop in isoleucine,²⁶ which in the current study was observed in the microdialysate. The difference between brain tissue and microdialysate indicates that there could be ammonia-related changes in the extracellular compartment which are not reflected in the whole tissue. The parallel course of the changes in ammonia-related metabolites and MEP is in accordance to ammonia-induced mechanisms. Ammonia may interfere with neurotransmission because it modifies the concentration of glutamate in synapses²⁷ or can block the conduction of the action potential into the presynaptic terminal.²⁸

Additional advantage of using MEP for assessing HE is the control over confounding factors, especially the avoidance of anesthetics. In a prior study, we found slight disturbances of MEP in rats with PCA and in rats with cirrhosis induced by carbon tetrachloride.⁸ The lack of impairment of MEP in PCA and BDL rats in the current study suggests that the prior finding was due to an effect of anesthetics, which we have demonstrated decrease the amplitude and increase the latency of MEP.⁹ The measurement of MEP is an objective method that is difficult to be influenced by the investigator. In comparison to behavioral tests that are affected by the general state of the animal (e.g., by the presence of ascites or muscular

wasting), the results in BDL rats suggest that MEP are independent of these factors.

The availability of a valid objective measure to assess HE provides a tool to investigate its pathophysiology. The observation of low-grade brain edema has led to the hypothesis that neuronal dysfunction is secondary to the metabolic disturbances caused by the increase in the volume of water in the astrocytes.²⁹ Changes in organic osmolytes, such as the decrease in mInos present in PCA³⁰ and the activation of aquaporin-4 detected in BDL rats,³¹ are interpreted as compensatory mechanisms that prevent the development of brain edema and may explain the lack of disturbances of MEP in these models. Treatment focused on decreasing brain water may be a therapeutic approach for HE.³² We tested mannitol, a drug frequently used to treat intracranial hypertension,³³ in rats with ALF, and despite causing a decrease in brain water, MEP did not improve. Clinical studies have only assessed the effects of mannitol on intracranial pressure. Although it may be worthwhile to specifically investigate the effects on HE, the lack of neurophysiological improvement in our experimental model do not support a beneficial effect. We also did not see an increase in brain water, but observed an impairment of MEP after the administration of blood to PCA rats. Similar lack of correspondence between brain water and behavior has been reported in rats with BDL that undergo LPS challenge.³¹

In conclusion, we have shown the validity of MEP to assess HE in experimental models. For this reason, this method may be a good tool to investigate new drugs for HE. In addition, MEP measure the function of a discrete pathway that involves only two synapses and could be applied to investigate the mechanisms involved in the pathogenesis of HE.³⁴

Acknowledgment: The authors thank Eduardo Doval for his statistical support.

References

1. Butterworth RF, Norenberg MD, Felipe V, Ferenci P, Albrecht J, Blei AT. Experimental models of hepatic encephalopathy: ISHEN guidelines. *Liver Int* 2009;29:783-788.
2. 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 Congress of Gastroenterology, Vienna, 1998. *HEPATOLOGY* 2002;35:716-721.
3. Cordoba J, Dupuis J, Gottstein J, Blei AT. Stenosis of a portacaval anastomosis affects circadian locomotor activity in the rat: a multivariate analysis. *Am J Physiol* 1997;273(6 Pt 1):G1218-G1225.
4. Erecz S, Monfort P, Hernandez-Viadel M, Rodrigo R, Montoliu C, Felipe V. Oral administration of sildenafil restores learning ability in

- rats with hyperammonemia and with portacaval shunts. *HEPATOLOGY* 2005;41:299-306.
5. Gammal SH, Basile AS, Geller D, Skolnick P, Jones EA. Reversal of the behavioral and electrophysiological abnormalities of an animal model of hepatic encephalopathy by benzodiazepine receptor ligands. *HEPATOLOGY* 1990;11:371-378.
 6. Ravira 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;59:335-341.
 7. Cordoba J, Raguez N, Flavia M, Vargas V, Jacas C, Alonso J, et al. T2 hyperintensity along the cortico-spinal tract in cirrhosis relates to functional abnormalities. *HEPATOLOGY* 2003;38:1026-1033.
 8. Oria M, Raguez N, Chatauret N, Baroli R, Odena G, Planas R, et al. Functional abnormalities of the motor tract in the rat after portacaval anastomosis and after carbon tetrachloride induction of cirrhosis. *Metab Brain Dis* 2006;21:297-308.
 9. Oria M, Chatauret N, Raguez N, Cordoba J. A new method for measuring motor evoked potentials in the awake rat: effects of anesthetics. *J Neurotrauma* 2008;25:266-275.
 10. Chavarria L, Oria M, Romero 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;138:1566-1573.
 11. Zimmermann C, Ferenci P, Piff C, Yurdadın C, Ebner J, Lasemann H, et al. Hepatic encephalopathy in thioacetamide-induced acute liver failure in rats: characterization of an improved model and study of amino acid-ergic neurotransmission. *HEPATOLOGY* 1989;9:594-601.
 12. Marmarou A, Poll W, Shulman K, Bhagavan H. A simple gravimetric technique for measurement of cerebral edema. *J Neurosurg* 1978;49:530-537.
 13. Barba I, Jáimes-Auguets E, Rodríguez-Sinovas A, García-Dorado D. 1H NMR-based metabolomic identification of at-risk areas after myocardial infarction in swine. *MAGMA* 2007;20:265-271.
 14. Sakamoto T, Kawaguchi M, Kakinoto M, Inoue S, Takahashi M, Furuya H. The effect of hypothermia on myogenic motor-evoked potentials to electrical stimulation with a single pulse and a train of pulses under propofol/ketamine/fentanyl anesthesia in rabbits. *Anesth Analg* 2003;96:1692-1697.
 15. Rose C, Michalak A, Panunzio M, Chatauret N, Rambaldi A, Butterworth RF. Mild hypothermia delays the onset of coma and prevents brain edema and extracellular brain glutamate accumulation in rats with acute liver failure. *HEPATOLOGY* 2000;31:872-877.
 16. Jover R, Rodrigo R, Felipe V, Insauti R, Saez-Valero J, García-Ayllon MS, et al. Brain edema and inflammatory activation in bile duct ligated rats with diet-induced hyperammonemia: a model of hepatic encephalopathy in cirrhosis. *HEPATOLOGY* 2006;43:1257-1266.
 17. Mullen KD, Roedel M, Jones DB, Grun M, Jones EA. Precipitation of overt encephalopathy in the portacaval shunted rat: towards the development of an adequate model of chronic portal systemic encephalopathy. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1997;9:293-298.
 18. van der Staay FJ, Arndt SS, Nondquist RE. Evaluation of animal models of neurobehavioral disorders. *Behav Brain Funct* 2009;5:11.
 19. Andrefsky JC, Frank JL. Hepatic failure, encephalopathy, and deep tendon reflexes [Abstract]. *Neurology* 1997;48:245.
 20. Cadrasel JF, Lebicz E, Di Martino V, Bernard B, El Koury S, Tourbah A, et al. Focal neurological signs in hepatic encephalopathy in cirrhotic patients: an underestimated entity? *Am J Gastroenterol* 2001;96:515-518.
 21. Cordoba J, Crespin J, Gottstein J, Blei AT. Mild hypothermia modifies ammonia-induced brain edema in rats after portacaval anastomosis. *Gastroenterology* 1999;116:686-693.
 22. Jalan R, O Damink SW, Deutz NE, Lee A, Hayes PC. Moderate hypothermia for uncontrolled intracranial hypertension in acute liver failure. *Lancet* 1999;354:1164-1168.
 23. Butterworth RF. The neurobiology of hepatic encephalopathy. *Semin Liver Dis* 1996;16:235-244.
 24. Norenberg MD, Rao KV, Jayakumar AR. Mechanisms of ammonia-induced astrocyte swelling. *Metab Brain Dis* 2005;20:303-318.
 25. Shah NJ, Neeb H, Kircheis G, Engels P, Hausinger D, Zilles K. Quantitative cerebral water content mapping in hepatic encephalopathy. *Neuroimage* 2008;41:706-717.
 26. Olde Damink SW, Dejong CH, Jalan R. Review article: hyperammonaemic and catabolic consequences of upper gastrointestinal bleeding in cirrhosis. *Aliment Pharmacol Ther* 2009;29:801-810.
 27. Butterworth RE. Hepatic encephalopathy and brain edema in acute hepatic failure: does glutamate play a role? *HEPATOLOGY* 1997;25:1032-1034.
 28. Raabe W. Effects of NH4+ on reflexes in cat spinal cord. *J Neurophysiol* 1990;64:565-574.
 29. Hausinger D, Kircheis G, Fischer R, Schlies F, vom Dahl S. Hepatic encephalopathy in chronic liver disease: a clinical manifestation of astrocyte swelling and low-grade cerebral edema? *J Hepatol* 2000;32:1035-1038.
 30. Cordoba J, Gottstein J, Blei AT. Glutamine, myo-inositol, and organic brain osmolytes after portacaval anastomosis in the rat: implications for ammonia-induced brain edema. *HEPATOLOGY* 1996;24:919-923.
 31. Wright G, Soper R, Brooks HF, Stadlbauer V, Variappan B, Davies NA, et al. Role of aquaporin-4 in the development of brain oedema in liver failure. *J Hepatol* 2010;53:91-97.
 32. Jones EA, Lavini C. Is cerebral edema a component of the syndrome of hepatic encephalopathy? *HEPATOLOGY* 2002;35:1270-1273.
 33. Jalan R. Intracranial hypertension in acute liver failure: pathophysiological basis of rational management. *Semin Liver Dis* 2003;23:271-282.
 34. Goerit JM, Amantini A, Fischer C, Kaplan PW, Mecarelli O, Schnitzler A, et al. Neurophysiological investigations of hepatic encephalopathy: ISHEN practice guidelines. *Liver Int* 2009;29:789-796.

**ESTUDI 4: INVESTIGAR ELS BENEFICIS D'UN NOU
FÀRMAC PER L'ENCEFALOPATIA HEPÀTICA I
ANALITZAR ELS MECANISMES D'ACCIÓ.**

7 ESTUDI 4: INVESTIGAR ELS BENEFICIS D'UN NOU FÀRMAC PER L'ENCEFALOPATIA HEPÀTICA I ANALITZAR ELS MECANISMES D'ACCIÓ.

7.1 Hipòtesi i objectius

7.1.1 Introducció

El quart estudi consisteix en veure si un fàrmac que ha demostrat que redueix l'amoníac plasmàtic i que ha demostrat que prevè l'increment d'aigua cerebral en models experimentals d'encefalopatia hepàtica, és capaç de millorar la funcionalitat de la via motora en rates amb anastomosi porto-cava que reben sang al tub digestiu. La ornitina fenilacetat hauria de reduir l'amonèmia del model. La hipòtesi del fàrmac és que l'ornitina estimula la formació de novo de glutamat, alhora que estimula, per tant, la formació de glutamina. Aquesta glutamina s'uneix al fenilacetat formant fenilacetil-glutamina que s'excreta pels ronyons a l'orina. Aquest fàrmac, denominat ornitina-fenilacetat, ha començat a ser estudiat en pacients amb cirrosi hepàtica.

7.1.2 Hipòtesi

L'administració d'ornitina-fenilacetat prevé les alteracions funcionals de la via motora i del metabolisme de l'amoní induïdes per l'administració de sang al tub digestiu de rates amb anastomosi porto-cava.

7.1.3 Objectius

1. Investigar l'efecte sobre la neurofisiologia i sobre l'amoní en plasma de l'ornitina-fenilacetat administrada com a pretractaments en rates amb anastomosi porto-cava que desenvolupen encefalopatia hepàtica episòdica precipitada per sang en el tracte digestiu
2. Analitzarem en el mateix model l'efecte de l'ornitina-fenilacetat sobre:
 - a. Els aminoàcids plasmàtics arterials
 - b. Els aminoàcids i amoníac de microdiàlisi cerebral
 - c. El fenilacetat i la fenilacetil-glutamina en plasma i orina

7.2 Resum de l'estudi

L'administració d'ornitina-fenilacetat durant 3 hores o 3 dies previngué la disminució de l'amplitud (3 dies de tractament, a les 6 hores de donar sang vs. basal: control -21% vs. ornitina-fenilacetat -1%; $p < 0,01$) i l'increment de la latència dels potencials evocats motors (control +12% vs. ornitina-fenilacetat +1%; $p < 0,01$).

El tractament amb ornitina-fenilacetat va atenuar l'increment d'amoníac plasmàtic (6 hores, control 287 ± 88 vs. 162 ± 84 μM , $p < 0,05$) i del líquid de microdiàlisi ($2029,6$ vs. $956,2$ μM , àrea sota la corba $p = 0,05$). A més a més, l'ornitina-fenilacetat també va incrementar la concentració plasmàtica de substrats de la glutamina-sintetasa (ornitina 122 ± 50 μM vs 41 ± 18 μM i glutamat 119 ± 37 μM vs. 56 ± 7 μM) i es va associar a un increment més ràpid de glutamina (4 hores: 1127 ± 165 μM vs. 818 ± 240 μM $P < 0,05$) i a una més ràpida disminució en el plasma (8 hores: 935 ± 254 μM vs. 1169 ± 270 μM $P < 0,05$) alhora que hi va haver una aparició de fenilacetil-glutamina en l'orina (19 ± 5

μM vs. $0.3 \pm 0.3 \mu\text{M}$ $p < 0.001$). El tractament amb ornitina-fenilacetat previngué l'increment de neurotransmissor glutamat en el líquid de microdiàlisi (39.65 vs. $15.64 \mu\text{M}$ àrea sota la corba $P < 0.05$).

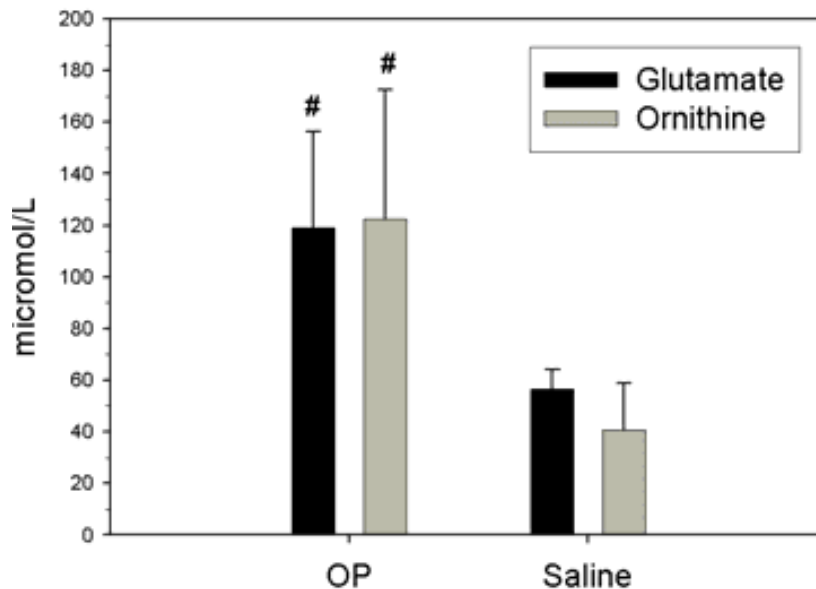


Figura 11: Concentracions basals, abans de l'administració de sang al tub digestiu, dels precursors de la glutamina sintetasa (ornitina i glutamat) en sang arterial en rates pretractades amb ornitina-fenilacetat (OP) o control (saline).

En conclusió, l'ornitina-fenilacetat és capaç de previndre les alteracions neurofisiològiques secundàries a l'administració intestinal de sang en un model d'encefalopatia hepàtica experimental. Probablement es deu a que l'ornitina-fenilacetat atenua la hiperamonèmia i les alteracions dels neurotransmissors. Els efectes beneficiosos de l'ornitina-fenilacetat semblen estar relacionats amb l'increment de l'excreció de metabòlits nitrogenats activant la síntesis i l'eliminació de glutamina.

Title: Ornithine-phenylacetate prevents disturbances of motor-evoked potentials induced by gastrointestinal blood in rats with portacaval anastomosis.

Short title:

OP in experimental HE

Authors:

MARC ORIA^{1,2,3}, JORDI ROMERO-GIMÉNEZ¹, JOSÉ ANTONIO ARRANZ⁵, ENCARNACIÓ RIUDOR⁵, NÚRIA RAGUER^{3,4}, JUAN CÓRDOBA^{1,2}.

Affiliations:

- 1- Servei de Medicina Interna-Hepatologia, Hospital Vall d'Hebron, Barcelona, Spain.
- 2- Departament de Medicina, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain
- 3- Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBERehd), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain
- 4- Departament de Neurofisiologia, Hospital Vall d'Hebron, Barcelona, Spain
- 5- Departament Bioquímica, Hospital Vall d'Hebron, Barcelona, Spain

Grant support:

Study supported by Fondo de Investigaciones Sanitarias PI05/0900 and PI08/0698. CIBERehd is supported by Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain

Corresponding author:

Juan Córdoba

Hospital Universitari Vall d'Hebron

Paseig Vall d'Hebron 119-129

08035 Barcelona. Spain

Email: jcordoba@vhebron.net

Tel: 34-93-274 6140

Fax: 34-93-274 6068

Abbreviations:

AMP: amplitude

CMAP: compound motor action potential
CNS: central nervous system
GIB: gastrointestinal bleeding
HE: hepatic encephalopathy
HPLC: high performance liquid chromatography
LAT: latency
MEP: motor evoked potential
PCA: portocaval anastomosis
TSP: Trimethyl-silyl-propionic acid
Glu: glutamate
Gln: glutamine
OP: ornithine-phenylacetate
PAGN: phenylacetyl-glutamine
PA: phenylacetate

Disclosures:

The authors disclose no conflicts

Dr Cordoba has received consulting fees from Ocera.

ABSTRACT

Introduction: Ornithine-phenylacetate (OP) is a new drug that has been proposed for the treatment of hepatic encephalopathy because decreases plasma ammonia. The mechanism of action is based on stimulating glutamine synthesis and disposal.

Aim: Assess the effect of OP on motor-evoked potentials, a surrogate of hepatic encephalopathy, in rats with portacaval anastomosis that receive gastrointestinal blood (GIB).

Material & methods: PCA rats were pre-treated with OP (0.6 gr/kg/d i.p.) or saline for 3 hours or 3 days (n=8 per group) prior to GIB. Motor evoked potentials (MEP) were assessed without anaesthetics. Ammonia metabolites (plasma, urine) and neurotransmitters (brain microdialysis) were assessed by HPLC and mass spectroscopy.

Results: OP (3 hours and 3 days) prevented disturbances in MEP induced by GIB in PCA rats. The effect was more intense in rats treated for 3 days. In this group, 6 hours after GIB the amplitude of MEPs decreased by 21% and the latency increased by 12% in the control group, but remained stable in OP treated rats (-1% and +1%; p<0.01). OP attenuated the rise of ammonia at 6 hours in plasma by 45% and in brain microdialysate by 48%, but induced a faster glutamine rise (4 hours: 1127±165 µM vs. 818±240 µM P<0.05), and a faster disappearance from plasma (8 hours: 935±254 µM vs. 1169±270 µM P<0.05) and the new formation of PAGN in urine (19±5 µmols vs. 0.3±0.3 µmols p<0.001). In addition, OP was associated with a lower concentration of glutamate in brain microdialysate (by 60%).

Conclusions: OP prevents neurophysiological abnormalities precipitated by GIB in a model of HE. This is probably due to enhancement of glutamine synthesis and metabolism, which results in a lower rise of plasma ammonia and the prevention of changes in brain neurotransmitters. Thus, OP may be a good drug to prevent HE precipitated by gastrointestinal bleeding.

INTRODUCTION

Hepatic encephalopathy (HE) is a common complication of liver failure that is associated with poor prognosis and carries a high economic and social burden (Cordoba and Minguez, 2008). Ammonia appears to be a key factor in its pathogenesis (Butterworth, 1996). Accordingly, the goal of treatment is reducing the exposure of the brain to ammonia. Current therapies, such as probiotics (lactulose, lactitol) and antibiotics, act by decreasing the production of ammonia in the gastrointestinal tract (Bajaj, 2010). However, the capacity of these therapies is probably limited (Cooper and Plum, 1987).

Data from patients indicate that muscle tissue has an important role in removing ammonia from circulation in cirrhosis (Olde Damink et al., 2002). In muscle, ammonia is metabolized into glutamine by glutamine synthetase. This observation has led to the proposal of stimulating the synthesis of glutamine with the administration of ornithine, which is transformed in muscle into glutamate, the substrate of glutamine synthetase (Chatauret et al., 2006). However, recirculating glutamine could be available for renewed ammoniogenesis via glutaminase, an enzyme present in the gut, kidneys, and liver (Romero-Gomez et al., 2004). Thus, the administration of ornithine may transiently decrease ammonia

but later the deamidation of the newly formed glutamine may be followed by a rebound in its concentration (Jalan and Lee, 2009).

A new proposal is to combine the administration of ornithine with phenylacetate, a drug that is used in urea cycle disorders (Enns et al., 2007), to trap glutamine as phenylacetyl-glutamine and excrete the newly formed molecule in the urine (Jalan et al., 2007). The effect of the combined administration of ornithine and phenylacetate has been explored in experimental models of acute and chronic liver failure. In hepatic devascularized pigs (Ytrebo et al., 2009) and rats with bile duct ligation (Davies et al., 2009), the administration of both drugs, but neither ornithine nor phenylacetate alone, decreased plasma ammonia and attenuated brain edema.

Ornithine-phenylacetate (OP) is a new formulation that combines ornithine and phenylacetate in a salt. This drug is currently undergoing pharmacokinetic studies in order to investigate its benefits on HE. Results of experimental studies have been encouraging, but lack a correlate of the potential effect of OP on behavior. The infusion of blood into the duodenum of rats with portacaval anastomosis (PCA) is a model of HE that reproduces several of the metabolic disturbances present in patients with cirrhosis and gastrointestinal bleeding (Olde Damink et al., 1997). We have previously shown that gastrointestinal blood (GIB) in PCA rats induces a decrease in the amplitude and an increase in the latency of motor-evoked potentials (MEP), a valid surrogate of HE (Oria et al., 2010). We designed a study to assess the effects of OP on neurophysiology parameters in PCA rats with GIB. For this purpose rats were pretreated with OP prior to GIB and underwent, in addition to neurophysiology assessment, the measurement of ammonia and related-metabolites in plasma, urine and brain microdialysis.

MATERIAL AND METHODS

Animal model

The studies were performed in adult male Sprague-Dawley rats (200-250 gr.) purchased from Harlan (Udine, Italy) that were housed individually in polycarbonate cages and fed standard chow diet and drinking water *ad libitum* before the experiments. The rats were fasting for 8 hours before the administration of gastrointestinal blood and were kept fasted until 12 hours after starting the administration of gastrointestinal blood. They were kept on a 12:12 light/dark cycle with humidity and temperature controlled at 55% and 22°C. The study was approved by the Catalan Animal Research Committee under the Spanish legislation.

Portacaval anastomosis (PCA) + gastrointestinal blood (GIB): This is a model that consists of two steps. In the first step the rat undergoes a PCA as previously described (Chavarria et al., 2009) under isoflurane anesthesia using a 7/0 Prolene suture. Four weeks after the PCA a duodenal catheter is inserted in the duodenum by repeating the laparotomy under anesthesia. The tip of the catheter (V-green 25G-0.5 mm, Vygon, UK) is inserted via a hole distal to the pylorus and then fixed with a purse-string suture (4/0 silk). The other extreme is tunneled subcutaneously to the back of the rat. Twenty-four hours after the insertion of the catheter, four doses of 6 mL of bovine erythrocyte packed cells or

saline are administered through the catheter at times 0, 1, 2 and 3 hours. Bovine erythrocyte packed cells are prepared by a single centrifugation step 15 minutes at 4500 r.p.m at 4 °C and stored at -80°C prior usage.

Experimental design

Treatment

The experiments were performed using OP (Ocera, San Diego, CA) dissolved in saline or vehicle (control group) into a final volume of 0.5 mL that was administered intraperitoneally to PCA rats before the administration of blood (GIB). Experiments were performed in groups of 6 to 8 rats treated with OP or saline. Two forms of treatment were investigated: a) Short treatment: one single dose of OP 0.6 g/kg administered 3 hours before the experiment. b) Long treatment: six consecutive doses of OP 0.3 g/kg every 12 hours (three days) followed by a dose of OP 0.6 g/kg administered 3 hours before the experiment

Neurophysiology studies

Motor evoked potentials (see below) were assessed in two groups of PCA+GIB rats: a) short treatment (experiment A) and b) long treatment (experiment B). In both experiments blood samples (0.15 ml) for measurement of plasma ammonia were obtained by puncture of the saphenous vein at baseline and 2, 4, 6 and 8 hours. Plasma was immediately separated by centrifugation and kept frozen until the assay.

Plasma amino acids

Amino acids were measured (see below) in one group of PCA+GIB rats that received long treatment (experiment C). For this purpose an arterial catheter (PE 50, Becton Dickinson, NJ, USA) was inserted in the femoral artery in a group of rat that received long treatment. The catheter was inserted under isoflurane anesthesia 4 hours before the experiment and tunneled to the back of the rat, which allowed the rat to move freely. The permeability of the catheter was maintained with heparinized saline. Samples of arterial blood (0.1 ml) were withdrawn at baseline and 2, 4, 6 and 8 hours. Plasma was immediately separated by centrifugation and kept frozen until the assay.

Brain microdialysis

Amino acids and ammonia were measured in samples of brain microdialysis obtained in one group of PCA+GIB rats that received long treatment (experiment D). For this purpose 24 hours prior to the experiment a microdialysis guide cannula with a dummy guide was inserted (see below). The dummy guide was substituted by a microdialysis probe 3 hours prior to the administration of GIB and samples were collected for 12 hours. The experiments were performed in a metabolic cage and samples of urine were collected for 6 hours periods during 12 hours since initiating the administration of GIB.

Neurophysiology methods

Motor evoked potentials (MEP) were assessed using six subcutaneous electrodes and a cranial screw that were implanted 5 days prior to GIB as previously described (Oria et al., 2008). MEPs were induced without anesthesia at baseline and 2, 4, 6, 8 and 24 hours. Two parameters were obtained: a) latency of

MEP (milliseconds) and b) amplitude of MEP adjusted to peripheral response (MEP/CMAP, %). Results are expressed as percentage of change compared to baseline.

Brain microdialysis

For the insertion of the cannulas of microdialysis (CMA/microdialysis, Stockholm, Sweden), the rats were anesthetized under isoflurane anesthesia and placed in a stereotaxic frame (Kopf Instruments, California, USA). An incision was made over the skull, which was drilled (Dremel, Madrid, Spain) with a 1.1 mm diameter drill bit (Panoptica, Barcelona, Spain). A disposable plastic/siliconized intracerebral guide cannula (CMA-12) was inserted through the hole to the required depth (coordinates: +3.2 mm sagittal, -1.5 mm lateral and -2.5 mm depth relative to the bregma, based on the atlas of Paxinos and Watson). The guide was fixed with dental cement and closed with a dummy guide that was replaced later by microdialysis probes (CMA-12; 2 mm long, 0.5 mm optical diameter). A microinjector pump CMA-400 perfused the probes at a constant flow of 2 μ L/min. The artificial cerebrospinal fluid (NaCl 145mM, KCl 3.0mM, MgCl₂-6H₂O 1mM, CaCl₂-2H₂O 2.26mM-adjusted pH to 7.4) was prepared freshly using deionized water. Samples of microdialysate were collected beginning three hours after the insertion of the probes in fractions of 30 minutes and collected using a CMA-142 microfraction collector. Microdialysis fractions were frozen and stored at -80°C until analysis.

Biochemical measurements

Ammonia was measured in a Cobas Integra analyzer (Roche Diagnostics Indianapolis, IN, USA.) by standard methodology and physiologic free amino acids were analyzed by reverse phase-high pressure liquid chromatography (HPLC) as phenylthiocarbamylated derivatives using a binary solvent gradient at 50°C and spectrophotometric detection at 254 nm. Prior to chromatography, an internal standard (norleucine) was added and samples were deproteinized by ultrafiltration and derivatized with phenylisothiocyanate (Pico-Tag methodology and instruments: Waters, Milford, MA, USA). The chromatogram showed the concentration of 24 amino acids (aspartic, glutamic, serine, asparagine, glycine, glutamine, taurine, histidine, crytruline, treonine, alfa-alanine, carnosine, arginine, proline, alfa-aminobutiric, tyrosine, valine, metionine, isoleucine, leucine, fenylalanine, tryptophane, ornitine, lysine).

Phenylacetate and Phenylacetylglutamine were analyzed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) according to Laryea et al. (Laryea et al., 2010) (supplemental file 1).

Statistical analysis

Results are expressed as mean \pm standard deviation. Intra-group comparisons of the same variable were performed with the repeated measures ANOVA for multiple comparisons, followed by pairwise comparisons with the Holm-Sidak method or the non parametric Dunn's test. Inter-group comparisons were performed with the unpaired Student's T-test. The Sigma Stat package was used for statistical calculations.

RESULTS

Neurophysiology

PCA rats pretreated with saline (control group of experiment A and B) exhibited a decrease in the amplitude and an increase in the latency of MEPs (figures 1 and 2), as has been previously described (Oria et al., 2010). These abnormalities worsened progressively from baseline, peaked at 6 hours and recovered at 24 hours.

Rats that received treatment with OP showed an attenuation of the MEPs abnormalities induced by GIB. For the short treatment (experiment A) the differences with the control group were only statistically significant in the latency at 4 and 8 hours (figure 1). For the long treatment (experiment B) the differences with the control group were statistically significant at all time points, except for latency at 2 hours. In this experiment (figure 2), rats treated with OP did not exhibit changes in the parameters of the MEPs compared to baseline, except for the amplitude at 24 hours (which was better than at baseline).

Ammonia and amino acids

GIB in PCA rats induced an increase in venous ammonia that peaked at 6-8 hours (experiments A and B, figure 3). OP attenuated the rise in the concentration of ammonia induced by GIB (figure 3). The concentration of ammonia was significantly lower than control in the long treatment (experiment B) at 2, 4, 6 and 8 hours.

GIB in PCA rats (experiment C) induced an increase (figure 4) in the total concentration of plasma amino acids (n=24). All the amino acids contributed to this increase, except for isoleucine (table 1). Rats treated with OP exhibited a lower rise in the concentration of amino acids (figure 4). The concentration of total amino acids was significantly lower than controls at 8 hours.

Some individual amino acids exhibited significant differences between OP treated rats and controls. The concentration of ornithine and glutamate in OP rats at baseline doubled the concentration of control rats (table 1). GIB induced a marked rise of these amino acids. However, in OP treated rats ornithine and glutamate at 8 hours after GIB were not higher than baseline. Glutamine showed a rise after GIB that was earlier in OP treated rats than controls (figure 5).

The administration of OP (experiment D) decreased the concentration of ammonia and glutamate in brain microdialysis to approximately 50% (figure 6). The area under the curve following GIB was significantly lower in OP-treated rats than in controls for ammonia ($2024 \pm 698 \mu\text{M}\cdot\text{h}$ vs $1003 \pm 329 \mu\text{M}\cdot\text{h}$, $P=0.05$) and for glutamate ($39.65 \pm 16.75 \mu\text{M}\cdot\text{h}$ vs $15.64 \pm 6.73 \mu\text{M}\cdot\text{h}$, $P<0.05$). There were no effects of OP in the concentration of glutamine in the microdialysate.

Phenylacetate and phenylacetyl-glutamine

The arterial concentration of PA and PAGN (experiment C) was determined in pools of 6 rats due to insufficient sample volume. In rats treated with OP the concentration of PA and PAGN were $665.4 \mu\text{M}$

and 0.5 μM at baseline (3 hours after the administration of OP) and exhibited a progressive decrease to almost negligible values (table 2). The excretion of PA and PAGN in urine of OP treated rats (experiment D) during the first 6 hours was $257 \pm 113 \mu\text{mol}$ and $19 \pm 5 \mu\text{mol}$, which decreased to none significant values during the second 6 hours ($< 3 \mu\text{mol}$).

DISCUSSION

The present study shows that OP prevents disturbances of neuronal function in an experimental model of HE (Butterworth et al., 2009). The infusion of blood into the gastrointestinal tract of PCA rats decreased the amplitude and delayed the conduction of MEP. The disturbances of MEP were attenuated with a single dose of OP or completely prevented after the administration of OP for three days. These findings support a beneficial effect of OP on HE, because dysfunction of the motor tract (pyramidal signs) is considered part of the spectrum of HE (Adams and Foley, 1953). Furthermore, motor tract dysfunction has been shown to be reversible after liver transplantation (Cordoba et al., 2003) and has been associated in experimental models to the severity of liver failure (Oria et al., 2010). Thus, disturbance of MEP after GIB in PCA rats is a surrogate of HE that improves with OP.

The beneficial effects of OP on MEP probably relate to the effect on plasma ammonia. Rats treated with OP exhibited a milder increase in ammonia; the difference between the OP treated group and the control group was more marked in rats that received OP for 3 days. These findings are in accordance with the putative role of ammonia in inducing neuronal dysfunction (Butterworth, 1996). Ammonia delays the conduction of action potentials in cat spinal cord, an effect that may be explained by the inactivation of Cl^- extrusion (Raabe, 1990) and causes multiple disturbances in glutamatergic neurotransmission, the main excitatory neurotransmitter present along the motor tract (Danbolt, 2001). Ammonia can explain the well-described increase in brain extracellular glutamate observed in multiple models of acute and chronic liver failure (Vaquero and Butterworth, 2006). The increase in extracellular glutamate has been linked with oxidative/nitrosative stress and to cerebral complications of liver failure (Haussinger and Schliess, 2008). Our observation of a lower concentration of ammonia and glutamate in brain microdialysate in OP treated rats supports the participation of ammonia and glutamatergic neurotransmission in neuronal dysfunction (Rodrigo et al., 2010) and provides a rationale for the beneficial effects of decreasing plasma ammonia with OP.

The attenuation of the rise in venous ammonia after GIB, which achieved a 45% decrease at 6 hours in the group treated with OP for 3 days, is in accordance with prior studies in models of acute and chronic liver failure. In pigs with hepatic devascularization the continuous administration of ornithine intravenously and phenylbutyrate (pro-drug of phenylacetate) intraduodenally decreased ammonia rise at the end of experiment (8 hours) by 43% (Ytrebo et al., 2009). In rats with a 4 weeks-old bile duct ligation that received a hyperammonemic diet, the combined intraperitoneal injection of ornithine and phenylbutyrate, decreased arterial ammonia at 3 hours by 35% (Davies et al., 2009). No effect on ammonia could be seen in these rats with the sole administration of ornithine or phenylbutyrate. Since

the flux of ammonia into the brain has been shown to relate proportionally to the concentration of arterial ammonia (Keiding et al., 2006), reducing arterial ammonia with OP would be an effective way to reduce the exposure of brain tissue to ammonia, as shown by a decrease of approximately 50% in the concentration of ammonia in brain microdialysate in the current and in previous studies (Ytrebo et al., 2009).

The attenuation of the rise in plasma ammonia can be explained by the effects of OP on glutamine synthesis and disposal. Following GIB, there was an increase in the concentration of arterial glutamine that peaked earlier in OP-treated rats than in controls (at 4 hours vs. 8 hours). The better explanation for this earlier rise is an activation of glutamine-synthetase secondary to a higher concentration of the substrate of this enzyme in muscle tissue, as supported by the approximately twice concentration of arterial ornithine and glutamate in OP-treated rats at baseline. The newly formed glutamine probably reacted with PA to form PAGN, which could be demonstrated to be significantly elevated in plasma and urine during the first hours of the experiment. However, the amount of nitrogen that was excreted as PAGN can not explain the differences in ammonia concentration between both groups.

The lack of stoichiometry relationship between the decrease in ammonia and the excretion of PAGN has been explained by the presence of additional pathways for PAGN metabolism in the rat (Kasumov et al., 2004). However, it is possible that OP affects ammonia metabolism at other sites. We observed marked differences in the course of the aminoacidemia that follows GIB (Damink et al., 2009) between OP-treated and control rats. These differences may be due to a more marked disposal of ammonia in OP-treated rats and accordingly lower secondary transamination reactions. Another explanation could be that OP attenuates the negative protein balance that follows GIB and that has been attributed to the lack of isoleucine in the molecule of hemoglobin (Olde Damink et al., 2007). However, OP did not prevent the drop in plasma isoleucine, which appears to be responsible for the phenomena of branched chain amino acid antagonism. Additional studies will be necessary to elucidate the mechanisms by which OP modified post-GIB hyperaminoacidemia.

The results of this study support the use of OP in the prevention of HE, specially in patients with cirrhosis that experience a gastrointestinal bleeding, a common complication of cirrhosis that is associated with HE in approximately 25% of cases (Cordoba J, unpublished observation). The design of our study does not allow a direct comparison with the clinical setting. The time-frame of the occurrence of HE in patients is different to our experimental situation, which is limited to 8 hours and does not take into account other factors that may also have an impact on HE (anemia, infections...). We also did not use a continuous infusion, which could provide a more prolonged effect. In spite of the differences, the results of this experimental study may be important for the design of preventive strategies in patients with cirrhosis that may experience ammonia-induced HE.

In conclusion, the current study shows that OP has beneficial effects in an experimental model of HE that can be explained by its effects on ammonia metabolism. The results also link the action of OP with changes in ammonia and glutamate in brain microdialysate, providing a possible mechanistic

explanation for neuronal dysfunction. OP may become an effective drug for prevention of HE in patients with cirrhosis.

Supplementary text

METHODOLOGY FOR MEASURING PA AND PAGN

Reagents: Phenylacetic acid (PA), phenylbutyric acid (PB) and formic acid were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) and phenylacetylglutamine (PAGN) from Synfine (Richmond Hill, ON, Canada). Deuterium-labelled internal standards (N-(phenyl-d5-acetyl)-L-glutamine)(d5-PAGN) were purchased from CDN isotopes (Pointe Claire, QB, Canada). LC-gradient grade methanol (Merck, Darmstadt, Germany) and Milli-Q grade water were used. Ultrafilters (>10000 dalton) were from Millipore (Billerica, MA, USA).

Sample preparation: i. standards: calibration curve were prepared by diluting stock solutions of each standard with a pool solution of normal ultrafiltered plasma or urine as matrix and methanol to cover a 0-65 μM concentration range, adding d5-PAGN as internal standard (till 10.5 μM final), in conical plastic centrifuge tubes; ii. plasma: 100 μl plasma was mixed with d5-PAG (as in standards) and was ultrafiltered (10000g x 30min); iii. urine: 100 μl centrifuged urine was diluted 1/10 with methanol, vortexed and centrifuged again (1100g x 10min); then 100 μl supernatant was diluted 1/3 with 100 μl methanol and d5-PAGN (as in standards) and ultrafiltered.

Liquid chromatography – tandem mass spectrometry: Instrumentation consisted of a Acquity-UPLC separation module (Waters, Milford, MA, USA) coupled to a Xevo TQ mass spectrometry system with the Mass Lynx software (Waters, Manchester, UK). Analytical column was Acquity UPLC HSS C₁₈ (2.1 x 100 mm). Sample elution was achieved by a 3 min mobile phase linear gradient consisting in initial 40% solvent A (methanol) and 60% solvent B (1% formic acid in water), changing to 80% solvent A and 20% B from 0-2 min, back to 40% solvent A/60% B from 2-2.1 min and equilibrating with this conditions from 2.1-3 min. Five μl supernatant samples were injected into the system and the column temperature was maintained at 40°C. Conditions for the MS analysis: ionization mode was negative electrospray (ESI-); capillary voltage was 3kV; desolvation gas heated to 450°C and delivered at a flow rate of 1100 L/h.; cone gas flow (argon): 0.15 mL/min. MRM transitions was optimized at the following conditions: dwell time: 0.073 s. PAG: precursor ion 263 (m/z), product ion 145 (m/z), cone voltage 30 V, collision energy 15 eV; PA: precursor ion 135 (m/z), product ion 91 (m/z), cone voltage 20 V, collision energy 10 eV; d5-PAGN: precursor ion 268 (m/z), product ion 145 (m/z), cone voltage 30 V, collision energy 20 eV.

Table 1: Concentration (μM) of relevant amino acids in arterial blood of PCAeGIB rats

	Baseline		2 hours		4 hours		6 hours		8 hours	
	Control	OP	Control	OP	Control	OP	Control	OP	Control	OP
Glutamate	5647	119437#	163467	2984124 *	222499	3324108* #	359472*	2604135*	4694376*	145458#
Alfa-Alanine	314475	5004126 #	8714276 *	9384261 *	10644340 *	12484345 *	17974493 *	11004497* #	26684314 *	7234280 #
Valine	76412	82432	6584216 *	6534146 *	9984426*	9664151*	10984637 *	8904350*	12124456 *	6114192 *
Isoleucine	29411	2549	1845	1546*	1948	1744*	35419	2046	1842	2647
Leucine	64415	59424	5534182 *	483499*	7804351*	7214119*	8174328*	5994228*	8154361*	410499*
Phenyl-alanine	6847	86414#	2974138	295471	4534223*	5344224*	6284350*	5824431*	7764400*	4364310 *
Tryptophane	3045	2845	93424*	83413*	90432*	99411*	83424*	78419*	79426*	54415*
Ornithine	41418	122450#	84417	123429#	100436*	130432	118442*	89411	154469*	89428

P<0.05 OP vs. control * P<0.05 vs baseline

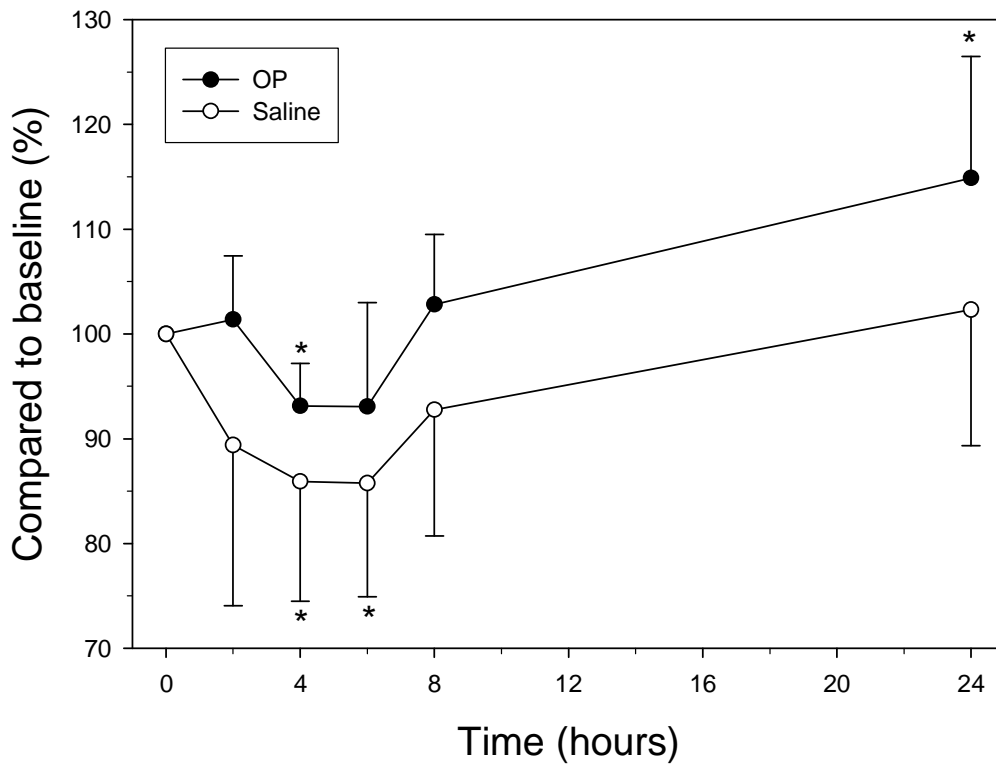
Table 2: Concentration of phenylacetate (PA) and phenylacetyl-glutamine (PAGN) in arterial blood of PCAeGIB rats

	Baseline		2 hours		4 hours		6 hours		8 hours	
	Control	OP	Control	OP	Control	OP	Control	OP	Control	OP
PA (μM)	1.2	665.4	1.4	360.8	1.7	185.4	3.8	40.6	4.3	11.9
PAGN (μM)	0	0.57	0.01	0.37	0	0.24	0.01	0.08	0.02	0.03

The concentration was determined in pools of samples of 6 rats

Figure 1:

Short treatment Amplitude



Latency

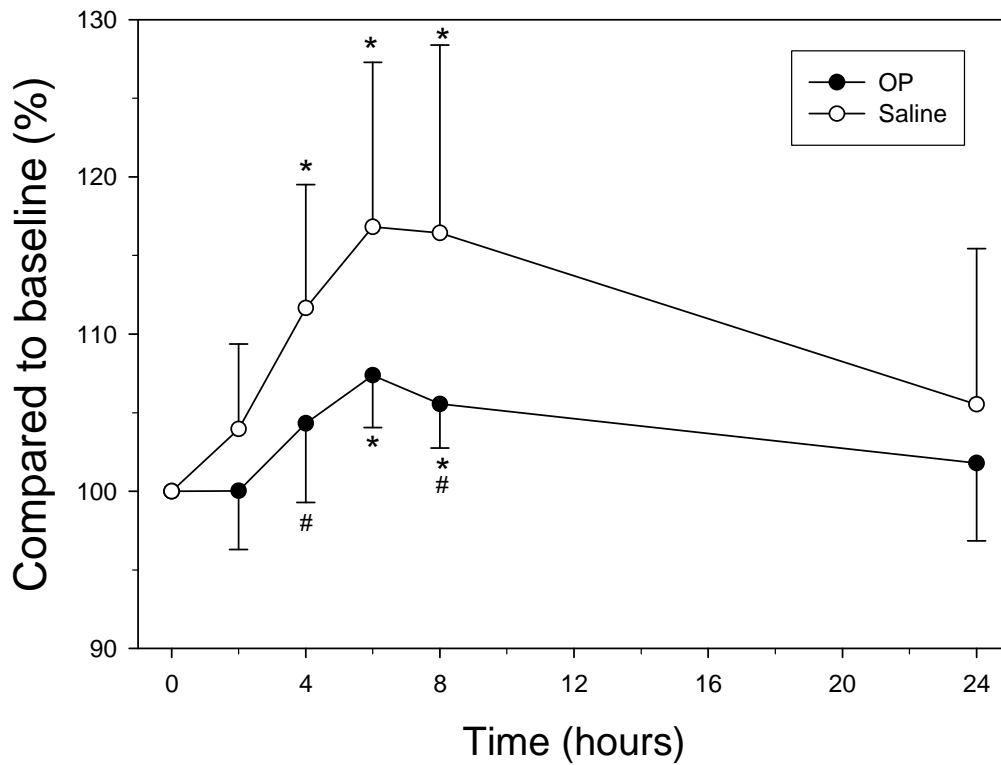


Figure 2:

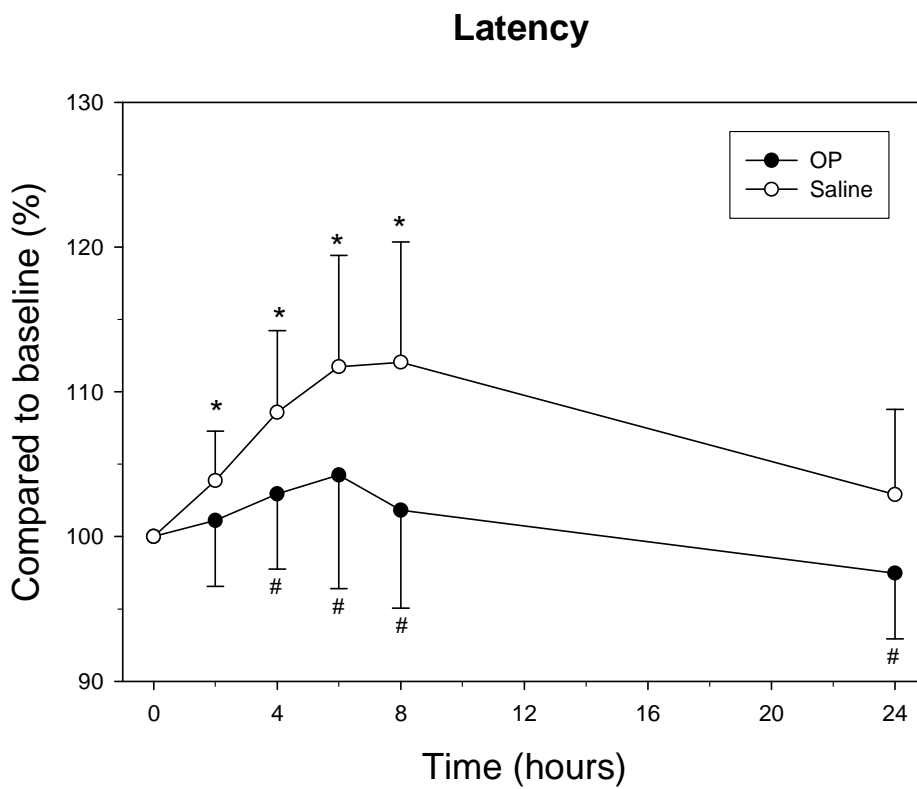
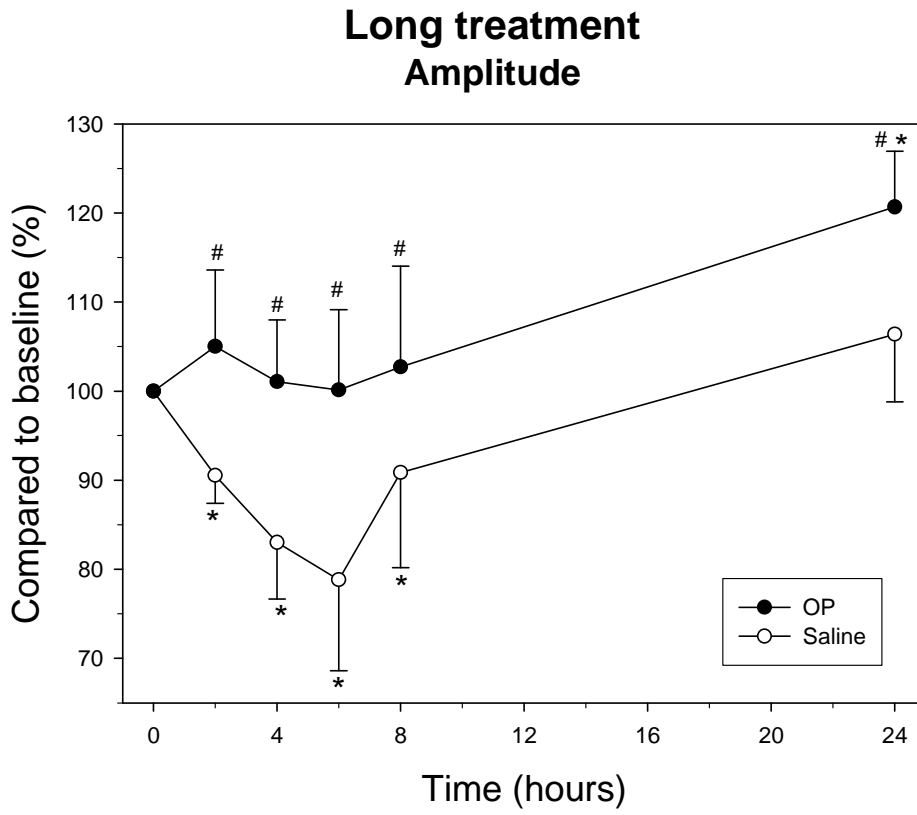


Figure 3:

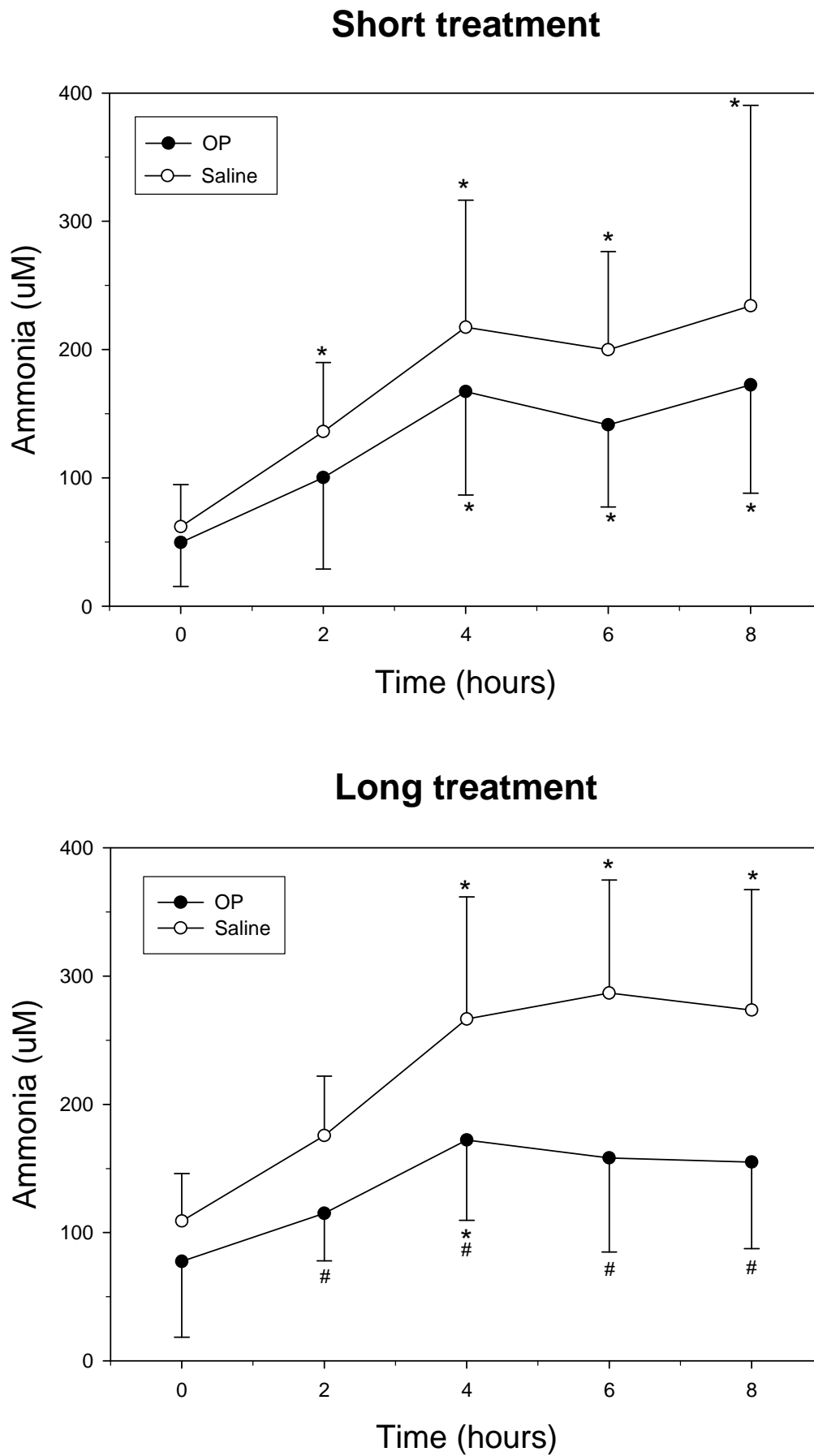


Figure 4:

Amino acids

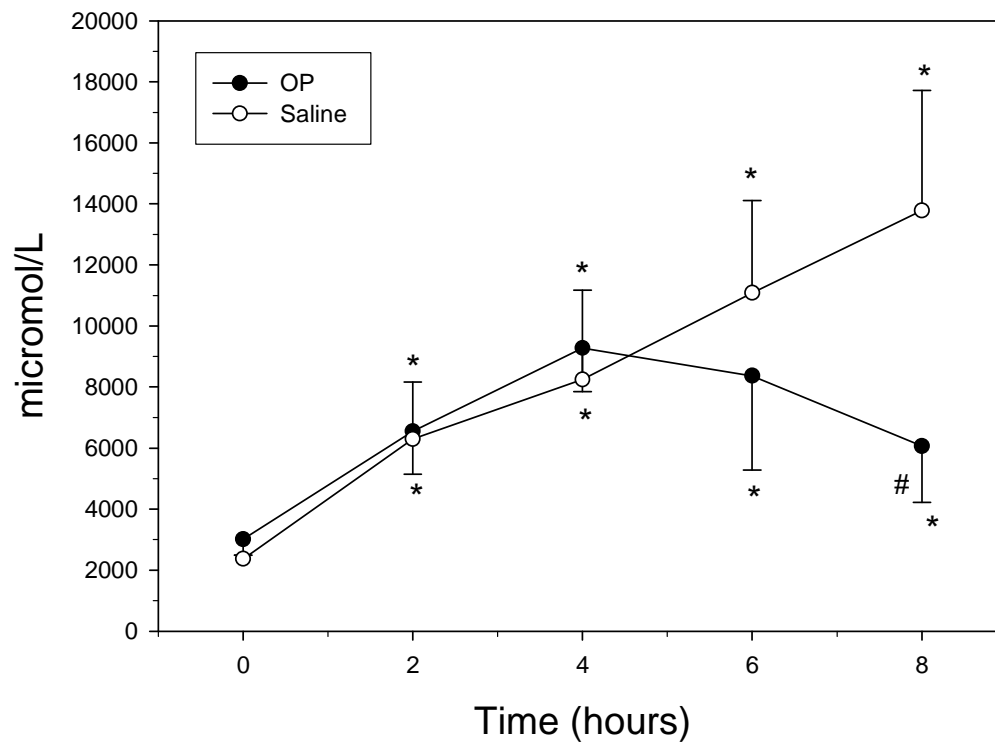


Figure 5:

Glutamine

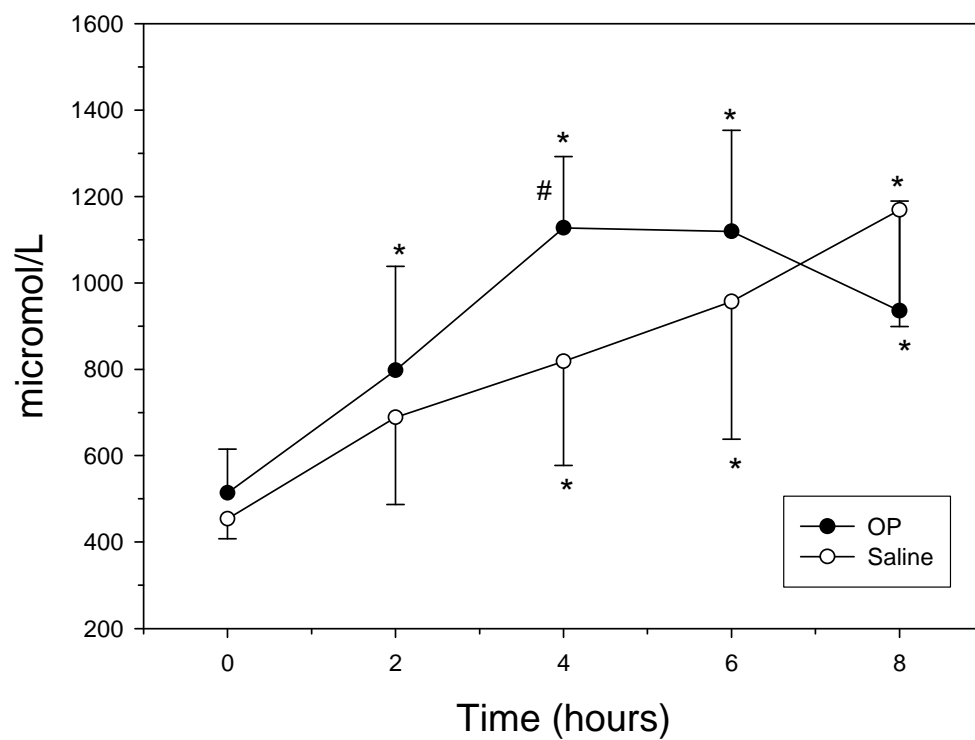
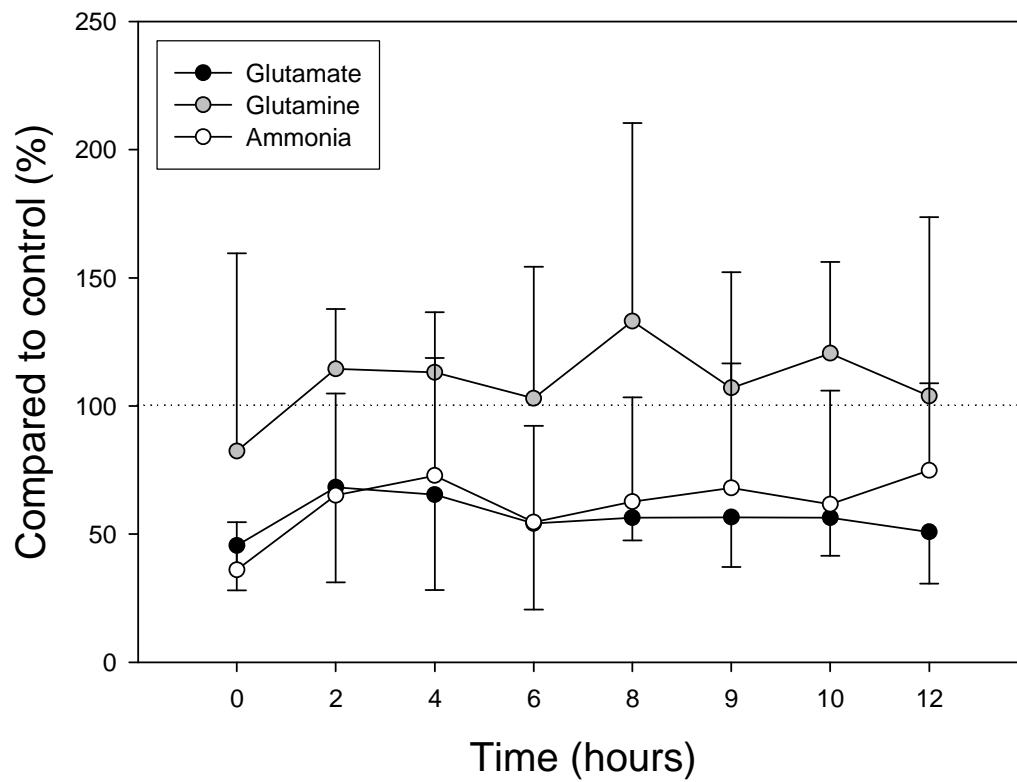


Figure 6:

Brain microdialysis in OP treated rats

Bibliografy

Adams,R.D., and Foley,J.M. (1953). The neurological disorder associated with liver disease. Res. Publ. Assoc. Res. Nerv. Ment. Dis. 32, 198-237.

Bajaj,J.S. (2010). Review article: the modern management of hepatic encephalopathy. Aliment. Pharmacol. Ther. 31, 537-547.

Butterworth,R.F. (1996). The neurobiology of hepatic encephalopathy. Semin. Liver Dis. 16, 235-244.

Butterworth,R.F., Norenberg,M.D., Felipo,V., Ferenci,P., Albrecht,J., and Blei,A.T. (2009). Experimental models of hepatic encephalopathy: ISHEN guidelines. Liver Int. 29, 783-788.

Chatauret,N., Desjardins,P., Zwingmann,C., Rose,C., Rao,K.V., and Butterworth,R.F. (2006). Direct molecular and spectroscopic evidence for increased ammonia removal capacity of skeletal muscle in acute liver failure. J. Hepatol. 44, 1083-1088.

Chavarria,L., Oriá,M., Romero,J., Alonso,J., Lope-Piedrafita,S., and Cordoba,J. (2009). Diffusion Tensor Imaging Supports the Cytotoxic Origin of Brain Edema in a Rat Model of Acute Liver Failure. Gastroenterology.

Cooper,A.J., and Plum,F. (1987). Biochemistry and physiology of brain ammonia. Physiol Rev. 67, 440-519.

Cordoba,J., and Minguez,B. (2008). Hepatic encephalopathy. Semin. Liver Dis. 28, 70-80.

Cordoba,J., Ragner,N., Flavia,M., Vargas,V., Jacas,C., Alonso,J., and Rovira,A. (2003). T2 hyperintensity along the cortico-spinal tract in cirrhosis relates to functional abnormalities. Hepatology 38, 1026-1033.

Damink,S.W., Dejong,C.H., and Jalan,R. (2009). Review article: hyperammonaemic and catabolic consequences of upper gastrointestinal bleeding in cirrhosis. Aliment. Pharmacol. Ther. 29, 801-810.

Danbolt,N.C. (2001). Glutamate uptake. Prog. Neurobiol. 65, 1-105.

Davies,N.A., Wright,G., Ytrebo,L.M., Stadlbauer,V., Fuskevag,O.M., Zwingmann,C., Davies,D.C., Habtesion,A., Hodges,S.J., and Jalan,R. (2009). L-ornithine and phenylacetate synergistically produce sustained reduction in ammonia and brain water in cirrhotic rats. Hepatology 50, 155-164.

Enns,G.M., Berry,S.A., Berry,G.T., Rhead,W.J., Brusilow,S.W., and Hamosh,A. (2007). Survival after treatment with phenylacetate and benzoate for urea-cycle disorders. N. Engl. J. Med. 356, 2282-2292.

Haussinger,D., and Schliess,F. (2008). Pathogenetic mechanisms of hepatic encephalopathy. *Gut* 57, 1156-1165.

Jalan,R., and Lee,W.M. (2009). Treatment of hyperammonemia in liver failure: a tale of two enzymes. *Gastroenterology* 136, 2048-2051.

Jalan,R., Wright,G., Davies,N.A., and Hodges,S.J. (2007). L-Ornithine phenylacetate (OP): a novel treatment for hyperammonemia and hepatic encephalopathy. *Med. Hypotheses* 69, 1064-1069.

Kasumov,T., Brunengraber,L.L., Comte,B., Puchowicz,M.A., Jobbins,K., Thomas,K., David,F., Kinman,R., Wehrli,S., Dahms,W., Kerr,D., Nissim,I., and Brunengraber,H. (2004). New secondary metabolites of phenylbutyrate in humans and rats. *Drug Metab Dispos.* 32, 10-19.

Keiding,S., Sorensen,M., Bender,D., Munk,O.L., Ott,P., and Vilstrup,H. (2006). Brain metabolism of ¹³N-ammonia during acute hepatic encephalopathy in cirrhosis measured by positron emission tomography. *Hepatology* 43, 42-50.

Laryea,M.D., Herebian,D., Meissner,T., and Mayatepek,E. (2010). Simultaneous LC-MS/MS determination of phenylbutyrate, phenylacetate benzoate and their corresponding metabolites phenylacetylglutamine and hippurate in blood and urine. *J. Inherit. Metab Dis.*

Olde Damink,S.W., Dejong,C.H., Deutz,N.E., and Soeters,P.B. (1997). Decreased plasma and tissue isoleucine levels after simulated gastrointestinal bleeding by blood gavages in chronic portacaval shunted rats. *Gut* 40, 418-424.

Olde Damink,S.W., Jalan,R., Deutz,N.E., Dejong,C.H., Redhead,D.N., Hynd,P., Hayes,P.C., and Soeters,P.B. (2007). Isoleucine infusion during "simulated" upper gastrointestinal bleeding improves liver and muscle protein synthesis in cirrhotic patients. *Hepatology* 45, 560-568.

Olde Damink,S.W., Jalan,R., Redhead,D.N., Hayes,P.C., Deutz,N.E., and Soeters,P.B. (2002). Interorgan ammonia and amino acid metabolism in metabolically stable patients with cirrhosis and a TIPSS. *Hepatology* 36, 1163-1171.

Oria,M., Chatauret,N., Chavarria,L., Romero-Gimenez,J., Palenzuela,L., Pardo-Yules,B., Arranz,J.A., Bodega,G., Ragner,N., and Cordoba,J. (2010). Motor-evoked potentials in awake rats are a valid method of assessing hepatic encephalopathy and of studying its pathogenesis. *Hepatology* 52, 2077-2085.

Oria,M., Chatauret,N., Ragner,N., and Cordoba,J. (2008). A new method for measuring motor evoked potentials in the awake rat: effects of anesthetics. *J. Neurotrauma* 25, 266-275.

Raabe,W. (1990). Effects of NH₄⁺ on reflexes in cat spinal cord. *J. Neurophysiol.* 64, 565-574.

Rodrigo,R., Cauli,O., Gomez-Pinedo,U., Agusti,A., Hernandez-Rabaza,V., Garcia-Verdugo,J.M., and Felipo,V. (2010). Hyperammonemia induces neuroinflammation that contributes to cognitive impairment in rats with hepatic encephalopathy. *Gastroenterology* 139, 675-684.

Romero-Gomez,M., Ramos-Guerrero,R., Grande,L., de Teran,L.C., Corpas,R., Camacho,I., and Bautista,J.D. (2004). Intestinal glutaminase activity is increased in liver cirrhosis and correlates with minimal hepatic encephalopathy. *J. Hepatol.* 41, 49-54.

Vaquero,J., and Butterworth,R.F. (2006). The brain glutamate system in liver failure. *J. Neurochem.* 98, 661-669.

Ytrebo,L.M., Kristiansen,R.G., Maehre,H., Fuskevag,O.M., Kalstad,T., Revhaug,A., Cobos,M.J., Jalan,R., and Rose,C.F. (2009). L-ornithine phenylacetate attenuates increased arterial and extracellular brain ammonia and prevents intracranial hypertension in pigs with acute liver failure. *Hepatology* 50, 165-174.

DISCUSSIÓ

8 DISCUSSIÓ

8.1 Alteracions neurofisiològiques en rates amb anastomosi porto-cava i en rates amb cirrosi

La principal observació dels estudis que constitueixen la tesi doctoral és la demostració d'alteracions funcionals de la via motora demostrables per neurofisiologia en models animals d'encefalopatia hepàtica.

En el primer estudi es va demostrar en rates amb anastomosi porto-cava una disminució de l'amplitud del potencial motor després de la intervenció quirúrgica i en rates amb cirrosi induïda per tetraclorur de carboni un increment del temps de latència dels potencials evocats motors.

El model de rates amb anastomosi porto-cava es considera un model d'encefalopatia hepàtica mínima. Aquestes rates mostren un aspecte general normal, estan despertes i mantenen l'activitat habitual. L'estudi detallat de la funció i estructura neurològica mostra diverses alteracions semblants a les presents en pacients amb cirrosi i encefalopatia hepàtica (Beaubernard et al., 1980; Szerb and Butterworth, 1992; Yengue et al., 2001). Aquest model s'aproxima a la situació humana, però té la limitació que no permet estudiar una via neuronal ben definida. Les alteracions del comportament en aquest model són escasses i difícils de monitoritzar. El paràmetre de comportament més utilitzat és el ritme circadià d'activitat motora (Coy et al., 1992). Però aquest és un paràmetre inespecífic amb un substrat neuronal complex, pel que és difícil relacionar la funció neuronal (circuitos neuronals de l'hipotàlam) i l'expressió de l'alteració funcional (ritme dia/nit d'activitat física o ritme son-vigília) (Cordoba et al., 1997).

La disminució de l'amplitud dels potencials evocats motors que es va observar en rates amb anastomosi porto-cava reproduïx part de les alteracions de la funció de la via motora que s'han descrit en pacients amb cirrosi i encefalopatia hepàtica mínima (Cordoba et al., 2003). Les alteracions de l'amplitud corresponen a una disminució en l'excitabilitat neuronal (Lewis and Byblow, 2001), el que està d'acord amb que l'encefalopatia hepàtica es caracteritzi per un predomini del to neuronal inhibidor (Ahboucha and Butterworth, 2004). L'explicació més plausible pels trastorns de l'excitabilitat és que corresponen a trastorns de la neurotransmissió. Donat que el principal sistema neurotransmissor d'aquesta via neuronal és el glutamat, i que s'han descrit alteracions de la neurotransmissió glutamatèrgica en l'encefalopatia hepàtica (Butterworth, 2001; Monfort et al., 2002), és possible que aquestes expliquin la disminució de l'excitabilitat detectada en rates amb anastomosi porto-cava.

El model de rates amb cirrosi i ascites per tetraclorur de carboni s'ha fet servir àmpliament per l'estudi de la peritonitis bacteriana espontània (Runyon et al., 1991). Aquest model reproduïx les alteracions de la circulació esplènica, l'ascites, les alteracions de la funció renal, el desenvolupament de translocació bacteriana i part dels trastorns histològics característics de la cirrosi hepàtica (Lautenschlager et al., 1982; Llovet et al., 1994; Runyon et al., 1994). Aquest model no s'ha utilitzat prèviament per investigar la fisiopatologia de l'encefalopatia hepàtica. Uns dels motius és la seva important variabilitat, com demostra que mentre un número important de rates morissin abans de l'aparició d'ascites, altres no arribessin mai a presentar-la. Per altre banda és difícil avaluar alteracions de comportament. Aquestes rates presenten una disminució de la mobilitat deguda a l'ascites i als trastorns musculars que apareixen per la cirrosi (Picardi et al., 1997). Aquestes alteracions no permeten fer

servir l'activitat motora com un índex d'encefalopatia, com es fa servir habitualment en altres models. No obstant, aquestes rates presenten una avantatge conceptual, presenten la malaltia hepàtica i les alteracions associades a la mateixa que és responsable dels episodis d'encefalopatia hepàtica en humans.

El nostre estudi demostra que les rates amb cirrosi i ascites per tetraclorur de carboni mostren un increment del temps de latència, el que és equivalent a una disminució de la velocitat de conducció motora. El principal factor que determina la velocitat de conducció motora és el grau de mielinització de les fibres motores (Magistris et al., 2003). En pacients amb cirrosi hepàtica s'ha descrit una disminució de la velocitat de conducció motora central estimada per estimulació magnètica transcortical, que millora després del trasplantament hepàtic (Cordoba et al., 2003). Aquestes alteracions es correlacionen amb la presència d'edema astrocitari a la via cortico-espinal mesurat per ressonància magnètica. Donat que no s'han descrit trastorns del grau de mielinització en estudis histològics, és possible que l'edema astrocitari ocasioni alteracions funcionals de la mielina (Lewis and Howdle, 2003;Mendoza et al., 1994).

Les diferències en les alteracions de la funció de la via motora entre el model de rates amb anastomosi porto-cava i cirrosi per tetraclorur de carboni recolzaria que els elements que ocasionen una disminució de l'excitabilitat i una disminució de la velocitat de conducció motora són diferents. En el primer model es va observar una disminució de l'amplitud i en el segon model un increment de la latència. En aquest sentit, es interessant l'experiència en pacients amb cirrosi i encefalopatia hepàtica mínima. Els dos paràmetres es van veure alterats, però l'evolució després del trasplantament hepàtic va ser diferent. Mentre que es va observar una ràpida milloria

de l'amplitud del potencial motor, la latència va persistir alterada durant un període de temps mes llarg.

Una troballa interessant en el nostre estudi va ser el registre dels potencials motors en una rata amb cirrosi i ascites que presentava un trastorn del comportament compatible amb coma hepàtic. Coincidint amb el coma hepàtic la rata presentava signes d'infecció del líquid ascític (peritonitis bacteriana espontània) al que es va dur a terme un cultiu i determinació del líquid ascític i va sortir infectat per *Escherichia Coli*, mentre les altres mostres de líquid ascític no han sortit infectades.

La peritonitis bacteriana espontània es una causa freqüent d'encefalopatia hepàtica en pacients amb cirrosi. L'estudi neurofisiològic va detectar una disminució important de l'amplitud del potencial motor i un increment de la latència. Aquestes troballes recolzen que les alteracions lleus dels potencials motors detectades en rates amb anastomosi porto-cava i en rates amb cirrosi i ascites són degudes a una forma d'encefalopatia hepàtica lleu (mínima).

Un altre observació de l'estudi és la demostració que el propofol té un efecte sobre l'excitabilitat i la conducció neuronal, tal com s'ha demostrat en altres anestèsics. S'ha demostrat que el deflurane (Haghighi et al., 1996), l'isoflurà (Haghighi et al., 1990; Kawaguchi et al., 1996) i la combinació ketamina/xilacina (Zandieh et al., 2003) afecten de forma parcial o total la latència i l'amplitud dels potencials evocats motors. En canvi amb propofol a dosis baixes es poden mesurar bé els potencials motors (Fishback et al., 1995).

Cal subratllar que es va escollir el propofol perquè la farmacocinètica d'aquest anestèsic no es veu alterada per la presència d'insuficiència hepàtica, tal com s'ha demostrat en pacients amb cirrosi (Servin et al., 1990). Una avantatge del propofol és

que és possible modificar fàcilment la dosis d'acord a l'efecte anestèsic observat. No obstant no es pot excloure que l'insuficiència hepàtica modifiqui els efectes farmacodinàmics. Es coneix bé que en l'encefalopatia hepàtica existeix una sensibilitat augmentada a l'efecte dels anestèsics.

8.2 Desenvolupament d'un mètode per estudiar la funció de la via motora sense anestèsia

Els estudis previs demostraren que el propofol tenia un efecte sobre els potencials evocats motors, pel que seria útil poder disposar d'un mètode per estudiar els animals sense anestèsia. Aquest va ser el motiu pel que es va desenvolupar un model per a estudis funcional de la via motora en rata sense anestèsia i en lliure moviment. Això es va aconseguir amb la implantació crònica d'elèctrodes subcutanis. Un cop el model va ser finalitzat i per poder-lo validar, es va analitzar l'efecte dels elèctrodes durant un temps per observar l'estabilitat dels registres i demostrem que durant 3 setmanes els registres són estables, encara que en el nostre laboratori s'ha pogut mantenir durant molt més temps els elèctrodes implantats i amb bons registres neurofisiològics. Amb aquest nou model es va estudiar l'efecte dels 3 anestèsics més comuns utilitzats en la neurofisiologia experimental i es va observar que tant el pentobarbital, la ketamina+xilacina com el propofol emprats a 3 dosis diferents mostraven un efecte dosi-depenent sobre la latència i l'amplitud dels potencials evocats motors.

El desenvolupament d'aquest mètode pot resultar molt útil en models que estudien les lesions medul·lars. En l'actualitat s'estan desenvolupant una sèrie de tractaments que es basen en l'ús de la teràpia cel·lular amb resultats esperançadors (Erceg et al., 2010).

Un dels problemes que presenten els estudis, que investiguen amb aquest

tractaments, és la interferència que poden tenir els anestèsics per detectar petites millories del tractament. En aquest sentit el disposar d'un mètode reproducible a llarg termini que no precisa d'anestèsics, pot resultar de gran utilitat. Una altra aplicació d'aquest mètode és investigar l'efecte d'anestèsics que es fan servir en intervencions quirúrgiques que afecten a la via motora. Aquestes intervencions es realitzen sota anestèsia i és necessari monitoritzar la funció de la via motora per excloure una lesió sobre la mateixa. En aquest sentit, la selecció d'un anestèsic que afecti poc la funció de la via motora permet fer una millor monitorització (Fehlings et al., 1989; Zentner et al., 1997).

8.3 La medicació dels potencials evocats motors: un mètode vàlid per mesurar

l'encefalopatia hepàtica

El tercer estudi demostra alteracions funcionals de la via motora en diferents models experimentals d'encefalopatia hepàtica: a) en un model de fallida hepàtica aguda b) en un model d'encefalopatia hepàtica precipitat per lipopolisacàrids o per sang al tub digestiu. En canvi no es va detectar alteracions en un model de fallida hepàtica crònica com és el model de lligadura del conducte biliar.

Les rates amb fallida hepàtica aguda manifesten una progressió de la malaltia i de l'edema cerebral de forma molt reproducible (Rose et al., 2000). Els potencials evocats motors van mostrar una disminució de l'amplitud i un increment de la latència progressiva en el temps. En aquest model les alteracions ja són presents a les 6 hores després de la lligadura de l'artèria hepàtica. En aquest punt les rates mostren manifestacions que són difícils de determinar (menor activitat, menor reacció al dolor).

Les rates amb anastomosi porto-cava i amb lligadura del conducte biliar representen models d'encefalopatia hepàtica associats amb fallida hepàtica crònica. Les alteracions en el comportament, representatives de l'encefalopatia hepàtica mínima, són molt lleus (menor activitat motora, alteracions en l'aprenentatge) (Jover et al., 2006). En aquest estudi, les alteracions funcionals de la via motora estan preservades. Això pot ser degut a que les alteracions en el comportament que són descrites prèviament involucren altres circuits neuronals que no pas la via motora pròpiament dita.

Com les alteracions dels models crònics són tan subtils, aquest normalment són agreujats amb factors precipitants (Mullen et al., 1997). La idea d'utilitzar aquests factors agreujants és emular el que passa en la clínica habitual: encefalopatia secundària a factors precipitants. Es va observar que la injecció de lipopolisacàrids i l'administració de sang al tub digestiu indueixen alteracions reversibles dels potencials evocats motors. Durant aquest període els animals mostren manifestacions subtils d'encefalopatia, similars a les trobades a estadis temprans de la fallida hepàtica aguda. Aquestes manifestacions neurològiques són difícils de reproduir ja que depenen molt de l'objectivitat de cada assessor, tal i com varem demostrar amb una molt baixa correlació utilitzant 3 avaluadors diferents.

El monitoratge dels potencials evocats motors compleix varis criteris que demostren que és una bona eina per estudiar l'encefalopatia hepàtica (van der Staay et al., 2009).

El primer criteri és la reproductibilitat dels potencials evocats motors i que es demostra en les rates control en les que s'estudia cada 2 hores durant 8 hores, diàriament durant dos dies, o setmanalment durant 6 setmanes. Un segon avantatge que té el mètode és la validesa aparent del model, ja que les alteracions dels potencials evocats motors trobades en els animals semblen les trobades en humans,

on la disfunció del tracte motor voluntari va en paral·lel amb la severitat de l'encefalopatia hepàtica (Andrefsky JC, 1997; Cadranet et al., 2001; Cordoba et al., 2003). De forma similar els potencials evocats motors mostren: a) alteracions molt marcades en la fallida hepàtica aguda, b) alteracions lleus en model agut a les 6 hores i en models d'anastomosi porto-cava amb factor precipitant; i c) mancança d'alteracions en el model crònica de lligadura del conducte biliar que necessita de tests complexos per determinar les alteracions en el comportament (Jover et al., 2006). Aquestes troballes indiquen que l'amplitud i la latència poden ser utilitzades com a quantificadors objectius de l'encefalopatia hepàtica experimental.

En tercer lloc, l'estudi dels potencials evocats motors tenen validació predictiva, ja que permet una extrapolació dels efectes dels factors que milloren o empitjoren l'encefalopatia hepàtica en humans. Es va determinar que la hipotèrmia, l'única intervenció que té una clara eficàcia en el tractament de la fallida hepàtica aguda (Cordoba et al., 1999; Jalan et al., 1999) prevení les alteracions en l'amplitud dels potencials evocats motors en rates amb fallida hepàtica aguda. A més a més, els registres dels potencials evocats motors són capaços de detectar els efectes sobre rates amb anastomosi porto-cava dels factors precipitants com són la sang al tub digestiu i/o els lipopolisacàrids (Ferenci et al., 2002). L'administració de sang al tub digestiu disminueix l'amplitud i incrementa la latència de forma reversible. La injecció de lipopolisacàrids disminueix l'amplitud dels potencials evocats motors i la combinació d'ambdós disminueix l'amplitud i incrementa la latència.

La quarta condició que es demostra amb l'estudi dels potencials evocats motors és que té validesa de construcció ja que s'acumulen evidències empíriques sobre les relacions teòriques que donen suport i fonamenten el concepte de les alteracions funcionals. Hi

ha una relació entre la concentració en el líquid de microdiàlisi d'amoníac, glutamat i glutamina i l'aparició d'alteracions en els potencials evocats motors, el que està d'acord amb les hipòtesis que associen l'encefalopatia hepàtica amb els efectes de l'amoníac.

8.4 Edema cerebral en l'encefalopatia hepàtica

Les hipòtesis actuals proposen que l'encefalopatia hepàtica és secundària als efectes de l'amoníac i els seus metabòlits en el teixit cerebral (Butterworth, 1996). L'amoníac és metabolitzat cap a glutamina en els astròcits i indueix edema astrocitari (Norenberg et al., 2005) que causa edema cerebral; i que està ben documentat en pacients amb encefalopatia hepàtica (Shah et al., 2008). Una major sensibilitat per desenvolupar edema, comparat amb la resta del cervell, s'ha observat a la via cortico-espinal en humans i ha estat relacionada amb les alteracions del tracte motor (Cordoba et al., 2003). En rates amb fallida hepàtica aguda es va observar un increment en el contingut d'aigua cerebral en el tronc de l'encèfal on està localitzat el tracte motor de la rata. Aquest increment d'aigua es produeix abans de l'increment en el còrtex i és present a les 6 hores després de la lligadura de l'artèria hepàtica, al mateix temps que els potencials evocats motors s'alteren.

L'observació del baix grau d'edema cerebral porta cap a la hipòtesi que la disfunció neuronal és secundària a les alteracions metabòliques causades per l'increment del volum d'aigua en els astròcits (Haussinger et al., 2000). Canvis en els osmòlits orgànics, com la disminució de mioinositol, present en rates amb anastomosi porto-cava (Cordoba et al., 1996) i l'activació d'aquaporina-4 detectada en rates amb lligadura del conducte biliar (Wright et al., 2010), són interpretades com a mecanismes

compensatoris que prevenen l'aparició d'edema cerebral i poden explicar la no aparició d'alteracions en els potencials evocats motors en aquests models.

La utilització d'un tractament dirigit a baixar l'aigua cerebral podria ser una eina terapèutica en l'encefalopatia hepàtica (Jones and Lavini, 2002). Per aquest motiu es va estudiar l'efecte del manitol, una droga emprada freqüentment per baixar la hipertensió intracranial (Jalan, 2003), en rates amb fallida hepàtica aguda i es va baixar el contingut d'aigua en el cervell, però no es va millorar els potencials evocats motors. Observacions semblants amb una falta de relació entre l'aigua cerebral i el comportament ha estat publicat en rates amb lligadura del conducte biliar que reben lipopolisacàrids com a factor precipitant (Wright et al., 2010).

8.5 Metabolisme de l'amoníac

En relació amb la hipòtesis actual de la implicació de l'amoníac en l'encefalopatia hepàtica, el model d'anastomosi porto-cava després de l'administració de sang al tracte digestiu ocasiona un increment d'amoníac i del aminoàcids, similars als observats en pacients que tenen cirrosi i una hemorràgia digestiva (Damink et al., 2009). La diferència entre tot el teixit cerebral i el líquid de microdiàlisi és que aquest últim indica que podria haver canvis en el compartiment extracel·lular relacionats amb el metabolisme de l'amoníac que no tenen per què veure's en el teixit total. Les alteracions en el potencials evocats motors i els canvis en l'amoníac i els seus metabòlits van en relació amb la idea que l'amoni podria induir alteracions en la funció neuronal. L'amoni podria interferir la neurotransmissió perquè modifica la concentració de glutamat en les sinapsis (Butterworth, 1997) o podria bloquejar la conducció dels potencials d'acció en la terminal pre-sinàptica (Raabe, 1990).

8.6 Noves estratègies terapèutiques: ornitina-fenilacetat

La validesa dels potencials evocats motors per estudiar l'encefalopatia hepàtica en models experimentals permet utilitzar aquesta metodologia per la quantificació objectiva del grau d'alteració motora i per tant ofereix la possibilitat d'investigar els mecanismes involucrats en la patogènesi de l'encefalopatia hepàtica (Guerit et al., 2009). A més a més, aquesta metodologia permet provar noves estratègies terapèutiques o assajar nous fàrmacs.

Una nova estratègia terapèutica que ha estat proposada per l'encefalopatia hepàtica es la combinació d'ornitina i fenilacetat. Aquest tractament podria reduir l'amoníac mitjançant una estimulació de la síntesi de glutamina i la seva posterior transformació en fenilacetil-glutamina, que s'elimina en orina. La combinació d'ornitina i fenilacetat ha estat estudiada en models animals de fallida hepàtica aguda i crònica. En models de devascularització hepàtica en porcs (Ytrebo et al., 2009) i en rates amb lligadura biliar (Davies et al., 2009) l'administració de la combinació, però no pas la d'ornitina o fenilacetat per separats, va disminuir l'amoníac plasmàtic i va atenuar l'edema cerebral. Ornitina-fenilacetat és una nova formulació que combina ornitina i fenilacetat en una sal. Aquesta droga s'està estudiant la seva farmacocinètica i s'està estudiant per a esser usada en el tractament de l'encefalopatia hepàtica. Experiments funcionals analitzant els efectes de l'ornitina-fenilacetat aporten dades objectives.

En el model d'insuficiència hepàtica crònica precipitada per l'administració de sang al tracte digestiu se li va administrar ornitina-fenilacetat com a tractament i demostrant que a part de prevenir les alteracions funcionals en les rates tractades, també va demostrar que reduïa la concentració plasmàtica d'amoníac. Els mecanismes

involucrats en la millora del potencials evocats motors venen relacionats amb l'amoníac i els seus metabòlits ja que paral·lelament es produeix un increment de glutamina com a producte de transaminació de l'ornitina en glutamat i la formació en glutamina per part de la glutamina sintetasa. I després hi ha una baixada precoç d'aquesta glutamina que s'associa a l'aparició en orina de fenilacetil-glutamina.

Hi ha altres mecanismes implicats, ja que, l'estequiometria de la reacció no és directe i hi ha menys síntesis de fenilacetil-glutamina que el que correspondria a la baixada de la concentració d'amoníac. Per altre banda l'ornitina-fenilacetat redueix la concentració d'amoníac i glutamat en el líquid de microdiàlisi i per tant podria explicar els efectes beneficiosos de la droga en els potencials evocats motors, ja que evitaria les alteracions del glutamat en la sinapsi i podria evitar l'acció inhibidora de l'amoní en la recaptació del glutamat (Butterworth, 1997).

CONCLUSIONS

9 CONCLUSIONS

1. Es detecten anomalies funcionals de la via motora en diversos models experimentals d'insuficiència hepàtica.
2. És possible registrar els potencials evocats motors en animals sense anestèsia i en lliure moviment amb un nou mètode que implanta elèctrodes subcutanis.
3. El anestèsic tenen efectes directes sobre la funció de la via motora central en la rata.
4. Les alteracions funcionals de la via motora es relacionen amb els efectes de l'amoníac en el sistema nerviós central, però no amb l'edema cerebral.
5. L'estudi dels potencials evocats motors ofereix la possibilitat d'investigar els mecanismes involucrats en la fisiopatologia de l'encefalopatia hepàtica i provar nous tractaments.
6. Ornitina-fenilacetat té un efecte beneficiós en models d'encefalopatia hepàtica probablement pels seus efectes sobre el metabolisme de l'amoníac.

MATERIAL I MÈTODES

10 MATERIAL I MÈTODES

10.1 Animals

Pels estudis s'han fet servir rates Sprague Dawley del gènere mascle (Harlan, Barcelona i Udine) Les rates estaven estabulades en gàbies de policarbonat i mantingudes a temperatura constant de 22 °C amb un cicle de llum/fosc de 12/12 h. Se'ls administrà una dieta estàndard de manteniment A04 i aigua de beguda *ad libitum*. Una vegada estaven implantats els elèctrodes les rates es van engabiar de forma individual per dificultar la pèrdua dels elèctrodes i les lesions en les rates.

10.2 Model animals emprats

10.2.1 Models animal d'anastomosi portocava

Per la realització del model de anastomosi portocava s'ha seguit el protocol de Lee, S.H. and Fisher, B. (Lee and Fisher, 1961) amb petites modificacions. La cirurgia es realitza amb isofluora, un anestèsic general administrat per via inhalatòria en una dosi d'inducció del 5% amb un flux de 1000cc/min i amb una fase de manteniment de 1-3% d'isofluorà amb un flux de 1000cc/min.

La intervenció quirúrgica consisteix en la realització de una laparotomia mitja. S'identifica la vena porta i se l'aïlla de l'artèria hepàtica i del conducte biliar. Es procedeix a ocluir la vena amb una pinça hemostàtica i posteriorment es realitza una lligadura amb seda 4/0 el més a prop del fetge possible. A continuació es secciona la vena porta i s'encara a la vena cava. Es realitza una oclusió amb pinça hemostàtica de la vena cava inferior per sota i per sobre de les venes renals amb una pinça de Satinski. Sota microscopi s'obre un ullal a la vena cava i s'anastomosa amb la vena porta amb

una sutura continua de prolene 7/0 (figura 2). Es lliura la pinça hemostàtica de la vena cava i es confirma la circulació correcte de sang i l'absència de lesions intestinals.

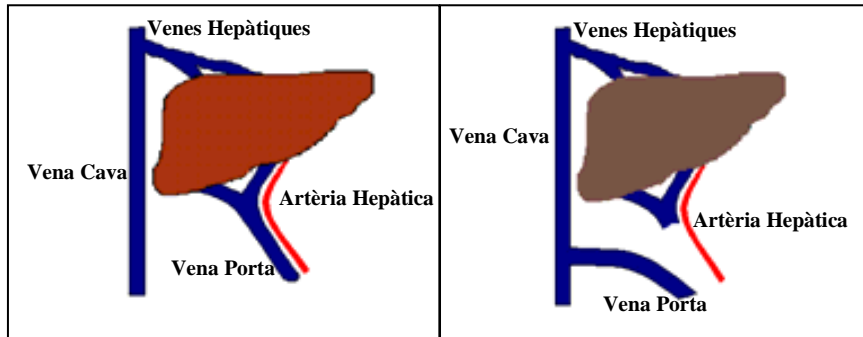


Figura 12: esquema de la cirurgia de derivació portosistèmica

Es procedeix al tancament de la cavitat abdominal amb una sutura amb punts aïllats per evitar que es puguin obrir. Es fa un seguiment de l'evolució de l'animal segons les pautes de seguiment establertes. Durant la intervenció es manté la temperatura corporal de la rata amb una manta tèrmica a 37 °C.

La intervenció fictícia consisteix en seguir un protocol similar de cirurgia (laparotomia, aïllament de la vena porta i oclusió vascular de la mateixa), però no es realitza l'anastomosi portocava, sinó únicament que es pinça la vena porta durant 15 minuts.

10.2.2 Model animal d'insuficiència hepàtica aguda

El model d'encefalopatia hepàtica aguda per cirurgia (sense utilització de tòxics) que s'utilitza és la rata ja que la realització d'una anastomosis portocava i una lligadura de l'artèria hepàtica a les 24 h només s'ha pogut realitzar en rates.

Per la realització del model d'insuficiència hepàtica es realitza una anastomosis portocava i a les 24 hores es fa una lligadura de l'artèria hepàtica amb seda 4-0. Aquests animals desenvolupen la malaltia fins que cauen en precoma (quan l'animal perd el reflexe d'aixecar-se) a les 10-12 hores. Els animals entren en coma (quan ja perden el reflexe pupilar) 14-16 hores. En aquest model d'encefalopatia hepàtica aguda els animals se'ls ha de controlar la temperatura durant tot l'experiment amb mantes tèrmiques així com la glucèmia per evitar tenir un coma hipoglucèmic. Es mirarà la glucèmia i la temperatura cada 45 minuts i es mantindran dins dels paràmetres basals.

10.2.3 Model animal de cirrosi per tetraclorur de carboni

Per aquest model s'ha seguit el protocol desenvolupat per B. Runyon (Runyon et al., 1991) amb algunes modificacions (Lorenzo-Zuniga et al., 2003). Essencialment consisteix en l'administració de 1.5 mmol/L de fenobarbital a l'aigua de beguda (ad libitum) conjuntament amb tetraclorur de carboni 20 µL/kg/setmana amb una mica d'aigua per gavage (Popper and Sons, New Hyde Park, NY). S'inicia l'administració del tetraclorur de carboni quan el pes dels animals arriba a 200 grams, i el temps que triguen en arribar-hi només prenen en fenobarbital de l'aigua de beure.

Entre les 8 i les 14 setmanes d'administrar el tetraclorur de carboni apareix ascitis. Un cop apareix ascitis es realitzarà a la extracció setmanal de líquid ascitis (1 cc) amb una agulla de 25-gauge de 15 mm de llarg i de sang de la cua (250 mcl) per exàmens posteriors.

10.2.4 Model animal de lligadura del conducte biliar

El model de la lligadura del conducte biliar (BDL) és un model de cirrosi biliar secundària. És un model que s'ha realitzat principalment en rata, ja que aquesta espècie es caracteritza per no tenir vesícula biliar, i per tant la fa especialment apropiada. La intervenció consisteix en fer una laparotomia de l'animal i dissecar el conducte biliar del greix adjacent, i es prepara una lligadura, es punxa en direcció al fetge amb una agulla de 30G 0,1 mL/kg de formalina ja que la formalina es esclerosant i per tant el conducte biliar s'esganxa i no permet que es formi un biloma o bola de bilis que si es rebenta pot provocar una peritonitis. Es fa la primera lligadura ràpidament i neteja el possible líquid que hagi sortit. Es fa una segona lligadura i es talla entre els dos nusos per evitar la repermeabilització. Per millorar la supervivència de les rates BDL es realitza tractament profilàctic (vitamina K).

En el grup de rates amb cirurgia fictícia (sham) es fa el mateix procediment però no es realitza la doble lligadura ni la injecció de formalina

10.3 Mètode neurofisiològic

Vàrem desenvolupar una nova metodologia basada en la implantació crònica d'elèctrodes per realitzar registres neurofisiològics en rates sense anestèsia. Aquesta metodologia està basada en una modificació d'un model anterior (Schlag et al., 2001). La principal diferència en el nostre mètode és la implantació d'elèctrodes subcutanis enlloc d'utilitzar agulles per l'estimulació o registre dels potencials evocats motors.

Localització dels elèctrodes

Després de molts assajos previs amb diferents elèctrodes, al final utilitzem uns elèctrodes utilitzats en cardiologia pediàtrica (Medtronic 6492 Model Unipolar

Temporary Atrial Pacing Lead, Denmark). Aquests elèctrodes consisteixen amb un elèctrode amb cable multifilament conductor aïllat. A l'extrem distal té un fil blau monofilament helicoidal amb una agulla corba a l'extrem que permet la inserció i fixació en el teixit. La part helicoidal del fil s'insereix en el teixit (múscul o teixit subcutani) amb una tracció suau de l'agulla. Un cop l'elèctrode està fixat dins del teixit, es realitza un nus amb el monofilament blau i l'agulla es retira del teixit. L'elèctrode té un diàmetre de 0,6 mm amb una superfície de 5.0 mm². Aquest petit diàmetre i la alta flexibilitat dels elèctrodes permeten una bona tolerància i una mínima lesió traumàtica durant la implantació. A l'extrem proximal té un pin connector (mascle) de 0,86 mm que es connecta a l'electromiògraf. La connexió es realitza a través d'un cable específicament dissenyat de 0,5 m de llarg (Medtronic, Dinamarca) que té un connector femella en un extrem i un connector touchproof a l'altre extrem. Aquest connecta a l'electromiògraf. Sis elèctrodes subcutanis s'implanten sota anestèsia (isoflurà). Pel registre del Potencial d'acció motor compost (CMAP), un elèctrode s'implanta en el múscul tibial anterior (càtode) i un s'implanta a l'empenya (ànode). Per induir els CMAP després de l'estimulació nerviosa perifèrica, un elèctrode s'implanta al múscul (càtode) i l'altre de forma subcutània (ànode), els dos prop del nervi ciàtic. Per la inducció del potencials evocats motors (MEP) després de l'estimulació central, un elèctrode s'implanta sota de la barbeta (ànode) i un cargol cranial s'utilitza com a càtode. Com a terra, un elèctrode s'implanta subcutàniament a la regió lumbar. Cada extrem de cada elèctrode es passa amb un trocar per sota la pell fins a l'esquena de la rata i s'identifica amb una cinta de color. Els extrems dels elèctrodes s'exterioritzen un es cusen a l'esquena de la rata de forma conjunta evitant

que es toquin entre ells per evitar interferències. La implantació es dur a terme sota cirurgia neta. La ferida es cuida cada 2-3 dies amb povidona iodada.

10.3.1 Cargol cranial

El cargol cranial s'implanta com a càtode per estimular els potencials evocats motors. Per aquest propòsit els animals s'anestesien amb isoflurà i el cap de la rata es fixa en un banc d'estereotaxis (Kopf Instruments, California, USA). Es fa un forat a la calota amb una trepant (Dremel, Madrid, Spain) amb una broca de 1.1 mm de diàmetre (Ref: 505.111 Panoptica, Barcelona, Spain); es fa el forat evitant perforar la dura del cervell. El cargol que s'implanta és d'acer inoxidable, un llarg de 10 mm, un diàmetre de 1,4 mm i un cap de 2,8 mm (Ref: 00.028 Panoptica, Barcelona, Spain). El cargol cranial es posiciona entre 1-2 mm posterior al punt craniomètric lambda a una profunditat de 1,5mm i es fixa amb ciment dental. La connexió del cargol cranial amb l'electromiògraf es fa un cable on a un extrem hi ha una pinça de cocodril per agafar el cargol i a l'altre extrem un connector touchproof per connectar a l'electromiògraf.

10.3.2 Registres neurofisiològics

Durant els registres neurofisiològics, les rates estan lliure en les seves gàbies. Els cables de l'electromiògraf estan connectat a l'animal sense que aquest pugui treure-se'ls.

Els MEP s'indueixen amb l'electromiògraf (Medtronic Keypoint Portable, Dinamarca).

La franja de pas del registre dels potencials evocats motors és de 2Hz to 10KHz. Durant l'experiment, la duració del pols és de 0,1 ms. Els registres s'inicien registrant la màxima amplitud del potencial perifèric (CMAP). Aquest s'aconsegueix estimulant el nervi ciàtic amb únic estímul a intensitat supramàxima. A l'hora de registrar el

potencials evocats motors, s'estimula a intensitats creixents a nivell del cargol cranial fins que l'amplitud del potencial és màxima encara que continuem incrementant la intensitat. Amb la intensitat determinada, es fa la mitja de 4 potencials registrats a intensitat supramàxima. L'amplitud i la latència es calculen segons la definició estàndard (figure 14).

Les latències del CMAP de del MEP s'expressen en milisegons (ms) i l'amplitud en milivolts (mV). Per estandarditzar els resultats els MEP s'expressen com a ràtio del registre perifèric MEP/CMAP (%).

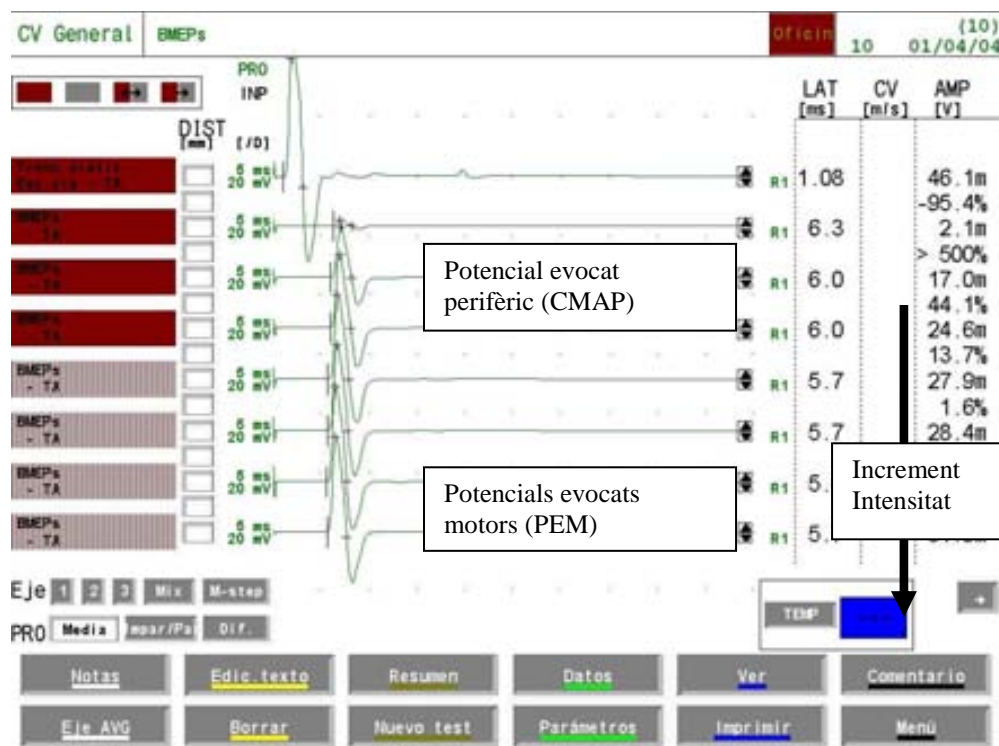


Figura 13: exemple de registre neurofisiològic amb un registre del potencial evocat perifèric (CMAP) que s'utilitza com a control i de potencials evocats motors després de l'estimulació central que incrementen la seva amplitud fins a llindar supramàxim.

Les variables neurofisiològiques estudiades són:

- Latència: correspon al interval de temps entre estimulació e inici de la ona positiva del potencial motor. Es mesura en milisegons (ms). Es un índex de la velocitat de conducció neuronal.
- Amplitud: correspon a l'alçada de la ona positiva del potencial motor. Es mesura en milivolts (mV) i s'expressa en % respecte a l'amplitud del potencial motor induït amb estímul del nervi perifèric. Per tant la variable amplitud es mostra com a amplitud potencial motor/amplitud potencial nervi perifèric * 100. Aquesta variable es un índex del nombre de neurones que es despolaritzen amb l'estímul elèctric i depèn del grau d'excitabilitat.

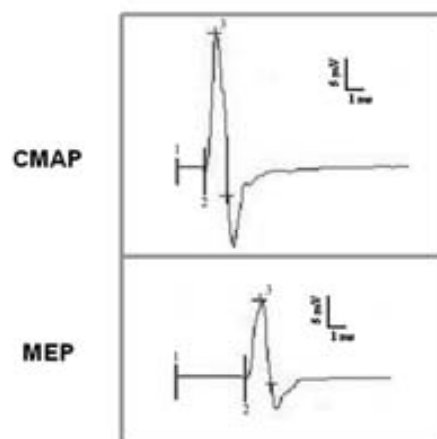


Figura 14: Mètode de quantificació de l'amplitud (mV) mesura l'alçada de l'ona del potencials entre els números 2 i 3; la latència mesura la velocitat de conducció (ms) i es calcula entre els números 1 i 2.

10.4 Manifestacions neurològiques

Per estudiar si els animals tenien alteracions funcionals tal i com les podíem detectar nosaltres amb neurofisiologia vàrem fer una monitorització testant 13 diferents reflexes on s'inclouïen entre d'altres dolor, reacció, posició i reflex corneal similar al publicat per () (Zimmermann et al., 1989) (el reflex pupil·lar no es va analitzar ja que l'estudi el vàrem realitzar amb 3 diferents assessors amb un experiment a cegues segons el grup que pertanyia l'animal. Per cada reflex que tenia l'animal, 1 punt se li atorgava en el temps específic d'anàlisi.

10.5 Mesura de l'aigua

Per determinar l'aigua en el teixit nerviós central es va mesurar utilitzant una columna amb un gradient de densitat de kerosene-bromobenze en un tub de 100 mL precalibrada amb K_2SO_4 (Marmarou et al., 1978). De cada animal, sis mostres de còrtex (substància gris) i del tronc de l'encèfal (substància blanca) d' aproximadament 1 mm^3 es submergeixen delicadament en el fluid i al cap de 2 minuts es determina el punt d'equilibri del gradient de la columna i es fa una mitja dels sis trossets. La densitat específica del teixit es va calcular i els resultats s'expressen en % d'aigua present en el teixit.

10.6 Microdiàlisi cerebral

Per a realitzar la microdiàlisi cerebral en el còrtex prefrontal de l'animal, aquest es va anestesiar amb isoflurà, i es va col·locar en el banc d'estereotaxi (Kopf Instruments, California, USA). Es va realitzar una incisió a la pell del cap i es va fer un forat a la calota amb una broca de 1,1 mm de diàmetre (CMA/microdialysis, Stockholm, Sweden). Sota el microscopi es perfora la dura per evitar lesionar el teixit cerebral amb la guia alhora que s'evita la perforació de vasos sanguinis. La cànula guia intracerebral de plàstic siliconitzat (CMA-12) es va introduir pel forat realitzat a la calota a una profunditat determinada (coordenades: +3,2 mm sagital, -1,5 mm lateral i -2,5 mm de profunditat relatiu al punt craniomètric Bregma basat en d'atlas de Paxinos i Watson. La guia es fixa amb dos cargols petits i amb ciment dental i es tanca amb la guia dummy. Es va cosir la pell i es van deixar recuperar els animals 24 hores a les seves gàbies respectives.

Després de les 24 hores de recuperació es va retirar la guia dummy i es va canviar per la sonda de microdiàlisi (CMA-12; 2 mm de llarg, 0,5 mm de diàmetre) que es va inserir suament.

El sistema utilitzat va ser CMA/microdialysis (Stockholm, Sweden). Les rates s'engabien en bols de microdiàlisi per permetre el seu lliure moviment (CMA-120). La bomba de microinjecció CMA-400 es va determinar a un flux de 2 μ L/min. El líquid cerebrospinal artificial es va preparar cada dia d'experiment amb aigua desionitzada i filtrada (NaCl 145 mM, KCl 3,0 mM, MgCl₂-6H₂O 1 mM, CaCl₂-2H₂O 2,26 mM- pH de 7,4)

Les mostres de microdiàlisi es van col·lectar en fraccions de 30 minuts a través del col·lector de fraccions CMA-142. Les fraccions es van congelar a -80°C fins al seu anàlisi.

10.7 Mesures bioquímiques

L'amoníac es va determinar de forma rutinària amb un analitzador Cobas Integra (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA) per metodologia colorimètrica estàndard.

Els aminoàcids varen ser determinats per reverse phase-high performance liquid chromatography (HPLC) amb un gradient de solvents binari a 50°C amb els derivats de feniltiocarbamilat. La detecció espectrofotomètrica a 254nm. Abans de la cromatografia es va afegir a les mostres un estàndard intern (norleucina) i les mostres es van desproteïtzar per ultrafiltració i es van derivar amb fenillisotiocianat (metodologia Pico-Tag) (Waters, Milford, MA, USA).

10.8 Metabòlits cerebrals

La ressonància magnètica espectroscòpica es va fer en un iman de 9,4 T amb una interfase AVANCE spectrometer (Bruker, Wissembourg, France) amb una sonda per ^1H . Prèviament es van extreure els metabòlits tal i com es descriu a (Barba et al., 2007) i es van dissoldre en 600 mL d'aigua deuretada. La espectroscòpia de protó es va obtenir a través de la seqüència WATERGATE (spun rotors = 20 Hz. $T_{2\text{eff}} = 59\text{s}$, 64 scans, 30°C). Les àrees de cada metabòlit es van mesurar per integració utilitzant el programa XWNNMR (Bruker, Wissembourg, France) i es comparaven amb la àrea del TSP (Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Germany que es va afegir com estàndard intern.

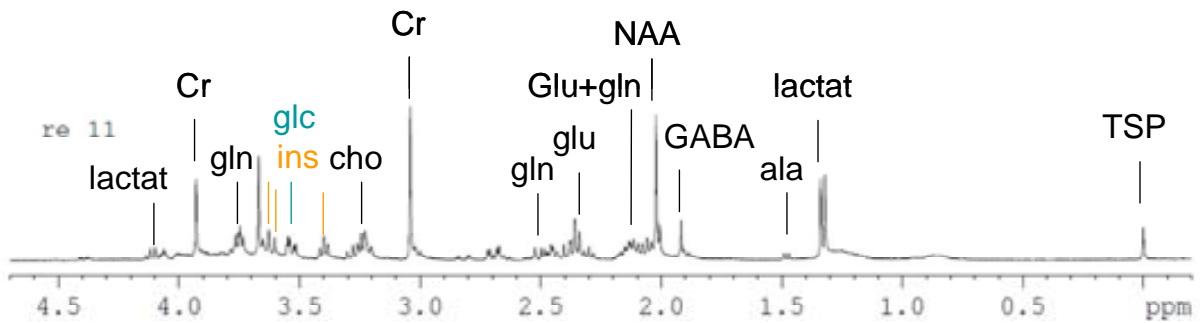


Figura 15: espectre dels metabolits detectats per ressonància magnètica espectroscòpica

10.9 Metodologia per a mesurar Fenilacetat i Fenilacetil-glutamina

Reactius: Àcid fenilacètic, àcid fenilbutíric i àcid fòrmic obtinguts a Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) i fenilacetil-glutamina a Synfine (Richmond Hill, ON, Canada).
 Estàndard intern deuterat (N-(fenil-d5-acetil)-L-glutamina) (d5-FAGN)obtingut a CDN isotopes (Pointe Claire, QB, Canada). LC-gradient de metanol (Merck, Darmstadt, Germany) i aigua Milli-Q. Ultrafiltres (>10000 dalton) de Millipore (Billerica, MA, USA).
 Preparació de mostres i estàndard: la corba de calibració es prepara diluint la solució stock de cada estàndard amb un pool de solució de plasma o orina ultrafiltrada com una matriu, s'afegeix metanol 0-65 μM amb aquest rang de concentració i afegint N-(fenil-d5-acetil)-L-glutamina com estàndard intern (10.5 μM al final), en tubs cònics de plàstic de centrifuga; ii.plasma: 100 μl de plasma es barregen amb d5-PAG (com estàndard) i s'ultrafiltra (10000g x 30min); iii.orina: 100 μl centrifugada i diluïda 1/10

amb metanol, vortexat i centrifugat de nou (1100g x 10min); 100 µl del sobrenedant es dilueix 1/3 amb 100 µl de metanol i d5-PAGN (com estàndards) i ultrafiltrat.

Líquid de cromatografia – tàndem espectrometria de masses: l'equip consisteix en un mòdul de separació UPLC (Waters, Milford, MA, USA) acoplat a un Xevo TQ sistema d'espectrometria de masses amb el software Mass Lynx (Waters, Manchester, UK). La columna analítica Acquity UPLC HSS C18 (2.1 x 100 mm). L'elusió de la mostra es realitza per 3 min a la fase mòbil linear que consisteix en 40% del solvent A (metanol) i 60% de solvent B (1% d'aigua amb àcid fòrmic), canviant a 80% de solvent A i 20% de B de 0-2 min, tornant a 40% solvent A/60% B del 2-2.1 min i equilibrat amb aquestes condicions durant 2.1-3 min. 5 µl de sobrenedant de les mostres s'injecta dins del sistema i la temperatura de la columna es manté a 40°C. Condicions per l'anàlisi de l'espectrometria de masses: el mode de ionització era electroesprai negatiu (ESI-); el voltatge capil·lar de 3kV; el gas de desolvatació escalfat fins 450°C i alliberat a un flux de 1100 L/h.; el flux de conus (argó): 0.15 mL/min. Les transicions MRM s'optimitzaren a les condicions: temps de dwell: 0.073 s. FAGN: ió precursor 263 (m/z), ió producte 145 (m/z), voltatge de conus 30 V, energia de col·lisió 15 eV; FA: ió precursor 135 (m/z), ió producte 91 (m/z), voltatge de conus 20 V, energia de col·lisió 10 eV; d5-FAGN: ió precursor 268 (m/z), ió producte 145 (m/z), voltatge de conus 30 V, energia de col·lisió 20 eV.

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

- Adams,R.D., and Foley,J.M. (1953). The neurological disorder associated with liver disease. *Res. Publ. Assoc. Res. Nerv. Ment. Dis.* *32*, 198-237.
- Ahboucha,S., and Butterworth,R.F. (2004). Pathophysiology of hepatic encephalopathy: a new look at GABA from the molecular standpoint. *Metab Brain Dis.* *19*, 331-343.
- Andrefsky JC,F.JI. Hepatic failure, encephalopathy, and deep tendon reflexes. *Neurology* *48*, 245. 1997.
Ref Type: Abstract
- Andres,T., Blei,M.D., Judy,R., and Cho,M.D. (1990). Brain edema in acute liver failure. Insight from experimental studies. *Rev. Invest Clin.* *42 Suppl*, 127-130.
- Bajaj,J.S. (2010). Review article: the modern management of hepatic encephalopathy. *Aliment. Pharmacol. Ther.* *31*, 537-547.
- Barba,I., Jaimez-Auguets,E., Rodriguez-Sinovas,A., and Garcia-Dorado,D. (2007). 1H NMR-based metabolomic identification of at-risk areas after myocardial infarction in swine. *MAGMA.* *20*, 265-271.
- Beaubernard,C., Salomon,F., and Bismuth,H. (1980). [Experimental hepatic encephalopathy. Study of the organization of a diurnal sleep pattern in rats with portocaval anastomosis]. *Biomedicine.* *32*, 76-80.
- Belanger,M., Cote,J., and Butterworth,R.F. (2006). Neurobiological characterization of an azoxymethane mouse model of acute liver failure. *Neurochem. Int.* *48*, 434-440.
- Bengtsson,F., Nobin,A., Falck,B., Gage,F.H., and Jeppsson,B. (1986). Portacaval shunt in the rat: selective alterations in behavior and brain serotonin. *Pharmacol. Biochem. Behav.* *24*, 1611-1616.
- Butterworth,R.F. (1993). Portal-systemic encephalopathy: a disorder of neuron-astrocytic metabolic trafficking. *Dev. Neurosci.* *15*, 313-319.
- Butterworth,R.F. (1996). The neurobiology of hepatic encephalopathy. *Semin. Liver Dis.* *16*, 235-244.
- Butterworth,R.F. (1997). Hepatic encephalopathy and brain edema in acute hepatic failure: does glutamate play a role? *Hepatology* *25*, 1032-1034.
- Butterworth,R.F. (2000). Hepatic encephalopathy: a neuropsychiatric disorder involving multiple neurotransmitter systems. *Curr. Opin. Neurol.* *13*, 721-727.
- Butterworth,R.F. (2001). Neurotransmitter dysfunction in hepatic encephalopathy: new approaches and new findings. *Metab Brain Dis.* *16*, 55-65.

- Butterworth,R.F., Norenberg,M.D., Felipo,V., Ferenci,P., Albrecht,J., and Blei,A.T. (2009). Experimental models of hepatic encephalopathy: ISHEN guidelines. *Liver Int.* 29, 783-788.
- Cadranel,J.F., Lebiez,E., Di,M., V, Bernard,B., El,K.S., Tourbah,A., Pidoux,B., Valla,D., and Opolon,P. (2001). Focal neurological signs in hepatic encephalopathy in cirrhotic patients: an underestimated entity? *Am. J. Gastroenterol.* 96, 515-518.
- Cauli,O., Mansouri,M.T., Agusti,A., and Felipo,V. (2009). Hyperammonemia increases GABAergic tone in the cerebellum but decreases it in the rat cortex. *Gastroenterology* 136, 1359-2.
- Chamuleau,R.A. (1996). Animal models of hepatic encephalopathy. *Semin. Liver Dis.* 16, 265-270.
- Chan,H., Hazell,A.S., Desjardins,P., and Butterworth,R.F. (2000). Effects of ammonia on glutamate transporter (GLAST) protein and mRNA in cultured rat cortical astrocytes. *Neurochem. Int.* 37, 243-248.
- Chatauret,N., Desjardins,P., Zwingmann,C., Rose,C., Rao,K.V., and Butterworth,R.F. (2006). Direct molecular and spectroscopic evidence for increased ammonia removal capacity of skeletal muscle in acute liver failure. *J. Hepatol.* 44, 1083-1088.
- Chavarria,L., Oria,M., Romero,J., Alonso,J., Lope-Piedrafita,S., and Cordoba,J. (2009). Diffusion Tensor Imaging Supports the Cytotoxic Origin of Brain Edema in a Rat Model of Acute Liver Failure. *Gastroenterology*.
- Chen,Y.H., Lin,F.Y., Liu,P.L., Huang,Y.T., Chiu,J.H., Chang,Y.C., Man,K.M., Hong,C.Y., Ho,Y.Y., and Lai,M.T. (2009). Antioxidative and hepatoprotective effects of magnolol on acetaminophen-induced liver damage in rats. *Arch. Pharm. Res.* 32, 221-228.
- Coll,M., Genesca,J., Raurell,I., Rodriguez-Vilarrupla,A., Mejias,M., Otero,T., Oria,M., Esteban,R., Guardia,J., Bosch,J., and Martell,M. (2008). Down-regulation of genes related to the adrenergic system may contribute to splanchnic vasodilation in rat portal hypertension. *J. Hepatol.* 49, 43-51.
- Cooper,A.J., and Plum,F. (1987). Biochemistry and physiology of brain ammonia. *Physiol Rev.* 67, 440-519.
- Cordoba,J., Crespin,J., Gottstein,J., and Blei,A.T. (1999). Mild hypothermia modifies ammonia-induced brain edema in rats after portacaval anastomosis. *Gastroenterology* 116, 686-693.
- Cordoba,J., Dupuis,J., Gottstein,J., and Blei,A.T. (1997). Stenosis of a portacaval anastomosis affects circadian locomotor activity in the rat: a multivariable analysis. *Am. J. Physiol* 273, G1218-G1225.

- Cordoba,J., Gottstein,J., and 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.
- Cordoba,J., and Minguez,B. (2008). Hepatic encephalopathy. *Semin. Liver Dis.* 28, 70-80.
- Cordoba,J., Ragner,N., Flavia,M., Vargas,V., Jacas,C., Alonso,J., and Rovira,A. (2003). T2 hyperintensity along the cortico-spinal tract in cirrhosis relates to functional abnormalities. *Hepatology* 38, 1026-1033.
- Coy,D.L., Mehta,R., Zee,P., Salchli,F., Turek,F.W., and Blei,A.T. (1992). Portal-systemic shunting and the disruption of circadian locomotor activity in the rat. *Gastroenterology* 103, 222-228.
- Damink,S.W., Dejong,C.H., and Jalan,R. (2009). Review article: hyperammonaemic and catabolic consequences of upper gastrointestinal bleeding in cirrhosis. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 29, 801-810.
- Danbolt,N.C. (2001). Glutamate uptake. *Prog. Neurobiol.* 65, 1-105.
- Davies,N.A., Wright,G., Ytrebo,L.M., Stadlbauer,V., Fuskevag,O.M., Zwingmann,C., Davies,D.C., Habtesion,A., Hodges,S.J., and Jalan,R. (2009). L-ornithine and phenylacetate synergistically produce sustained reduction in ammonia and brain water in cirrhotic rats. *Hepatology* 50, 155-164.
- Enns,G.M., Berry,S.A., Berry,G.T., Rhead,W.J., Brusilow,S.W., and Hamosh,A. (2007). Survival after treatment with phenylacetate and benzoate for urea-cycle disorders. *N. Engl. J. Med.* 356, 2282-2292.
- Erceg,S., Ronaghi,M., Oria,M., Rosello,M.G., Arago,M.A., Lopez,M.G., Radojevic,I., Moreno-Manzano,V., Rodriguez-Jimenez,F.J., Bhattacharya,S.S., Cordoba,J., and Stojkovic,M. (2010). Transplanted oligodendrocytes and motoneuron progenitors generated from human embryonic stem cells promote locomotor recovery after spinal cord transection. *Stem Cells* 28, 1541-1549.
- Escorsell,A., Mas,A., and de la,M.M. (2007). Acute liver failure in Spain: analysis of 267 cases. *Liver Transpl.* 13, 1389-1395.
- Fehlings,M.G., Tator,C.H., and Linden,R.D. (1989). The effect of nimodipine and dextran on axonal function and blood flow following experimental spinal cord injury. *J. Neurosurg.* 71, 403-416.
- Ferenci,P., Lockwood,A., Mullen,K., Tarter,R., Weissenborn,K., and Blei,A.T. (2002). Hepatic encephalopathy--definition, nomenclature, diagnosis, and quantification: final report of the working party at the 11th World Congresses of Gastroenterology, Vienna, 1998. *Hepatology* 35, 716-721.

Fishback,A.S., Shields,C.B., Linden,R.D., Zhang,Y.P., and Burke,D. (1995). The effects of propofol on rat transcranial magnetic motor evoked potentials. *Neurosurgery* 37, 969-974.

FrancaVilla,A., Makowka,L., Polimeno,L., Barone,M., Demetris,J., Prelich,J., Van Thiel,D.H., and Starzl,T.E. (1989). A dog model for acetaminophen-induced fulminant hepatic failure. *Gastroenterology* 96, 470-478.

Guerit,J.M., Amantini,A., Fischer,C., Kaplan,P.W., Mecarelli,O., Schnitzler,A., Ubiali,E., and Amodio,P. (2009). Neurophysiological investigations of hepatic encephalopathy: ISHEN practice guidelines. *Liver Int.* 29, 789-796.

Haghighi,S.S., Madsen,R., Green,K.D., Oro,J.J., and Kracke,G.R. (1990). Suppression of motor evoked potentials by inhalation anesthetics. *J. Neurosurg. Anesthesiol.* 2, 73-78.

Haghighi,S.S., Sirintrapun,S.J., Keller,B.P., Oro,J.J., and Madsen,R. (1996). Effect of desflurane anesthesia on transcortical motor evoked potentials. *J. Neurosurg. Anesthesiol.* 8, 47-51.

Haussinger,D., Kircheis,G., Fischer,R., Schliess,F., and vom,D.S. (2000). Hepatic encephalopathy in chronic liver disease: a clinical manifestation of astrocyte swelling and low-grade cerebral edema? *J. Hepatol.* 32, 1035-1038.

Haussinger,D., and Schliess,F. (2008). Pathogenetic mechanisms of hepatic encephalopathy. *Gut* 57, 1156-1165.

Jalan,R. (2003). Intracranial hypertension in acute liver failure: pathophysiological basis of rational management. *Semin. Liver Dis.* 23, 271-282.

Jalan,R., and Lee,W.M. (2009). Treatment of hyperammonemia in liver failure: a tale of two enzymes. *Gastroenterology* 136, 2048-2051.

Jalan,R., SW,O.D., Deutz,N.E., Lee,A., and Hayes,P.C. (1999). Moderate hypothermia for uncontrolled intracranial hypertension in acute liver failure. *Lancet* 354, 1164-1168.

Jalan,R., Wright,G., Davies,N.A., and Hodges,S.J. (2007). L-Ornithine phenylacetate (OP): a novel treatment for hyperammonemia and hepatic encephalopathy. *Med. Hypotheses* 69, 1064-1069.

Jones,E.A., and Lavini,C. (2002). Is cerebral edema a component of the syndrome of hepatic encephalopathy? *Hepatology* 35, 1270-1273.

Jover,R., Rodrigo,R., Felipo,V., Insausti,R., Saez-Valero,J., Garcia-Ayllon,M.S., Suarez,I., Candela,A., Compan,A., Esteban,A., Cauli,O., Auso,E., Rodriguez,E., Gutierrez,A., Girona,E., Erceg,S., Berbel,P., and Perez-Mateo,M. (2006). Brain edema and inflammatory activation in bile duct ligated rats with diet-induced hyperammonemia: A model of hepatic encephalopathy in cirrhosis. *Hepatology* 43, 1257-1266.

Kalpana,K., Ong,H.S., Soo,K.C., Tan,S.Y., and Prema,R.J. (1999). An improved model of galactosamine-induced fulminant hepatic failure in the pig. *J. Surg. Res.* 82, 121-130.

Kardel,T., Lund,Y., Olsen,P.Z., Mollgaard,V., and Gammeltoft,A. (1970). Encephalopathy and portacaval anastomosis. *Scand. J. Gastroenterol.* 5, 681-685.

Kasumov,T., Brunengraber,L.L., Comte,B., Puchowicz,M.A., Jobbins,K., Thomas,K., David,F., Kinman,R., Wehrli,S., Dahms,W., Kerr,D., Nissim,I., and Brunengraber,H. (2004). New secondary metabolites of phenylbutyrate in humans and rats. *Drug Metab Dispos.* 32, 10-19.

Kato,M., Hughes,R.D., Keays,R.T., and Williams,R. (1992). Electron microscopic study of brain capillaries in cerebral edema from fulminant hepatic failure. *Hepatology* 15, 1060-1066.

Kawaguchi,M., Shimizu,K., Furuya,H., Sakamoto,T., Ohnishi,H., and Karasawa,J. (1996). Effect of isoflurane on motor-evoked potentials induced by direct electrical stimulation of the exposed motor cortex with single, double, and triple stimuli in rats. *Anesthesiology* 85, 1176-1183.

Keiding,S., Sorensen,M., Bender,D., Munk,O.L., Ott,P., and Vilstrup,H. (2006). Brain metabolism of ¹³N-ammonia during acute hepatic encephalopathy in cirrhosis measured by positron emission tomography. *Hepatology* 43, 42-50.

Knubben,K., Thiel,C., Schenk,M., Etspuler,A., Schenk,T., Morgalla,M.H., and Konigsrainer,A. (2008). A new surgical model for hepatectomy in pigs. *Eur. Surg. Res.* 40, 41-46.

Lamb,C.R., and White,R.N. (1998). Morphology of congenital intrahepatic portacaval shunts in dogs and cats. *Vet. Rec.* 142, 55-60.

Laryea,M.D., Herebian,D., Meissner,T., and Mayatepek,E. (2010). Simultaneous LC-MS/MS determination of phenylbutyrate, phenylacetate benzoate and their corresponding metabolites phenylacetylglutamine and hippurate in blood and urine. *J. Inherit. Metab Dis.*

Lautenschlager,I., Vaananen,H., and Kulonen,E. (1982). Qualitative study on the Kupffer cells in the liver of ethanol- and carbon tetrachloride-treated rats. *Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand. [C.]* 90, 347-351.

Lee,S.H., and Fisher,B. (1961). Portacaval shunt in the rat. *Surgery* 50, 668-672.

Lewis,G.N., and Byblow,W.D. (2001). A method to monitor corticomotor excitability during passive rhythmic movement of the upper limb. *Brain Res. Brain Res. Protoc.* 8, 82-87.

Lewis,M., and Howdle,P.D. (2003). The neurology of liver failure. *QJM.* 96, 623-633.

Llovet,J.M., Bartoli,R., Planas,R., Cabre,E., Jimenez,M., Urban,A., Ojanguren,I., Arnal,J., and Gassull,M.A. (1994). Bacterial translocation in cirrhotic rats. Its role in the development of spontaneous bacterial peritonitis. *Gut* 35, 1648-1652.

- Lorenzo-Zuniga,V., Bartoli,R., Planas,R., Hofmann,A.F., Vinado,B., Hagey,L.R., Hernandez,J.M., Mane,J., Alvarez,M.A., Ausina,V., and Gassull,M.A. (2003). Oral bile acids reduce bacterial overgrowth, bacterial translocation, and endotoxemia in cirrhotic rats. *Hepatology* 37, 551-557.
- Luo,J.J., Yan,Z.P., Zhou,K.R., and Qian,S. (2003). Direct intrahepatic portacaval shunt: an experimental study. *World J. Gastroenterol.* 9, 324-328.
- Magistris,M.R., Truffert,A., and Rosler,K.M. (2003). [Contribution of electrophysiology to the study of a paresis of central origin]. *Rev. Med. Suisse Romande* 123, 269-271.
- Marmarou,A., Poll,W., Shulman,K., and Bhagavan,H. (1978). A simple gravimetric technique for measurement of cerebral edema. *J. Neurosurg.* 49, 530-537.
- Mendez,M., Mendez-Lopez,M., Lopez,L., Begega,A., Aller,M.A., Arias,J., and Arias,J.L. (2010). Reversal learning impairment and alterations in the prefrontal cortex and the hippocampus in a model of portosystemic hepatic encephalopathy. *Acta Neurol. Belg.* 110, 246-254.
- Mendoza,G., Marti-Fabregas,J., Kulisevsky,J., and Escartin,A. (1994). Hepatic myelopathy: a rare complication of portacaval shunt. *Eur. Neurol.* 34, 209-212.
- Minguez,B., Garcia-Pagan,J.C., Bosch,J., Turnes,J., Alonso,J., Rovira,A., and Cordoba,J. (2006). Noncirrhotic portal vein thrombosis exhibits neuropsychological and MR changes consistent with minimal hepatic encephalopathy. *Hepatology* 43, 707-714.
- Monfort,P., Munoz,M.D., ElAyadi,A., Kosenko,E., and Felipo,V. (2002). Effects of hyperammonemia and liver failure on glutamatergic neurotransmission. *Metab Brain Dis.* 17, 237-250.
- Mullen,K.D., Roessle,M., Jones,D.B., Grun,M., and Jones,E.A. (1997). Precipitation of overt encephalopathy in the portacaval shunted rat: towards the development of an adequate model of chronic portal systemic encephalopathy. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 9, 293-298.
- Newsome,P.N., Henderson,N.C., Nelson,L.J., Dabos,C., Filippi,C., Bellamy,C., Howie,F., Clutton,R.E., King,T., Lee,A., Hayes,P.C., and Plevris,J.N. (2010). Development of an invasively monitored porcine model of acetaminophen-induced acute liver failure. *BMC. Gastroenterol.* 10, 34.
- Norenberg,M.D., Rao,K.V., and Jayakumar,A.R. (2005). Mechanisms of ammonia-induced astrocyte swelling. *Metab Brain Dis.* 20, 303-318.
- Olafsson,S., Gottstein,J., and Blei,A.T. (1995). Brain edema and intracranial hypertension in rats after total hepatectomy. *Gastroenterology* 108, 1097-1103.
- Olde Damink,S.W., Dejong,C.H., Deutz,N.E., and Soeters,P.B. (1997). Decreased plasma and tissue isoleucine levels after simulated gastrointestinal bleeding by blood gavages in chronic portacaval shunted rats. *Gut* 40, 418-424.

- Olde Damink,S.W., Jalan,R., Deutz,N.E., Dejong,C.H., Redhead,D.N., Hynd,P., Hayes,P.C., and Soeters,P.B. (2007). Isoleucine infusion during "simulated" upper gastrointestinal bleeding improves liver and muscle protein synthesis in cirrhotic patients. *Hepatology* 45, 560-568.
- Olde Damink,S.W., Jalan,R., Redhead,D.N., Hayes,P.C., Deutz,N.E., and Soeters,P.B. (2002). Interorgan ammonia and amino acid metabolism in metabolically stable patients with cirrhosis and a TIPSS. *Hepatology* 36, 1163-1171.
- Oria,M., Chatauret,N., Chavarria,L., Romero-Gimenez,J., Palenzuela,L., Pardo-Yules,B., Arranz,J.A., Bodega,G., Ragner,N., and Cordoba,J. (2010). Motor-evoked potentials in awake rats are a valid method of assessing hepatic encephalopathy and of studying its pathogenesis. *Hepatology* 52, 2077-2085.
- Oria,M., Chatauret,N., Ragner,N., and Cordoba,J. (2008). A new method for measuring motor evoked potentials in the awake rat: effects of anesthetics. *J. Neurotrauma* 25, 266-275.
- Paxinos,G. (2004). *The rat nervous system* Elsevier Academic Press), pp. 154-159.
- Picardi,A., de Oliveira,A.C., Muguerza,B., Tosar,A., Quiroga,J., Castilla-Cortazar,I., Santidrian,S., and Prieto,J. (1997). Low doses of insulin-like growth factor-I improve nitrogen retention and food efficiency in rats with early cirrhosis. *J. Hepatol.* 26, 191-202.
- Quero,J.C., Hartmann,I.J., Meulstee,J., Hop,W.C., and Schalm,S.W. (1996). The diagnosis of subclinical hepatic encephalopathy in patients with cirrhosis using neuropsychological tests and automated electroencephalogram analysis. *Hepatology* 24, 556-560.
- Raabe,W. (1990). Effects of NH₄⁺ on reflexes in cat spinal cord. *J. Neurophysiol.* 64, 565-574.
- Rama Rao,K.V., Jayakumar,A.R., Tong,X., Curtis,K.M., and Norenberg,M.D. (2010). Brain aquaporin-4 in experimental acute liver failure. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 69, 869-879.
- Rodrigo,R., Cauli,O., Gomez-Pinedo,U., Agusti,A., Hernandez-Rabaza,V., Garcia-Verdugo,J.M., and Felipo,V. (2010). Hyperammonemia induces neuroinflammation that contributes to cognitive impairment in rats with hepatic encephalopathy. *Gastroenterology* 139, 675-684.
- Romero-Gomez,M., Ramos-Guerrero,R., Grande,L., de Teran,L.C., Corpas,R., Camacho,I., and Bautista,J.D. (2004). Intestinal glutaminase activity is increased in liver cirrhosis and correlates with minimal hepatic encephalopathy. *J. Hepatol.* 41, 49-54.
- Rose,C., Michalak,A., Pannunzio,M., Chatauret,N., Rambaldi,A., and Butterworth,R.F. (2000). Mild hypothermia delays the onset of coma and prevents brain edema and

extracellular brain glutamate accumulation in rats with acute liver failure. *Hepatology* 31, 872-877.

Rose,C., Ytrebo,L.M., Davies,N.A., Sen,S., Nedredal,G.I., Belanger,M., Revhaug,A., and Jalan,R. (2007). Association of reduced extracellular brain ammonia, lactate, and intracranial pressure in pigs with acute liver failure. *Hepatology* 46, 1883-1892.

Rovira,A., Cordoba,J., Sanpedro,F., Grive,E., Rovira-Gols,A., and Alonso,J. (2002). Normalization of T2 signal abnormalities in hemispheric white matter with liver transplant. *Neurology* 59, 335-341.

Runyon,B.A., Squier,S., and Borzio,M. (1994). Translocation of gut bacteria in rats with cirrhosis to mesenteric lymph nodes partially explains the pathogenesis of spontaneous bacterial peritonitis. *J. Hepatol.* 21, 792-796.

Runyon,B.A., Sugano,S., Kanel,G., and Mellencamp,M.A. (1991). A rodent model of cirrhosis, ascites, and bacterial peritonitis. *Gastroenterology* 100, 489-493.

Schlag,M.G., Hopf,R., and Redl,H. (2001). Serial recording of sensory, corticomotor, and brainstem-derived motor evoked potentials in the rat. *Somatosens. Mot. Res.* 18, 106-116.

Schomerus,H., Hamster,W., Blunck,H., Reinhard,U., Mayer,K., and Dolle,W. (1981). Latent portasystemic encephalopathy. I. Nature of cerebral functional defects and their effect on fitness to drive. *Dig. Dis. Sci.* 26, 622-630.

Servin,F., Cockshott,I.D., Farinotti,R., Haberer,J.P., Winckler,C., and Desmonts,J.M. (1990). Pharmacokinetics of propofol infusions in patients with cirrhosis. *Br. J. Anaesth.* 65, 177-183.

Shah,N.J., Neeb,H., Kircheis,G., Engels,P., Haussinger,D., and Zilles,K. (2008). Quantitative cerebral water content mapping in hepatic encephalopathy. *Neuroimage.* 41, 706-717.

Shaw,P.J., and Eggett,C.J. (2000). Molecular factors underlying selective vulnerability of motor neurons to neurodegeneration in amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurol.* 247 *Suppl 1*, I17-I27.

Stravitz,R.T., and Larsen,F.S. (2009). Therapeutic hypothermia for acute liver failure. *Crit Care Med.* 37, S258-S264.

Szerb,J.C., and Butterworth,R.F. (1992). Effect of ammonium ions on synaptic transmission in the mammalian central nervous system. *Prog. Neurobiol.* 39, 135-153.

Tarter,R.E., Hegedus,A.M., Van Thiel,D.H., Schade,R.R., Gavalier,J.S., and Starzl,T.E. (1984). Nonalcoholic cirrhosis associated with neuropsychological dysfunction in the absence of overt evidence of hepatic encephalopathy. *Gastroenterology* 86, 1421-1427.

- Traber,P.G., Dal Canto,M., Ganger,D.R., and Blei,A.T. (1987). Electron microscopic evaluation of brain edema in rabbits with galactosamine-induced fulminant hepatic failure: ultrastructure and integrity of the blood-brain barrier. *Hepatology* 7, 1272-1277.
- van der Staay,F.J., Arndt,S.S., and Nordquist,R.E. (2009). Evaluation of animal models of neurobehavioral disorders. *Behav. Brain Funct.* 5, 11.
- van Niekerk,J.L., and Koopman,J.P. (1986). Portacaval shunt in the rabbit, a model for encephalopathy. *Z. Versuchstierkd.* 28, 7-9.
- Vaquero,J., and Butterworth,R.F. (2006). The brain glutamate system in liver failure. *J. Neurochem.* 98, 661-669.
- Vaquero,J., and Butterworth,R.F. (2007). Mechanisms of brain edema in acute liver failure and impact of novel therapeutic interventions. *Neurol. Res.* 29, 683-690.
- Wright,G., Soper,R., Brooks,H.F., Stadlbauer,V., Variappan,B., Davies,N.A., Andreola,F., Hodges,S.J., Moss,R., Davies,C., and Jalan,R. (2010). Role of aquaporin-4 in the development of brain oedema in liver failure. *J. Hepatol. in press.*
- Yengue,P., Adler,M., Bouhdid,H., Mavroudakis,N., Gelin,M., and Bourgeois,N. (2001). Hepatic myelopathy after splenorenal shunting: report of one case and review of the literature. *Acta Gastroenterol. Belg.* 64, 231-233.
- Ytrebo,L.M., Kristiansen,R.G., Maehre,H., Fuskevag,O.M., Kalstad,T., Revhaug,A., Cobos,M.J., Jalan,R., and Rose,C.F. (2009). L-ornithine phenylacetate attenuates increased arterial and extracellular brain ammonia and prevents intracranial hypertension in pigs with acute liver failure. *Hepatology* 50, 165-174.
- Zandieh,S., Hopf,R., Redl,H., and Schlag,M.G. (2003). The effect of ketamine/xylazine anesthesia on sensory and motor evoked potentials in the rat. *Spinal Cord.* 41, 16-22.
- Zentner,J., Thees,C., Pechstein,U., Scheufler,K.M., Wurker,J., and Nadstawek,J. (1997). Influence of nitrous oxide on motor-evoked potentials. *Spine* 22, 1002-1006.
- Zimmermann,C., Ferenci,P., Pifl,C., Yurdaydin,C., Ebner,J., Lassmann,H., Roth,E., and Hortnagl,H. (1989). Hepatic encephalopathy in thioacetamide-induced acute liver failure in rats: characterization of an improved model and study of amino acid-ergic neurotransmission. *Hepatology* 9, 594-601.
- Zwingmann,C., Chatauret,N., Leibfritz,D., and Butterworth,R.F. (2003). Selective increase of brain lactate synthesis in experimental acute liver failure: results of a [H-C] nuclear magnetic resonance study. *Hepatology* 37, 420-428.