



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA

INSTITUTO DE FISILOGIA CELULAR

"ESTUDIO MULTIDISCIPLINARIO DE ALGUNAS
ALTERACIONES CEREBRALES EN UN MODELO
DE ENCEFALOPATIA HEPATICA
EXPERIMENTAL"

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
DOCTOR EN INVESTIGACION
BIOMEDICA BASICA

P R E S E N T A :

MAURICIO DIAZ MUNOZ

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1988



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

- INDICE -

Presentación y Organización	1
Introducción	3
La encefalopatía hepática como una alteración homeostática - homeorrética del organismo	6
Encefalopatía hepática: Un enfoque moderno a un antiguo problema de salud. CIENCIA, en prensa.	10
Regional brain GABA metabolism and release during hepatic coma produced in rats chronically treated with carbon tetrachloride. Neurochemical Research <u>13</u> :37-44. 1988.	50
Glutamate decarboxylase inhibition and vitamin B ₆ metabolism in brain of cirrhotic rats chronically treated with carbon tetrachloride. Journal of Neuroscience Research <u>20</u> :376-382. 1988.	59
Functional changes of brain mitochondria during experimental hepatic encephalopathy. Enviado a Biochemical Pharmacology.	67
Caracterización de 2 parámetros conductuales y su modificación por transplantes de tejido cerebral fetal en ratas cirróticas.	92
Discusión General	107
Mecanismos implicados en la generación del estado comatoso	107
Conclusiones	109
Bibliografía	114

- PRESENTACION Y ORGANIZACION -

El presente trabajo representa un esfuerzo por abordar desde un punto de vista de investigación básica un problema de salud de urgente solución práctica. No aceptamos una división tajante y excluyente entre estas dos acepciones cuyos principios y fines se entremezclan y nutren uno a otro sin cesar. Ya que estamos conscientes de que el uso de modelos experimentales en animales de laboratorio constituye un eslabón que, aunque alejado del ejercicio clínico, permite el estudio y caracterización en condiciones controladas de las alteraciones fisiológicas presentes en un proceso patológico. Este conocimiento, que es el fruto de la investigación en su más pura esencia, determina, ya sea a mediano o a largo plazo, los avances constantes de la ciencia médica y, por otro lado, nos deja avizorar una pequeña fracción de como se organiza la materia en la constitución de lo que se conoce como realidad. Cuando se realiza esta experiencia en el estudio del sistema nervioso, el esfuerzo resulta doblemente recompensante, ya que, sumado a la fascinación del descubrimiento de nuevas relaciones entre los componentes que conforman el conglomerado de la materia más compleja en el universo conocido, como es el cerebro, nos permite asomarnos, para tratar de entender aunque sea superficialmente y de manera indirecta, el sustrato donde reside nuestra esencia de especie biológica, nuestra humanidad.

Esta tesis esta constituida de la siguiente forma : en primer término se mencionan algunos conceptos que resaltan el desequilibrio homeostático-homeorrético implicado en la

encefalopatía hepática. A continuación se incluyen los artículos que han sido publicados o enviados a publicación en revistas especializadas del extranjero o nacionales. Es aquí donde está contenida la mayor parte de los resultados experimentales obtenidos durante el desarrollo del proyecto de investigación. Además, en esta sección se detallan también los resultados conseguidos en la parte del proyecto en donde se emplearon trasplantes de tejido renal para caracterizar ciertas alteraciones conductuales detectadas en los animales cirróticos. En seguida se presenta una pequeña sección que revisa los probables mecanismos de la generación del estado comatoso y, finalmente, se resumen con las conclusiones generales de todo el proyecto. Cabe mencionar que el orden en que fueron colocados los artículos en la parte central de esta tesis no corresponde a la secuencia cronológica con la que fueron realizados. El artículo de revisión aceptado en la revista CIENCIA aparece en primer término a pesar de que fue el tercero en elaborarse. Esto se debe a que por su carácter general de revisión es más conveniente que aparezca a modo de información introductoria, por lo que los conceptos, términos e ideas enunciados en la mencionada publicación se manejarán libremente en el resto del trabajo. Por lo demás, los otros 3 artículos, 2 de ellos aceptados en revistas internacionales y el otro ya enviado, conservan el orden temporal de su realización.

- INTRODUCCION -

Homeostasis y Homeorresis.

En 1929, W.B. Cannon introdujo el término homeostasis para definir los mecanismos fisiológicos mediante los cuales el organismo mantiene un equilibrio dinámico entre su medio interno y las constantes fluctuaciones del medio que lo rodea. Esta condición aparece en respuesta a dos tipos de situaciones: a) cuando el organismo encuentra e identifica condiciones de peligro; o bien b) cuando se expone a un ambiente extremo (1).

En 1955, H. Selye postuló que estos mecanismos son parte del síndrome general de adaptación (SGA), el cual se presenta como el resultado de la exposición repetida del organismo a medios ambientes extremos o bien a otro tipo de agresor o demanda crónica. Este autor considera al estrés como la respuesta o "esfuerzo" fisiológico del organismo para satisfacer o adaptar su(s) función(es) a la demanda impuesta por un estímulo o agresor crónico.

El SGA se compone de tres fases consecutivas:

- a) Reacción de alarma. Se define como la suma de todos los fenómenos no específicos que se desencadenan por la exposición a un estímulo, el cual afecta prácticamente a todo el organismo y en la que cualitativa y cuantitativamente el organismo no se adapta.
- b) Estado de resistencia. Se considera como la resultante de todas las reacciones sistémicas que se manifiestan por la

exposición prolongada a un estímulo. en la que el organismo ha adquirido adaptación.

c) Estado de agotamiento. Este representado por la suma de todas las reacciones sistémicas inespecíficas que se desarrollan de manera tardía y como resultado de una prolongada exposición al estímulo. y en el cual la adaptación desarrollada previamente no puede mantenerse indefinidamente.

Actualmente se reconoce que asociados a los mecanismos homeostáticos. existen otros mecanismos no generalizados que permiten al organismo alcanzar un nuevo equilibrio dinámico cuando se encuentra en un estado de estrés crónico moderado. Este estrés o esfuerzo del organismo puede presentarse tanto en respuesta a demandas externas. vgr., exposición a condiciones ambientales desfavorables. como a demandas funcionales internas. vgr., crecimiento. reproducción. gestación. lactancia o generación y desarrollo de estados patológico.

Al conjunto o manifestación de estos mecanismos se le conoce como respuesta homeorrética o de adaptación metabólica. y se caracteriza por cambios en el flujo o dirección de la energía disponible por el organismo. la cual es redistribuida hacia funciones prioritarias en un momento específico. Así. la homeorresis se ha definido como "los cambios metabólicos coordinados que ocurren en los tejidos del organismo para mantener un estado fisiológico y específico prioritario" (2). Además. en la actualidad se sabe que la instalación y expresión final de estos procesos fisiológicos de adaptación metabólica dependen en gran medida del período ontogénico por el cual transcurre el organismo. así como de la naturaleza. magnitud y

duración del estímulo (3).

Bauman y Currie (1980) consideran 2 tipos de regulación en la fisiología de los organismos: la homeostática y la homeorrética. Estos investigadores consideran que el control homeostático involucra cambios metabólicos a corto plazo para lograr el mantenimiento del equilibrio fisiológico o bien las condiciones constantes en el medio interno, mientras que el control homeorrético proporciona una regulación crónica. De manera general, se postula que el control de los puntos de ajuste metabólicos y fisiológicos de los mecanismos homeostáticos está sujeto al control homeorrético.

Los fenómenos que determinan que se mantenga constante el valor de algunos parámetros en una situación fisiológica determinada (por ejemplo, la tensión de oxígeno y el pH de la sangre) son bien conocidos desde hace mucho tiempo. La situación es generalmente descrita como una homeostasis. En cambio, los procesos que tienden a amortiguar trayectorias epigenéticas, aunque en apariencia son similares, corresponden a un contexto más general, donde aquello que está siendo mantenido constante no es un parámetro aislado, sino un modo de cambio a lo largo del tiempo, es decir, una trayectoria. La situación queda así descrita, por esta razón, como una homeorresis: cambio estabilizado, más bien que estado estabilizado.

- LA ENCEFALOPATIA HEPATICA COMO UNA ALTERACION HOMEOSTATICA -
HOMEORRETICA DEL ORGANISMO -

El mecanismo fisiopatogénico preciso de la encefalopatía hepática (EH) es aun incierto. Esto se debe a la comprensión inadecuada de los mecanismos neuroquímicos y neurofisiológicos de las diferentes estructuras del cerebro que regulan los estados de conciencia. Además, la enorme heterogeneidad de las estructuras del sistema nervioso central hacen extremadamente complicado la correlación entre las manifestaciones de los procesos fisiológicos cerebrales con sus sustratos físicos regionalizados. Sin embargo, para tratar de comprender los mecanismos probables de la EH, se puede aceptar que el estado de conciencia o el funcionamiento cerebral normal de un individuo necesita lo siguiente:

- a) Integridad anatómica de las estructuras nerviosas.
- b) Producción suficiente de energía.
- c) Transmisión sináptica normal.

La alteración de alguno de estos factores puede dar como consecuencia una perturbación de la función cerebral.

En el curso de la disfunción del órgano hepático, ya sea en su forma aguda o crónica, se presentan una serie de alteraciones en la fisiología general del individuo. Una de las más trascendentes es la serie de modificaciones metabólicas y neuroquímicas que comprometen el funcionamiento del sistema nervioso central, y que deben jugar un papel decisivo en la patogénesis de la EH.

En este sentido, ya se ha documentado de una manera amplia la relación, mutua y reciproca, entre el cerebro y el tracto

digestivo. Algunos ejemplos que ilustran dicha relación son los siguientes:

a).- La interacción hepato-cerebral en la regulación del metabolismo de la glucosa, ejemplificada por el papel del hipotálamo y sus conexiones al sistema nervioso autónomo en la síntesis y degradación del glucógeno hepático. La glucógeno fosforilasa se activa en respuesta a la estimulación del hipotálamo ventral y del sistema nervioso simpático, mientras que la glucógeno sintetasa se activa por la estimulación del hipotálamo lateral y del sistema nervioso parasimpático (4).

b).- La disminución en la hepatotoxicidad del CCl₄ cuando es seccionada la médula espinal de ratas tratadas con el derivado halogenado (5).

c).- El importante papel que desempeña el hígado en el control del metabolismo nitrogenado del cerebro. Esta situación fisiológica radica en que el funcionamiento del ciclo de la urea ocurre, casi de forma única en el órgano hepático. Esto explica que en casos de disfunción hepática grave, el manejo del amonio se vea comprometido en el organismo, originando que este metabolito incremente sus niveles en la circulación (hiperamonemia). Existe literatura que detalla los efectos nocivos que el ión amonio genera a nivel del sistema nervioso, siendo los más importantes los siguientes (6):

1).- Un efecto inhibitorio directo sobre la membrana neuronal, que altera la transferencia de electrolitos y agua.

2).- Un cambio en la lanzadera mitocondrial de malato-aspartato, con un subsecuente incremento de la relación NAD:NADH en el

espacio mitocondrial, lo que repercute en una disminución del glutamato y el aspartato en este compartimento (7).

3).- Una disminución en el tallo cerebral de los parámetros energéticos (ATP y fosfocreatina). Posiblemente como resultado de las modificaciones en el NADH mitocondria (8).

d).- La hiperamonemia trae como consecuencia una modificación en el metabolismo de la glutamina cerebral, ya que la síntesis de este aminoácido representa el esfuerzo que el sistema nervioso realiza para detoxificar el amonio que le es nocivo. La enzima encargada de formar a la glutamina, la glutamina sintetasa, es una enzima mitocondrial que se localiza de manera preferente en los astrocitos. En pacientes con EH es consistente la observación de un incremento importante de glutamina en el líquido cefalorraquídeo, así como del cetoalutamarato, el cual es un producto de transaminación de la glutamina (9).

e).- En el hígado se ha reportado la presencia de receptores a prolactina, hormona de crecimiento y estrógenos. Las dos primeras hormonas son liberadas por el eje hipotálamo-hipofisario y su presencia repercute en el metabolismo hepático de diversas formas, siendo las principales una acción reguladora de los niveles de electrolitos, por parte de la prolactina y la inducción de la formación de somatomedina por la hormona de crecimiento. Además de estos hechos, existen evidencias de que los receptores mencionados se encuentran bajo modulación central, ya que los niveles de hormonas hipofisarias regulan el número de los mencionados receptores en el hígado.

Como es posible apreciar de los ejemplos mencionados, el hígado y el sistema nervioso se encuentran en estrecha relación

en el concierto homeostático - homeorrético que caracteriza la fisiología normal de un organismo. Esta relación enfatiza los papeles que clásicamente se le asignan a estos órganos, el hígado como responsable de la cantidad y calidad de los componentes que encontramos en la economía, y el cerebro como sistema rector que comanda la interrelación del organismo con el medio ambiente. Se hace así evidente que el funcionamiento de los circuitos neuronales es altamente dependiente del estado general del organismo y por lo tanto se verá comprometido en condiciones alteradas del tracto digestivo en general y del hígado en un sentido más particular.

Las alteraciones que se presentan en el sistema nervioso durante la falla hepática son temporales y totalmente dependientes del estado de insuficiencia hepática que presente el organismo, ya sea de manera aguda o crónica. Este hecho quedó demostrado por el éxito que se alcanzó en revertir los síntomas y los signos de la encefalopatía hepática en un paciente que fue sometido a trasplante de hígado (10). Esto confirma la reversibilidad de la encefalopatía portosistémica y sugiere fuertemente que el mal funcionamiento del cerebro se basa de manera primaria en productos derivados de tejidos periféricos, los cuales afectan primordialmente el metabolismo neuronal y glial. La pregunta y la incógnita que queda por despejar es, entonces, cómo es el desarrollo y la implantación del mencionado proceso y como las células del sistema nervioso responden y tratan de adaptarse a esta agresión crónica.

T R A B A J O 1

" ENCEFALOPATIA HEPATICA : UN ENFOQUE MODERNO A

UN ANTIGUO PROBLEMA DE SALUD "

CIENCIA

Revista de la
Academia de la Investigación Científica
Apartado postal 69-692, D4460 México, DF
Tel 686-0322, ext 506

12 DE ENERO DE 1986


M en IBB MAURICIO DIAZ MUÑOZ
DEPARTAMENTO DE NEUROCIENCIAS
INSTITUTO DE FISILOGIA CELU-
LAR, UNAM
APARTADO POSTAL 70-600
04510 MEXICO, D F

Estimado M en IBB Díaz Muñoz:

Por medio de la presente tengo el agrado de informarle que la versión modificada de su artículo "Encefalopatía Hepática: Un enfoque moderno a un antiguo problema de salud" ha sido aceptado para su publicación en la revista Ciencia y aparecerá en el Volumen 39-3. Para poder proceder a la edición del mismo, mucho le agradecería nos haga llegar una ficha biográfico-académica de usted.

Sin otro particular, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

Atentamente


DR. JULIO RUBIO OCA
Director Científico

gam.

ENCEFALOPATIA HEPATICA :

**UN ENFOQUE MODERNO A UN ANTIGUO PROBLEMA
DE SALUD.**

HEPATIC ENCEPHALOPATHY:

A NEW VIEW FOR AN OLD HEALTH PROBLEM.

**M en IBB. Mauricio Díaz Muñoz
Departamento de Neurociencias
Instituto de Fisiología Celular.
Universidad Nacional Autónoma de México.
Apartado Postal 70-600, 04510-México.
D. F. México.**

RESUMEN.

La encefalopatía hepática es un síndrome que se presenta en pacientes con insuficiencia hepática y se produce por la conjunción de factores aún no bien entendidos. En el presente trabajo se mencionan los diferentes tipos - que esta enfermedad presenta y se hace una revisión de los posibles factores patogénicos que participan en el desarrollo de la misma. Por otra parte, se comentan algunas de las tendencias que actualmente guían a los grupos de trabajo básico-clínico en sus perspectivas por dilucidar los mecanismos cerebrales responsables de la encefalopatía hepática.

ABSTRACT.

Hepatic encephalopathy is a characteristic syndrome in patients with liver failure, and it is produced - by both, factors and elements, largely unknown. In the present work, the different hepatic encephalopathy types, are analysed, and the possible pathogenic mechanisms of this - disease are reviewed. Besides, some comments are made on the present tendencies of research regarding the brain mechanisms underlying hepatic encephalopathy.

Existe un gran número de trastornos de la salud que cursan con una sintomatología caracterizada por alteraciones en las capacidades de relación, emotivas y cognoscitivas, y en general con todas aquéllas relacionadas con la conciencia. Este tipo de padecimientos que a veces se acompañan con movimientos y posturas corporales modificadas, -- así como por estados de estupor o de pérdida de la conciencia, se les denomina con el nombre genérico de encefalopatías.

Una definición operativa como la mencionada en el párrafo anterior no está exenta de confusiones, ya que los términos conciencia, estupor, inconciencia y otros relacionados, han sido empleados con significados tan diferentes que es casi imposible evitar la ambigüedad en su uso. -- La palabra conciencia es la más difícil de todas. William Jones, famoso psiquiatra inglés, hizo notar que todo el mundo sabía lo que era conciencia hasta que intentaba definirla. Para los psicólogos, la conciencia denota el estado de clara percepción de sí mismo, en el contexto de un proceso cognoscitivo. Para los médicos, hombres prácticos en su mayoría, el término conciencia define la capacidad de darse cuenta de lo que nos rodea. Esta definición tan concreta -- tiene otra ventaja, la de que la palabra inconciencia significa exactamente lo opuesto: un estado en el que el individuo no se da cuenta del medio, o bien, la suspensión de las actividades mentales mediante las cuales el hombre se perca

ta de lo que lo rodea.

Estos conceptos nos permiten ubicar el conjunto de enfermedades relacionadas con la encefalopatía. Por ejemplo, el sueño es un estado de inactividad física y mental - del cual el paciente puede ser despertado para adquirir la conciencia normal. La persona dormida muestra pocos indicios de estar conciente de sí misma o de su medio, y en este aspecto se le considera inconciente. No obstante, difícil del paciente con encefalopatía en que puede aún responder a estímulos no acostumbrados, es capaz de mostrar alguna forma de actividad como los sueños.

En contraste, el estupor y el coma pueden ser definidos, el primero como un estado en el cual la actividad física y mental está reducida a un mínimo, y el segundo como un estado en que semeja el sueño, pero al mismo tiempo - hace al sujeto incapaz de sentir o de responder en forma -- adecuada a cualquier estímulo externo o a sus necesidades - internas. El coma se distingue del sueño en que el paciente no se puede despertar, y del mutismo acinético y de los síndromes de "trabamiento", porque en ellos el paciente aún recibe los estímulos, pero no es capaz de reaccionar.

El coma y los otros signos de encefalopatía, no constituyen propiamente una entidad patológica, sino que -- siempre son una expresión sintomática de alguna enfermedad. En este sentido, algunas de las enfermedades metabólicas -- que se manifiestan con un síndrome de confusión, estupor o

coma episódicos con la hipoxia, la hipercapnia, la hipoglu-
cemia, la hiperglicemia, la acidosis, la uremia, la hipo e
hipernatremia, la hipo e hipercalemia, la enfermedad de --
Addison, enfermedades pancreáticas, enfermedades intestina-
les, la enfermedad de la orina del jarabe de arce, la amino-
aciduria arginosuccínica, la hiperglicinemia, la citruline-
mia, la acidemia isovalérica (en los niños), la aciduria me-
tilmalónica y la insuficiencia hepática, la cual se analiza-
rá con más detalle en el presente trabajo.

Los tipos de enfermedades que cursan con un esta-
do comatoso están representados en el cuadro I.

ENCEFALOPATIA HEPATICA.

La encefalopatía hepática es un síndrome neurológico que se desarrolla de manera secundaria a una enfermedad hepática o a una derivación porto-sistémica de la circulación. La naturaleza de la relación entre el hígado y el funcionamiento cerebral permanece sin una explicación satisfactoria, aunque la asociación entre daño hepático y los disturbios neurológicos que le siguen fue reconocida desde tiempos remotos por Hipócrates (460-370 A.C.). Algunas de las aportaciones que en las últimas décadas se han realizado en el campo de la clínica experimental son las siguientes: En 1887, el investigador ruso Nikolai Eck realizó una anastomosis portocava (fístula de Eck) en perros en un intento por mejorar la ascitis. En 1893, Hahn y su grupo produjeron un cuadro de encefalopatía con perros con fístula de Eck, al alimentarlos con una dieta rica en carne. Balo y Korpassky en 1932, observaron un cuadro similar al administrar cloruro de amonio a perros con fístula de Eck, y dos años después se confirmó la elevación espontánea del amonio sanguíneo en este modelo. Estudios realizados en la Clínica Mayo de 1920 a 1924 establecieron -- que la hepatectomía total en perros originaba un estado comatoso. Blakemore, en 1945, introdujo la anastomosis portocava en la clínica, en un intento de tratamiento de la hipertensión portal. Poco después, Adams y Foley, observaron

el síndrome neurológico asociado con la cirrosis, y Gaustad informó de un síndrome similar originado por sangrado gastrointestinal masivo o por la administración de urea o de protefina extraída de la leche, en pacientes con insuficiencia hepática originada por cirrosis alcohólica. El mismo cuadro clínico se pudo inducir, por el mismo grupo experimental, al administrar una resina de recambio catiónico que contenía amonio. McDermott y Adams en 1955, y Havens y Child un año después, reportaron manifestaciones de toxicidad con ingesta de carne en pacientes cirróticos que habían sufrido una derivación porto-cava quirúrgica.

El reconocimiento de la encefalopatía hepática depende de cuatro elementos principales: 1) El enfermo debe tener datos de hepatopatía avanzada, extensas derivaciones porto-sistémicas colaterales o ambos datos. La hepatopatía puede ser aguda o grave como en la hepatitis por virus, tóxica o fulminante, o crónica avanzada como en la cirrosis. Las desviaciones portosistémicas que permiten que una porción importante de la sangre de la porta sobrepase el hígado pueden ser espontáneas (colaterales naturales) o quirúrgicas (anastomosis porto-cava). 2) Los trastornos de la atención y mentales son característicos, y el olvido y la confusión progresan hasta el estupor, y finalmente, el coma profundo. 3) Las alteraciones mentales se acompañan de combinaciones cambiantes de signos neurológicos, que incluyen rigidez, hiperreflexia, signos extensores plantares y, finalmente, convulsio

nes. A menudo se observa en el precoma y en la encefalopatía hepática avanzada un "temblor alateante" característico (asterixis), un cambio no rítmico de posición en las extremidades, la cabeza y el tronco que no puede ser puesto de manifiesto en presencia de coma. 4) Muchos enfermos con los datos clínicos de la encefalopatía hepática tienen patrones electroencefalográficos con ondas lentas, simétricas, de alto voltaje. El fetor hepaticus, un olor característico del aliento y la orina, se nota en pacientes con coma hepático y en los que tienen una circulación colateral extensa.

Se han reconocido algunas variantes clínicas del síndrome "clásico" del coma hepático. La degeneración crónica progresiva hepatocerebral, que aparece en enfermos con hepatopatía estable o con anastomosis porto-cava, se caracteriza por una declinación lenta en las funciones mentales superiores, ataxia cerebelosa, temblor y coreoatetosis. Los signos aislados de mielopatía, entre ellos la espasticidad y la hiperreflexia de las piernas, pueden anteceder a los otros elementos de la encefalopatía hepática por varios meses.

En nuestro país, la principal entidad patológica que acompaña a la encefalopatía hepática es la cirrosis. Sin entrar en detalle sobre la problemática social y económica que subyace atrás de esta enfermedad, mencionaremos brevemente algunos datos sobre la biología de este padecimiento.

La cirrosis por definición, es un padecimiento - crónico y la mayoría de los autores consideran que un estado avanzado de esta enfermedad es irreversible. Las alteraciones histológicas que caracterizan a esta entidad patológica son fibrosis y formación de nódulos regenerativos. Se conocen muchas causas de cirrosis; no obstante, suele ser - difícil establecer con certeza una relación de causa y efecto. El diagnóstico definitivo de cualquier tipo de cirrosis debe hacerse tomando en cuenta:

- 1.- Circunstancias clínicas individuales.
2. Información epidemiológica.
3. Pruebas de laboratorio específicas.
4. Biopsia hepática, cuando pueda obtenerse.

Entre las causas bien establecidas que generan cirrosis están: el consumo crónico de grandes cantidades - de etanol, oclusiones biliares, operaciones de desviación intestinal, trastornos metabólicos como la galactosemia, - la hemocromatosis o la enfermedad de Wilson, tóxicos y fármacos como la alfametildopa, el metotrexato y la oxifenisatina, hepatitis viral y la esquistosomiasis.

La clasificación de las diferentes formas de cirrosis se hace en términos del aspecto macroscópico de los nódulos hepáticos, y se valora la intensidad y la patología en función de las alteraciones histológicas observadas con microscopio de luz.

Los principales tipos de cirrosis son:

- a) Cirrosis micronodular o alcohólica.
- b) Cirrosis macronodular o posnecrótica.

En los países occidentales, la cirrosis alcohólica es la forma más común de esta enfermedad. Un alto porcentaje de las personas que abusan crónicamente del alcohol -- contraen cirrosis. Estudios epidemiológicos han establecido que en la aparición del problema, es más importante la cantidad que el tipo de bebida alcohólica. Por lo común, la -- aparición de cirrosis está precedida del consumo aproximado de 300 mililitros de una bebida de alta graduación diariamente a lo largo de por lo menos 10 años.

La insuficiencia hepática que acompaña a la cirrosis y a otros tipos de patologías hepáticas, se pone de manifiesto por datos de laboratorio que ayudan a la definición de este cuadro clínico. En el Cuadro 14, se resumen algunos de los parámetros principales que se ven alterados durante la insuficiencia hepática

La insuficiencia hepática se puede clasificar según su severidad en tres niveles, según Child. En el primero o de insuficiencia hepática leve, no se presentan signos aparentes de encefalopatía y hay ausencia de ascitis, los datos de laboratorio no se muestran alterados y la nutrición del paciente es por lo general óptima. En el segundo nivel, empieza a delinearse con claridad la encefalopatía, así como el proceso ascítico, los datos de laboratorio tien

den a la anormalidad de una manera severa, pero los hábitos alimenticios del paciente continúan siendo satisfactorios. En la insuficiencia hepática grave se presentan los signos más extremos de la encefalopatía, como son el estupor y el coma, la ascitis se vuelve difícil de controlar, los datos de laboratorio muestran desviaciones muy marcadas de la normalidad, estando este estadio caracterizado por una nutrición deficiente por parte del enfermo.

La amplia gama de manifestaciones de la encefalopatía hepática va desde alteraciones sutiles de la conducta y la conciencia hasta el coma profundo. Se han jerarquizado los diferentes grados de encefalopatía hepática de la manera siguiente:

- Grado 1: Funcionamiento psicomotor alterado; ligera falta de conciencia; euforia o apatía; atención disminuida; irritabilidad; inquietud.
- Grado 2: Letargo; cambios de personalidad; alteraciones neurales leves (especialmente asterixis).
- Grado 3: Confusión; desorientación; estupor.
- Grado 4: Coma.

TIPOS DE ENCEFALOPATIA HEPATICA.

El síndrome neuropsiquiátrico observado en pacientes con cirrosis y con anastomosis porto-sistémica es actualmente referido como Encefalopatía Porto-Sistémica, - una entidad que es clínica y probablemente patogénicamente diferente a la encefalopatía por Falla Hepática Fulminante.

La encefalopatía porto-sistémica es una patología que se desarrolla de una manera crónica, necesitando la mayor parte de las veces de años enteros para que la lesión hepática se traduzca en alteraciones motoras o de la conciencia, por lo que se acepta que su establecimiento es gradual. Para que se manifieste necesita la presencia de factores externos, tales como fiebre, septicemia, hemorragias del tracto digestivo, aumento en la carga de proteína, insuficiencia renal, sedantes, alcohol u otros hepatotóxicos, - alcalosis metabólica, etc. Cuando llega a presentarse el coma, éste es usualmente moderado y responde de una manera casi siempre favorable a la terapia. Esta terapia consiste principalmente en la valoración frecuente de electrolitos y estado metabólico del paciente, así como una disminución en el contenido proteínico de la dieta. Algunos tratamientos que han dado resultados favorables consisten en la administración de compuestos cuya acción primaria es evitar la producción de amonio por parte de la flora intestinal; entre los más empleados están la lactulosa y la neomicina.

La encefalopatía por falla hepática fulminante es consecuencia de una pérdida de la función hepática que se caracteriza por un desarrollo rápido y severo, presentándose los signos de encefalopatía al primer o segundo mes de comenzada la enfermedad. Entre las principales causas de la falla hepática fulminante se encuentran la necrosis masiva hepática producida por infecciones virales, principalmente la hepatitis tipo B, la generada por drogas y tóxicos entre los que se encuentran el halotano, el acetaminofen, el fósforo, la metildopa, y otros más, también la necrosis isquémica producida por oclusión circulatoria o shock. Otros factores etiológicos que se asocian a la falla hepática fulminante son la degeneración grasa causada por la administración de tetraciclina o valproato, aquella asociada con el síndrome de Reye's, así como el hígado esteatótico que en ocasiones se desarrolla en las mujeres embarazadas. A diferencia de la encefalopatía porto-sistémica, la asociada a la falla hepática fulminante no tiene un factor precipitante identificado, aunque hay consenso de que éste debe ser de naturaleza endógena. El coma asociado a este tipo de encefalopatía es frecuentemente severo y muy pobre la respuesta a las medidas terapéuticas de emergencia, por lo que este tipo de afección es de mal pronóstico.

No se conoce terapéutica específica para la falla hepática fulminante. Sin embargo, la elevada tasa de -

mortalidad puede disminuir gracias a la asistencia continua de sostén en una unidad de cuidado intensivo. Se recomienda que los casos de encefalopatía se traten enérgicamente con restricción total de proteínas y administración de lactulosa, neomicina o ambas.

Aunque la encefalopatía portosistémica es diferente en su etiología, velocidad de implantación y secuelas neurológicas, de la encefalopatía asociada a falla hepática fulminante, ambas entidades se caracterizan clínicamente -- por cambios en la personalidad y en la conducta, capacidad intelectual disminuida, actividad neuromuscular alterada, y problemas en la conciencia, siendo el coma indistinguible -- entre las dos formas de encefalopatía hepática. De esto se concluye que diferentes causas de insuficiencia hepática no dan lugar a signos patognómicos o síntomas particulares exclusivos.

MODELOS EXPERIMENTALES DE ENCEFALOPATIA HEPATICA.

En el transcurso de los años se han generado varios modelos experimentales en animales de laboratorio para tratar de estudiar dos tipos de encefalopatía hepática reconocidos en la clínica, la falla hepática fulminante y la encefalopatía porto-sistémica. Esta manera de abordar el estudio de la encefalopatía hepática emerge como una necesidad ineludible para tratar de explicar los mecanismos que en la intimidad del cerebro se fraguan para producir la enfermedad, al no poder, por razones éticas obvias, someter a pacientes humanos a protocolos experimentales. La actividad experimental cuenta con la ventaja, además, de incidir en algunas preguntas básicas de las neurociencias, como son las que versan sobre la naturaleza de la conciencia y de la coordinación homeostática en los seres vivos.

Para que un modelo experimental sea adecuado, es necesario que reproduzca lo más fielmente posible la enfermedad que se trata de estudiar. En el caso de la encefalopatía hepática, éstos han desarrollado como un interés colateral en las investigaciones sobre daño e insuficiencia hepática en situaciones experimentales que comprometen el funcionamiento normal del hígado.

Enseguida se enumeran los principales modelos experimentales que se utilizan en los dos tipos de encefalopatía hepática:

Falla Hepática Fulminante.- Este tipo de padecimiento se ha reproducido en animales de laboratorio provocando necrosis masivas del órgano hepático por la administración de diversos fármacos (Cuadro III). Entre los principales se encuentra la galactosamina, que es un carbohidrato que depleta los metabolitos energéticos del hígado, causando muerte celular y el establecimiento de un estado comatoso 3 a 4 días después de su administración, en ratas y conejos. La acetacetamida, es un compuesto que es convertido por las enzimas microsomales en un intermediario arilante que se une irreversiblemente a biomoléculas del órgano blanco, el hígado y produce daño; también se observa coma a los pocos días del tratamiento principalmente en ratas.

Encefalopatía Porto-Sistémica.- Por la naturaleza crónica de este tipo de patología, su contraparte experimental es de más larga duración que la falla hepática fulminante. De hecho, el primer intento de llevar a cabo la implantación de la enfermedad en animales experimentales, lo realizó Eck a principios de siglo, como se mencionó en la primera parte de este trabajo, al efectuar la anastomosis porto-cava en perros. Esta misma operación la reportó en el año de 1961 en rata y se consideró un modelo experimental de hipermonemia crónica. Varios grupos han demostrado que durante la anastomosis porto-cava se presentan alteraciones en la coordinación motora, así como el establecimiento de un estado comatoso al ser tratadas las ratas con una sobredosis de aceta

to de amonio presentándose estos fenómenos a las 4 -
semanas de haberse efectuado la operación. Todas estas anor-
malidades se aceptan como un signo de encefalopatía, siendo
ésta consecuencia de la insuficiencia hepática provocada --
por la intervención quirúrgica (Mindfelt et al., 1977).

Otro modelo para el estudio de la encefalopatía
porto-sistémica, lo ha desarrollado el autor al efectuar --
sus estudios de Doctorado en el laboratorio del Dr. Ricardo
Tapia en la Universidad Nacional Autónoma de México. Este -
consiste en generar un cuadro de fibrosis hepática en ratas
al ser tratadas crónicamente con tetracloruro de carbono --
(CCl₄). Este hepatotóxico ya ha sido utilizado en México y
en otras partes del mundo como un medio para provocar cirro-
sis en animales experimentales, sólo que su uso nunca se ha
bía enfocado para el estudio de la encefalopatía hepática.
Después de 20 dosis del CCl₄, las ratas manifiestan los sín-
tomas del coma al ser tratadas con una sobredosis de aceta-
to de amonio (Díaz-Muñoz y Tapia, 1987).

En Institutos y Centros de Investigación donde -
es posible mantener primates como sujetos de experimenta-
ción, se han desarrollado tratamientos de ingesta crónica -
de etanol por espacio de 8 a 10 años. El resultado es que -
los cinocéfalos presentan al final de este lapso un cuadro
muy similar la cirrosis alcohólica humana. Aunque todavía
no se han realizado estudios enfocados a la encefalopatía -
relacionada a este tipo de insuficiencia hepática, se ha --

descrito preliminarmente que los simios cirróticos desarrollan los síntomas de encefalopatía en presencia de factores desencadenantes (Feinman y Lieber, 1982).

PATOGENIA DE LA ENCEFALOPATIA HEPATICA.

La patogenia de la encefalopatía hepática es aún oscura y se encuentra sujeta a polémicas y debates aún no - conclusivos. Sin embargo, se han postulado algunos principios generales sobre las bases fisiológicas de la encefalopatía hepática.

El primero de ellos establece que esta entidad - es el resultado de alteraciones metabólicas. La evidencia - que sustenta lo anterior es la reversibilidad que en muchos casos caracteriza al estado comatoso y la carencia de anormalidades morfológicas en el sistema nervioso de los pacientes afectados, excepto en algunos casos en donde se presentan hinchamientos y deformidades de los astrocitos.

En segundo lugar, se cree que el coma hepático - posee una etiología multifactorial. Esta conclusión se basa por una parte en experimentos con animales, en los que se - ha observado que la administración de varias toxinas (que - se postulan que están presentes en el síndrome humano) causa una depresión conductual y, por otra parte, en la observación ya citada de que no hay especificidad en cuanto a -- los agentes precipitantes que originan el coma en pacientes con insuficiencia hepática.

Finalmente, tres mecanismos neuroquímicos se han propuesto como responsables de la alteración de la conciencia durante la encefalopatía hepática. Estos son: un metabolismo energético insuficiente, alteraciones en la composi--

ción de la membrana neuronal, y un funcionamiento anormal -
de la neurotransmisión.

CAMBIOS BIOQUIMICOS Y NEUROQUIMICOS EN LA ENCEFALOPATIA HEPATICA.

Entre los compuestos que se han postulado como desencadenantes de la encefalopatía y el coma hepático se encuentran los siguientes: un exceso de amonio, incremento en los niveles séricos de ácidos grasos de cadena corta, -- mercaptanos y fenoles, aparición de falsos neurotransmisores y algunos compuestos que, siendo componentes fisiológicos normales en la actividad nerviosa, sufren una alteración de su funcionamiento a consecuencia del padecimiento hepático, como son algunos neurotransmisores.

El amonio se produce principalmente por la acción de las bacterias entéricas y a partir de la glutamina. El hígado es el principal órgano encargado de detoxificar el amonio, y en condiciones de insuficiencia hepática este trabajo corre a cuenta del sistema muscular. Como el músculo no es tan eficiente en esta acción detoxificadora, el amonio en condiciones de hepatopatía llega a penetrar al sistema nervioso, donde origina las siguientes alteraciones: un efecto inhibitorio sobre la membrana neuronal al alterar el transporte de electrolitos y agua; un cambio en la relación $NAD^+/NADH$, tanto citoplásmica como mitocondrial, que conlleva una disminución de aspartato y glutamato, ambos neurotransmisores excitadores, y una disminución selectiva de la carga energética en el tallo cerebral (sistema reticular activador).

Los mercaptanos (metanetiol, etanetiol, dimetil-sulfuro) se forman a partir de la metionina por la acción de bacterias intestinales. Al igual que el amonio, los mercaptanos son destoxificados por el hígado, por lo que en condiciones de falla hepática, los niveles séricos de mercaptanos se incrementan. Hay evidencia de que los mercaptanos son destoxificados por el hígado, por lo que en condiciones de falla hepática, los niveles séricos de mercaptanos se incrementan. Hay evidencia de que los mercaptanos inhiben la ATPasa de $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ e interfieren en la transferencia de electrones mitocondrial de la células nerviosas.

Los ácidos grasos de cadena corta se producen por múltiples factores, pero es un dato consistente en la observación clínica que en muchos pacientes con coma hepático existen niveles elevados de este tipo de moléculas en la sangre. Los ácidos grasos de cadena corta pueden disminuir la fosfocreatina y el ATP en el sistema reticular activador del tallo cerebral y entonces inhibir la propagación de impulsos en el cerebro. Además, los ácidos grasos de cadena corta pueden aumentar la toxicidad del amonio, al inhibir la fijación en forma de urea en el hígado (Gazzard et al., 1975).

Entre las alteraciones metabólicas que ocurren en condiciones de deficiencia hepática está la posible generación de compuestos que pueden actuar como falsos neurotransmisores. Estos falsos neurotransmisores derivarían de los niveles séricos incrementados de fenilalanina, tirosi-

na, triptofano y metionina. Lo anterior, aunado a una disminución en los niveles séricos de aminoácidos ramificados, como la valina, leucina e isoleucina, facilitaría el paso de aminoácidos aromáticos a través de la barrera hematoencefálica, los cuales al metabolizarse darían origen a compuestos como la octopamina, que interfiere con la neurotransmisión catecolaminérgica.

Entre las publicaciones que involucran fallas en la neurotransmisión durante el coma hepático destacan las que señalan un aumento de metabolitos del triptofano como son la serotonina y el ácido quinolínic, un aumento en los niveles de aspartato y un aumento en la neurotransmisión GABAérgica (ver adelante).

ESTADO CONTEMPORANEO DE LA ENCEFALOPATIA HEPATICA EXPERIMENTAL.

No debe pensarse que la encefalopatía hepática - es una enfermedad controlada o en vía de desaparición. Aunque no recibe el caudal publicitario que algunos otros padecimientos de moda acaparan, la encefalopatía hepática, sobre todo la que permanece latente en los pacientes cirróticos, se manifiesta como un grave problema de salud en las principales ciudades del orbe. De hecho, parece pertinente recordar al gran investigador clínico Hans Zinsser, descubridor de la patogenia del tifo, quién en 1934 comentaba en relación a esa enfermedad: "... en su trágica relación con la humanidad esta enfermedad (la encefalopatía hepática), - no es menos importante que ninguna otra, ni siquiera que la peste (el sica) o el cólera (la enfermedad de Alzheimer)...". Las frases entre paréntesis son añadidos a la versión original.

Dada la situación anterior, han surgido en varias partes del mundo grupos de biomedicina, que en forma experimental tratan de desentrañar los mecanismos que subyacen a la patogenia de la encefalopatía hepática. La mayor parte de ellos utilizan los métodos experimentales que ya han sido comentados en este trabajo en animales de laboratorio, mientras que otros se han avocado a estudios analíticos en tejidos de pacientes ya fallecidos. Asimismo, es notorio que gran parte de esos equipos científicos han centrado

do sus esfuerzos inquisitivos en un estado en particular de la encefalopatía hepática, como es el estado comatoso.

A continuación mencionaremos algunos de los hallazgos más sobresalientes y las hipótesis que como consecuencia de ellos se han implementado relacionados con la encefalopatía hepática experimental en los reportes científicos de los años más recientes.

Acido gama-Aminobutírico (GABA)..- El GABA es un neurotransmisor inhibitorio en el cerebro de los mamíferos; su mecanismo de acción consiste en aumentar la conductancia al anión cloro por mediante este proceso hiperpolariza la neurona sometida a su acción.

La concentración de GABA en el cerebro es de 200 a 1000 veces mayor que la de los neurotransmisores dopamina, noradrenalina, acetilcolina y serotonina. Está ampliamente distribuido en todas las áreas cerebrales aunque algunas regiones como la sustancia negra, globo pálido, hipotálamo y tubérculos cuadrigéminos, poseen concentraciones mayores.

El precursor inmediato del GABA es el ácido glutámico, el cual puede originarse de la glutamina o del ácido alfa cetoglutarato. La conversión de glutamato a GABA se lleva a cabo por medio de la enzima glutamato descarboxilasa. El GABA se metaboliza por medio de la GABA transaminasa y es convertido a semialdehído succínico. Este último compuesto es introducido al ciclo de Krebs al transformarse a --succinato por medio de la semialdehído succínico deshidroge-

nasa. La GABA transaminasa y la deshidrogenasa del semialdehído succínico son enzimas mitocondriales, mientras que la glutaminasa y la glutamato descarboxilasa son solubles en el citoplasma neuronal.

Se ha postulado una relación estrecha entre la susceptibilidad a las convulsiones y una disminución en el funcionamiento de las neuronas GABAérgicas. Múltiples estudios han demostrado que las drogas agonistas o antagonistas GABAérgicas ejercen una acción anticonvulsivante y convulsivante, respectivamente. En este sentido, Tapia en 1983

estableció que la actividad de la GAD desempeña un papel muy importante en la regulación de la excitabilidad del sistema nervioso, mediante el acoplamiento de la síntesis y la liberación de GABA. Se acepta en la actualidad que una disminución de la actividad de la GAD casi siempre resulta en episodios convulsivos.

En relación con la encefalopatía hepática y el estado comatoso, un grupo de investigadores tanto clínicos como básicos han implicado al GABA en la etiología de esta enfermedad. Esta postulación, basada en algunos hallazgos clínicos y experimentales, puede resumirse de la siguiente manera (ver referencias de la cita Díaz-Muñoz y Tapia, 1987).

Las bacterias entéricas producen usualmente GABA, el cual pasa por la circulación portal al hígado. El órgano hepático en condiciones normales transmina al GABA y de esta manera "destoxifica" al organismo del GABA bacteriano, pero

en condiciones de falla hepática esta depuración es deficiente, por lo que los niveles de GABA en la sangre se incrementan. Asimismo, como una consecuencia del daño hepático, hay un aumento en la permeabilidad de la barrera hematoencefálica, por lo cual el GABA sistémico puede penetrar al interior del sistema nervioso, cuando en condiciones normales es incapaz de hacerlo. De esta manera el GABA accede al sistema nervioso central donde ejerce su acción inhibitoria a tal extremo que produce en el paciente un estado de coma profundo. Esta hipótesis está reforzada con las observaciones de que los receptores al GABA se presentan en un estado de alta afinidad durante el coma.

En nuestro trabajo desarrollado en el Instituto de Fisiología Celular de la UNAM, hemos encontrado nuevas evidencias que confirman la importancia del GABA durante el desarrollo de la encefalopatía y el coma hepáticos, pero -- que llevan a una conclusión opuesta a la postulación que -- acabamos de revisar. Estos hallazgos se han obtenido utilizando como modelo experimental la encefalopatía que se presenta en ratas cirróticas por la administración de CCl_4 y -- que ha sido ya comentado en secciones anteriores. Los resultados más importantes son los siguientes: durante el coma hepático se presenta una disminución generalizada de la actividad de la enzima que sintetiza el GABA, la glutamato -- descárbxilasa, en 6 diferentes regiones del encéfalo de la rata: la captación, así como la liberación de este neuro--

transmisor se ve modificada durante el estado comatoso; la manipulación farmacológica del sistema GABAérgico en las ratas cirróticas, demuestra que éstas son más susceptibles a sufrir episodios convulsivos que las ratas controles no cirróticas (Díaz y Tapia, 1987), Cuadro IV.

Los datos anteriores sugieren que el GABA puede estar implicado en la patogenia de la encefalopatía hepática, pero sería equivocado concluir que la patogenia de este complicado síndrome quedará dilucidada por la participación de este solo factor, ya que se han obtenido evidencias que demuestran que otros elementos pueden estar implicados en la etiología de la encefalopatía hepática.

Metabolitos derivados del triptofano.— Un aporte incrementado de triptofano al cerebro parece participar en la patofisiología y sintomatología de la encefalopatía hepática (Ono et al., 1978; Jellinger et al. 1978). En este sentido se han postulado varios mecanismos de toxicidad del -- triptofano, los cuales incluyen una síntesis y utilización incrementada de la 5-hidroxitriptamina (serotonina) y/o -- triptamina. Se ha reportado recientemente que el ácido quinolínico, otro derivado del triptofano, es un agonista para los receptores de aminoácidos excitadores (Stone and Perkins, 1982). Cuando este compuesto se inyecta a nivel de -- los ventrículos cerebrales promueve una gran variedad de -- efectos conductuales, incluyendo convulsiones, y cuando se

inyecta directamente en núcleos cerebrales causa lesiones - excitotóxicas típicas.

El ácido quinolífnico se ha detectado en el cerebro de varias especies como la rata, el cuyo y el conejo. Un dato de gran importancia para el presente trabajo, es -- el reportado en 1986 por Moroni et al., en el cual demuestran un aumento en el contenido cortical de ácido quinolífnico en el cerebro de ratas con anastomosis porto-cava.

Un posible mecanismo mediante el cual se relaciona el aumento de ácido quinolífnico con la encefalopatía hepática se ha delineado de la siguiente manera: el incremento en la concentración de ácido quinolífnico en los animales con anastomosis porto-cava, induce los cambios excitotóxicos que ya han sido comentados en líneas anteriores. Varias clases de neuronas son especialmente sensibles a esta clase de eventos nocivos, entre ellas las GABAérgicas y las serotoninérgicas. Como consecuencia de estos estímulos anormales, los sistemas GABAérgicos y serotoninérgicos alteran su funcionamiento normal generando cambios en la homeostasis cerebral.

Una observación clínica que refuerza el posible papel que el triptofano y sus metabolitos puedan presentar en la patogenia de la encefalopatía hepática es que el tratamiento del coma hepático con aminoácidos ramificados (valina, leucina e isoleucina), los cuales compiten con el mecanismo de transporte del triptofano a nivel cerebral, dis-

minuye la concentración de triptofano en el líquido cefalorraquídeo y en el cerebro, y mejora el estado de animales - experimentales (Smith et al., 1978) y de los pacientes humanos (Fischer et al., 1979).

Metabolismo energético y barrera hematoencefálica.- El grupo de Mans y colaboradores han obtenido resultados interesantes en relación a la utilización de glucosa cerebral, así como a la permeabilidad regional de la barrera hematoencefálica en ratas con anastomosis porto-cava (Mans et al., 1982; Mans et al., 1983). Los principales hallazgos son: la utilización de glucosa radiactiva disminuyó a las 4 y 8 semanas de la aparición. Esta disminución se presentó - en todas las regiones cerebrales estudiadas y no coincidió con la presencia o el desarrollo de alguna anomalía neurológica obvia. En el mismo modelo experimental se observó un mayor ingreso al cerebro desde tejidos periféricos de -- los siguientes aminoácidos: triptofano, fenilalanina y leucina. Los cambios fueron más aparentes en varias estructuras límbicas y en la formación reticular, mientras que el hipotálamo casi no resultó afectado.

Los datos anteriores sugieren que, en el modelo experimental de encefalopatía hepática empleado, se presenta una alteración generalizada en la captación de glucosa - en el tejido cerebral. Este fenómeno seguramente debe estar relacionado con modificaciones del metabolismo energético -

cerebral en una forma más integral. Este hecho, así como el exceso de aminoácidos neutros en el cerebro de la rata con anastomosis porto-cava, algunos de los cuales son precursores de neurotransmisores, podrían ser de importancia etiológica en la encefalopatía hepática.

Estudios con diálisis intracerebral. - Ungerstedt y su equipo de colaboradores han implementado una sofisticada técnica de diálisis intracerebral que permite la determinación de neurotransmisores en el compartimento extracelular. Este grupo de trabajo ha enfocado el uso de esta técnica para, entre otras cosas, realizar determinaciones de aminoácidos en ratas con varias semanas de haber sufrido la anastomosis porto-cava.

La versatilidad de la diálisis intracerebral ha permitido estudiar diferentes regiones del cerebro de las ratas tratadas, siendo hasta el momento el núcleo estriado y la corteza cerebral las zonas elegidas. Los resultados principales se pueden resumir de la siguiente forma (Tossman et al., 1983; Tossman et al., 1987): el aspartato, la glutamina, la metionina, la fenilalanina y la leucina se incrementaron en las dos regiones estudiadas; la glicina y la valina aumentaron sus niveles únicamente en la corteza. En los experimentos llevados a cabo en la corteza, se estudió, además de las determinaciones anteriores, los niveles de los aminoácidos después de un estímulo despolarizante por alto pota-

sio. En esta parte del trabajo se encontró un incremento en la liberación de GABA y glutamato, mientras que en las ratas operadas la valina y la metionina permanecieron sin cambio a diferencia de los animales controles. Los cambios mencionados se han tratado de correlacionar con un decremento en la actividad motora espontánea que presentan las ratas con la anastomosis porto-cava, siendo esta conducta anormal la referencia que el grupo sueco acepta como índice de encefalopatía hepática.

Estudios en tejido cerebral humano.- Una forma de abordar el problema de la encefalopatía hepática y sus estados derivados es el estudio en muestras de tejido obtenido en autopsias de pacientes fallecidos durante el coma hepático. Este tipo de trabajo, aún con las limitaciones obvias de su procedimiento, es de gran importancia, ya que nos señala algunas alteraciones generales que pueden ahondarse y clarificarse al utilizar los modelos experimentales de encefalopatía hepática con animales de laboratorio.

En este punto se han realizado varios trabajos entre los cuales cabe señalar el de Riederer y Jellinger en 1978, el de Moroni et al. reportado en 1987 y el de Butterworth et al., aún no publicado. En el primero de ellos se encontró una disminución general de dopamina, así como un aumento de serotonina y ácido 5-hidroxi-indol acético en el tallo cerebral de pacientes cirróticos que murieron durante el coma.

En el segundo reporte, utilizando la mitad del cerebro del paciente comatoso como fuente de metabolitos, el equipo ita lo-canadiense confirmó una elevación en los niveles de ácido quinolínico, que coincidió con los reportes en modelos experimentales. Finalmente, el tercer trabajo señala un incremento en el contenido de taurina en el cerebro de los pacientes autopsiados.

En resumen, el panorama actual que ofrece el estudio de la encefalopatía hepática, aunque está lejos de explicar de manera satisfactoria la etiología de este síndrome, promete una relación rica y duradera entre la investigación básica y la investigación clínica aplicada. La esencia principal de esta comunión científica está plasmada en el pensamiento del Dr. Jack Masur, el cual se encuentra en una placa en la entrada del Centro Clínico, National Institutes of Health, en Bethesda, E. U. A. y reza de la siguiente manera:

Research Increases the vitality of teaching
Teaching lifts the quality of assistance
Assistance opens new ways to research.

(La investigación incrementa la vitalidad de la enseñanza
La enseñanza eleva la calidad de la atención médica
La atención médica abre nuevos caminos a la investigación).

REFERENCIAS.

- Butterworth, RF, J Lavole, JF Giguere y GP Layrargues, Eleventh Meeting of the International Society for Neurochemistry and Eighteenth Meeting of the American Society for Neurochemistry, (1987), La Guaira, Venezuela.
- Dfaz-Muñoz, M y R Tapia, Neurochem Res (1987), en prensa.
- Feinman, L y CS Lieber, Science (1982), 176, 795.
- Fisher, JE, HH Rosen, AM Ebel, JH James, JM Keane y PB Soeters, Surgery (1979), 80, 77.
- Gazzard, BG, B Portmann, IM Murray-Lyon y R Williams, Q J Med (1975), 44, 615.
- Hindfeldt, B, F Plum y TE Duffy, J Clin Inves (1977), 59, 386.
- Jellinger, K, P Riederer, G Kleinberg, S Wuketich y P Kothbauer, Acta Neuropathol (1978), 43, 63.
- Mans, AM, JF Biebuyck, K Shelly y RA Hawkins, J Neurochem (1982), 38, 705.
- Mans, AM, K Shelly, NS Thompson, TL Drimm y RA Hawkins, J Neurochem (1983), 40, 705.
- Moroni, F, G Lombardi, V Carla, D Pelligrini, GL Carassale y C Cortesini, J Neurochem (1986), 46, 869.
- Moroni, F, G Lombardi, V Carla, S Lal, P Etienne y NPV Nair, J Neurochem (1986), 47, 1667.
- Ono, J, DG Hutson, RS Dombro, JV Levi, A Livingstone y R Zeppa, Gastroenterology (1978), 74, 196.
- Riederer, P y K Jellinger, Advances in Neuropathology, G Stein, D Thorpe y M Stell (eds), (Raven Press, New York, 1979) p. 121.
- Smith, AR, F Rossi-Fanelli, V Ziparo, JH James, BA Perelle y JE Fisher, Ann Surg (1978), 187, 343.
- Stone, TW y MN Perkins, Eur J Pharmacol (1981), 72, 411.
- Tapia, R, Handbook of Neurochemistry, Vol. 3, A Lajtha (ed), (Plenum Press, New York and London, 1983) p. 423.
- Tossman, U, S Eriksson, A Delin, L Hagenfeldt, D Law y U Ungerstedt, J Neurochem (1983), 40, 306.
- Tossman, U, A Delin, S Eriksson y U Ungerstedt, Neurochem Res (1987), 12, 265.

T R A B A J O 2

" REGIONAL BRAIN GABA METABOLISM AND RELEASE

DURING HEPATIC COMA PRODUCED IN RATS CHRONICALLY

TREATED WITH CARBON TETRACHLORIDE "

Regional Brain GABA Metabolism and Release During Hepatic Coma Produced in Rats Chronically Treated with Carbon Tetrachloride

Mauricio Diaz-Muñoz¹ and Ricardo Tapia^{1,2}

(Accepted April 3, 1987)

Hepatic coma was induced in rats chronically treated with CCl₄ by means of a single injection of ammonium acetate. The activities of glutamate decarboxylase (GAD) and GABA transaminase (GABA-T), as well as the synaptosomal uptake and release of [³H]GABA, were measured in the following brain areas of the control rats: cortex, striatum, hypothalamus, hippocampus, midbrain and cerebellum. Hepatic coma was associated with a general decrease of GAD activity, whereas GABA-T activity was diminished only in the hypothalamus, striatum and midbrain. During hepatic coma, the K⁺-stimulated [³H]GABA release was notably diminished in the striatum and cerebellum, whereas a significant increase was observed in the hippocampus. [³H]GABA uptake increased in most regions after CCl₄ treatment, independently of the presence of coma. The results indicate that GABAergic transmission seems to be decreased in most cerebral regions during hepatic coma.

KEY WORDS: GABA metabolism; hepatic coma; carbon tetrachloride

INTRODUCTION

Hepatic coma is a pathological state that characterizes the end period of hepatic encephalopathy. Two general types of liver disease that produce coma are recognized. The first develops very rapidly and is therefore called fulminant hepatic failure, whereas the second, known as portal-systemic encephalopathy, has a gradual onset and needs a precipitating factor in order to produce the hepatic coma (1). The experimental model of fulminant hepatic failure that has been mostly employed is the administration of galactosamine (2, 3); portal-systemic encephalopathy is experimentally produced by surgical portacava shunting (4).

The mechanism of production of hepatic coma is still uncertain. Recently, some observations that suggest a role of γ -aminobutyric acid (GABA) in hepatic encephalopathy have been reported, using the experimental models mentioned above. These findings can be summarized as follows: colonic bacteria produce GABA, which is deficiently metabolized by the damaged liver, with a consequent increase in blood GABA levels (5); increased GABA enters into the brain due to an impaired blood-brain barrier (6); up-regulation of the GABA receptor complex (7). From these results it has been hypothesized that as a consequence of hepatic failure the efficiency of the GABA neurotransmitter system is increased (8-10). However, this hypothesis has been challenged by reports that did not find any alteration of GABA levels in blood (11) or extracellular brain fluid obtained by *in vivo* perfusion (12) after portacava anastomosis.

With the aim of obtaining more information on the possible role of the GABA system in hepatic

¹ Departamento de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70-600, 04510 México, D. F., México.

² Address reprint requests to Ricardo Tapia, at the address shown above Tel. 550-5235, ext. 4935.

coma. In the present work we have induced coma in rats and studied the activity of glutamate decarboxylase (GAD) and GABA transaminase (GABA-T), as well as ^3H GABA release, in six brain regions. Hepatic coma was induced by a novel experimental method, namely the production of cirrhosis by chronic treatment of carbon tetrachloride (CCl_4) (13) followed by a single injection of ammonium acetate as a precipitating agent of coma. Ammonium has been previously used to induce coma in rats with porta-cava shunting (14).

EXPERIMENTAL PROCEDURE

Experimental Groups. Two groups of male Wistar rats weighing 100-105 g received a 0.15 ml of 0.4% solution in vegetable oil (2% v/v) three times weekly. Group 1 received 12 doses after which the animals are still in the reversible period of hepatic damage, and group 2 received 20 doses leading to an irreversible liver failure equivalent to cirrhosis stage (15). One day after the last dose, the rats were injected i.p. with one dose of ammonium acetate (4.2 mmol/kg) in order to induce the symptoms characteristic of the cirrhosis state. Coma was defined in behavioral terms as an unresponsive state with a complete loss of reflexes and of muscular tone (15) and liver function was assessed as depicted below.

Control Groups. The following control groups of rats were included in parallel to the experimental ones: (1) 12 doses of vegetable oil + sodium acetate; (2) 12 doses of vegetable oil + ammonium acetate; (3) 20 doses of vegetable oil + ammonium acetate; (4) 12 doses of CCl_4 + sodium acetate; (5) 20 doses of CCl_4 + sodium acetate.

Regional Dissection of the Brain. The rats were sacrificed by decapitation and the brain was rapidly removed. The next regions were dissected out using according to Heffner et al. (16) from cortex, striatum, hypothalamus, hippocampus, midbrain and cerebellum.

Synaptosomal Fraction. Synaptosomes were isolated from each of the regions mentioned above exactly as described by Lomper et al. (17). This procedure allows to obtain a purified synaptosomal fraction from several regions using only one rat brain. In two independent experiments the fractions were evaluated by decapitation and the brain was rapidly removed. The next taraldehyde-osmium tetroxide. These observations showed that the synaptosomal fraction obtained from all regions studied was very much enriched in synaptosomes in good state of preservation and essentially free from protein and mitochondria, thus confirming the results reported by Lomper et al. (17).

^3H GABA Release. For studying the release of ^3H GABA the synaptosomal fractions were resuspended in a small volume (0.2 ml) of 0.4 mg protein of 0.32 M glucose and the release was performed by the superfusion technique previously described in detail (18). In brief, the tissue was preincubated for 10 min at 37°C in 2 ml of oxygenated Krebs-Ringer medium containing in mM: 118 NaCl, 1.2 KH₂PO₄, 0.4 KCl, 1.2 MgSO₄, 2 CaCl₂, and 25 Tris-HCl (pH 7.4). ^3H GABA was added to 0.4 μM (0.3 μM) and after 10 min uptake incubation aliquots were transferred to four parallel superfusion chambers holding 0.65 ml Millipore

cellulose acetate filters. The filters were washed by superfusion at 1.5 ml/min for 5 min, the speed of the peristaltic pump was then adjusted at 0.5 ml/min and fractions were collected every minute. After 5 min of spontaneous release, the superfusion medium was quickly substituted by a medium containing a depolarizing KCl concentration (47 mM NaCl) was proportionally reduced to maintain osmolarity. The radioactivity released in each fraction was counted in a scintillation spectrometer after the addition of 5 ml of Tritonol 100. All media contained 0.1 mM aminocaproic acid to prevent GABA metabolism. The results are expressed as percent of total radioactivity released per minute (total radioactivity = total released + that remaining in the tissue at the end of the superfusion).

^3H GABA Uptake. The value of total radioactivity as defined above was used to calculate GABA uptake by the synaptosomal fraction.

GAD Assay. GAD activity (EC 4.1.1.15) was measured in the P₂ fraction of each region studied by a microassay technique (20). The incubation mixture contained 117 mM glutamate (10 mM), 0.05 M of potassium 5-phosphoribosyl-3-Mb diphosphate (1.13 mM) and Na₂HPO₄ (50 mM), 250 mM in a total volume of 70 μl . After 20 min incubation the reaction was stopped by the addition of 10 μl of 2.5 N HClO₄ and the reaction was continued for 45 min to assure the total release of ^3H (21) which was trapped in butyric hydroxide. The radioactivity was counted by scintillation spectrometry after the addition of 10 ml of butyrate containing 1 mg of BHT (22) and 50 mg of H₂O.

GABA- ^3H EC 2.9.1.19 activity. was determined using the P₂ fraction of each region by a spectrophotometric technique. The results described (23) GABA-T activity is expressed in terms of basal rate/minute/mg of synaptosomes and the appearance of NADPH is followed at 340 nm.

Liver Function. Determination of Blood Metabolites and Serum Glutamic Pyruvic Transaminase (SGPT). Ammonia was measured in perfusate and extracts of blood obtained at the moment of decapitation using the glutamate dehydrogenase reaction as described by Kohn and his co-workers (25). SGPT was determined according to the method described by Reuland and Franke (25). Serum ammoniated and unconjugated bilirubin were measured using the method described by Malins (26).

Statistical Analysis. Statistical significance between control and cirrhotic groups was determined by Student's *t* test.

Protein Determination. Protein was determined by the method of Lowry et al. (28).

Materials. ^3H GABA (sp act. 10 Ci/mmol) was obtained from New England Nuclear (Boston, MA, USA). GABA, aminocaproic acid, and acetylcholine, acid, NADPH, NADH, as well as the enzymes glutamic dehydrogenase and lactate dehydrogenase dehydrogenase from *Pharosinus flavescens* were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Other chemicals were from local commercial sources.

RESULTS

Liver Function. Chronic treatment with CCl_4 resulted in a severe liver damage as shown in Tables I and II. Hepatomegaly is indicated after 12 and 20 CCl_4 doses, by the increment in the percent of liver weight with respect to body weight, the lat-

Table I. Body Weight and Relative Size of Liver After Chronic CCl₄ Administration

Treatment	Number of doses	Body weight (g)	Liver weight × 100 Body weight
Vegetal oil	12	218 ± 16	4.32 ± 0.14
	20	278 ± 14	4.27 ± 0.11
	20	287 ± 7	4.41 ± 0.24*
CCl ₄	12	270 ± 11	4.89 ± 0.15*

Animals injected with sodium or ammonium acetate after CCl₄ treatment (see Experimental Procedure) did not differ in the parameters shown, and therefore they are grouped together. Mean values ± SEM (n = 8).

* Statistically different from controls, p < 0.01.

ter was not affected by CCl₄ treatment (Table I). The level of SGPT was increased almost twelve fold after 12 doses but only four fold in the rats with 20 doses (Table II). This has been observed previously, and has been interpreted as the manifestation of the acute necrosis period followed by the subsequent hepatic fibrosis (26). Table II also shows that conjugated bilirubins increased 10 fold or more after 12 or 20 doses of CCl₄, whereas the unconjugated bilirubins increased about 150%. In all the above parameters the comatose rats did not show differences as compared with the non-comatose CCl₄-treated rats.

Liver failure is also indicated by the increase in NH₄⁺ blood levels observed in the CCl₄-treated rats (26). The comatose rats which received ammonium, as expected, had values of this metabolite considerably higher than those of non-comatose CCl₄-treated rats (Table II).

Coma. The state of coma, as defined in Experimental Procedures, was observed in the two

groups treated with CCl₄ (12 and 20 doses) plus ammonium. In the group receiving 12 doses, coma occurred at 31 ± 1.5 min after ammonium injection, whereas in the rats with 20 doses, coma developed more rapidly (18 ± 1.3 min).

GAD and GABA-T Activities. Table III shows the activities of GAD and GABA-T in fraction P₂ of the six brain regions studied. GAD activity in the control animals treated with vegetal oil was similar to that previously reported in intact animals (17). The highest GAD activity was observed in mid-brain, followed by the striatum, and the lowest activity was in the cerebral cortex and in the cerebellum. In the comatose animals, a notable decrease of GAD activity was observed in all regions studied, whereas no significant changes occurred in the non-comatose CCl₄-treated rats. The decrease of GAD was similar in the two groups of rats after 12 or 20 doses of CCl₄, in both groups the percent inhibition varied from 28.7 (midbrain) to 61.7 (cerebellum) as compared to control animals (vegetal oil) receiving ammonium acetate (Table III).

GABA-T activity in control animals was also higher in the striatum and in the midbrain than in the other regions studied, the lowest activity was detected in cerebellum. In contrast to the changes of GAD, GABA-T activity was not affected after 12 CCl₄ doses, the exception being the hippocampus, where a 66% decrease was observed in comatose rats. However, in the comatose animals after 20 doses of CCl₄, GABA-T activity was notably decreased (nearly 50%) in the striatum, the hypothalamus and the midbrain (Table III).

[³H]GABA Release. The release of [³H]GABA from the synaptosomal fraction of the regions studied is shown in Figure 1. The basal release in the

Table II. Serum Bilirubins and SGPT Activity, and Blood Ammonium in Comatose and Non-Comatose Rats After CCl₄ Treatment

Treatment	Behavioral effect	Bilirubins (mg/dl)		SGPT (ml. min)	NH ₄ ⁺ (mmol/L)
		Conjugated	Unconjugated		
Vegetal oil + Na acetate	(4)	0.14 ± 0.02	0.72 ± 0.06	51 ± 6	3.28 ± 0.06
Vegetal oil + NH ₄ acetate	(4)	0.11 ± 0.02	1.06 ± 0.06	45 ± 4	0.98 ± 0.07*
CCl ₄ (12 doses) + Na acetate	(4)	1.74 ± 0.24*	1.94 ± 0.25*	941 ± 74*	0.96 ± 0.05*
CCl ₄ (20 doses) + Na acetate	(4)	1.89 ± 0.20*	1.73 ± 0.23*	221 ± 17*	0.76 ± 0.05*
CCl ₄ (12 doses) + NH ₄ acetate	(4)	2.06*	1.88 ± 0.25*	632 ± 82	1.86 ± 0.22*
CCl ₄ (20 doses) + NH ₄ acetate	(4)	2.06*	1.76 ± 0.21*	247 ± 24	1.60 ± 0.23*

Rats were treated with CCl₄ or control of a comatose and then received ammonium (see in Experimental Procedures) or sodium acetate as control (see in Experimental Procedure). Each value is the mean of the number of experiments shown in parentheses ± SEM. Animals treated with 12 or 20 doses of vegetal oil did not differ in the parameters shown and therefore they are grouped by other. * Statistically different from the corresponding vegetal oil control. (p < 0.02; * p < 0.01; ** p < 0.005; *** p < 0.001).

Table III. GAD and GABA-T Activities in P₂ Fractions From Different Brain Regions in Conative and Non Conative Rats After CCl₄ Chronic Treatment

Treatment	Frontal cortex		Striatum		Hypothalamus		Hippocampus		Midbrain		Cerebellum	
	GAD	GABA-T	GAD	GABA-T	GAD	GABA-T	GAD	GABA-T	GAD	GABA-T	GAD	GABA-T
Vegetal oil + No alcohol	10.7 ± 0.8	0.75 ± 0.07*	29.7 ± 2.2	2.10 ± 0.40	20.9 ± 1.2	1.81 ± 0.36	10.2 ± 1.1	1.22 ± 0.13	16.0 ± 2.2	1.61 ± 0.25	11.8 ± 1.0	0.90 ± 0.07
Vegetal oil + 10% alcohol	10.0 ± 1.0	0.81 ± 0.06	30.0 ± 2.0	2.00 ± 0.10	21.0 ± 2.2	1.95 ± 0.10	20.0 ± 2.0	1.20 ± 0.12	17.0 ± 1.0	1.60 ± 0.20	10.0 ± 1.0	0.93 ± 0.11
CCL ₄ + 10% alcohol	10.5 ± 1.5	0.12 ± 0.01	21.0 ± 1.1	2.00 ± 0.20	10.1 ± 1.5	1.72 ± 0.10	10.0 ± 2.0	1.20 ± 0.12	17.0 ± 2.0	1.71 ± 0.10	17.0 ± 0.0	0.70 ± 0.06
Non-conative No alcohol	10.0 ± 1.0	0.71 ± 0.06	28.0 ± 1.0	2.70 ± 0.22	21.0 ± 1.0	1.80 ± 0.21	11.0 ± 1.0	1.51 ± 0.11	16.0 ± 1.2	1.61 ± 0.16	10.0 ± 2.0	0.81 ± 0.17
CCL ₄ + 10% alcohol Non-conative	10.0 ± 1.0*	1.00 ± 0.10	10.0 ± 1.0*	2.00 ± 0.20	10.0 ± 1.0*	1.00 ± 0.10*	10.0 ± 1.0*	0.80 ± 0.10*	21.0 ± 2.0*	1.61 ± 0.15	11.0 ± 1.0*	0.80 ± 0.07
CCL ₄ + 10% alcohol Conative	10.0 ± 1.2*	0.81 ± 0.11	15.0 ± 2.0*	1.00 ± 0.10	10.0 ± 1.0*	0.80 ± 0.10*	10.0 ± 1.0	0.81 ± 0.10*	21.0 ± 2.0*	1.61 ± 0.15*	10.0 ± 0.0*	0.72 ± 0.12

GAD and GABA-T activities are expressed as $\mu\text{mol/h}$ 100 mg protein. See footnote to Table II for details. Mean values \pm SEM. Statistically different from the corresponding vegetal oil control: * $p < 0.05$, * $p < 0.025$, * $p < 0.02$, * $p < 0.01$, * $p < 0.005$, * $p < 0.001$.

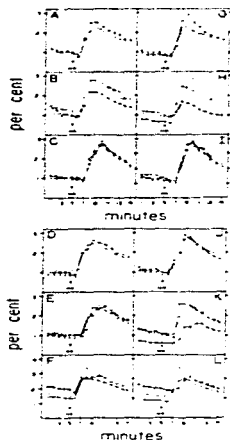


Fig. 1. Effect of hepatic coma on the release of [3 H]GABA in synaptosomes from six rat brain regions. Synaptosomes were loaded with labeled GABA and superfused with Krebs-Ringer medium, as described in Experimental Procedure. At 5 min (arrow) the superfusing medium was substituted by the high K^+ medium. \circ , control rats; \square , non-comatose CCL $_4$ -treated rats; \triangle , comatose rats. Panels A-F: rats treated with 12 doses of CCL $_4$, panels G-I: rats with 20 doses of CCL $_4$. A and G, cortex; B and H, striatum; C and I, hypothalamus; D and J, hippocampus; E and K, midbrain; F and L, cerebellum. ∇ vegetal oil-treated animals injected with sodium of with ammonium acetate (see Experimental Procedure) did not differ in the parameter shown and therefore they are grouped together as control rats. Mean values of 4 independent observations \pm SEM.

control animals was close to 1% per min in all regions, except the cerebellum in which it was about 1.5%. Stimulation of release by K^+ -depolarization over basal value was highest in the striatum (222% peak stimulation) followed by the cortex (180%),

hypothalamus (180%), midbrain (133%) and cerebellum (133%), the lowest stimulation value was observed in the hippocampus (82%) (Table IV).

In the comatose rats after 20 doses of CCL $_4$ basal GABA release was decreased in striatum and midbrain, and increased in the cerebellum; the basal release was not modified by CCL $_4$ treatment or by coma in the other regions studied. In contrast, several alterations were found in the release of GABA stimulated by K^+ -depolarization in all regions studied, except the hypothalamus and the midbrain. The most notable changes were the following (Figure 1 and Table IV): a) about 40% decrease in the striatum from the comatose animals, after both 12 and 20 doses of CCL $_4$; b) about 50% decrease in the cerebellum from the comatose rats, although in this case the apparent decrease seems to be due to the increased basal release, of a striking increase (76% to 102%) in the hippocampus from all rats treated with CCL $_4$, irrespectively of the presence or absence of coma; d) a smaller increase (10%) in the cortex of comatose rats after 20 doses of CCL $_4$.

GABA Uptake. As indicated in Experimental Procedures, the total radioactivity taken up by the synaptosomal fractions in the release experiments was used to calculate GABA uptake during the 10 min incubation period. The results of this analysis are shown in Figure 2. Treatment with ammonium

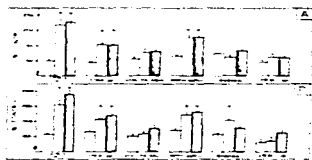


Fig. 2. Effect of hepatic coma on the uptake of [3 H]GABA in synaptosomes from six rat brain regions. The uptake was calculated as described in Experimental Procedure and it is expressed as percent of the control group (rats that received vegetal oil + sodium acetate). A, group with 12 doses of CCL $_4$ or vegetal oil; B, group with 20 doses of CCL $_4$ or vegetal oil. First bar in each region: vegetal oil + ammonium acetate; second bar, CCL $_4$ + sodium acetate (non-comatose rats); dark bar, CCL $_4$ + ammonium acetate (comatose rats). Absolute control values were (uptake per protein 10 min): cortex, 216 \pm 15; striatum, 298 \pm 26; hypothalamus, 498 \pm 56; hippocampus, 337 \pm 38; midbrain, 450 \pm 57; cerebellum, 216 \pm 33 (n = 4).

Table IV. Percent Stimulation by K^+ -Depolarization of [3 H]GABA Release in Different Brain Regions of Comatose and Non-Comatose Rats

	Control	CCl ₄ (12 doses) No coma	CCl ₄ (12 doses) Coma	CCl ₄ (20 doses) No coma	CCl ₄ (20 doses) Coma
Cortex	188	144 (-23)	159 (-15)	168 (-10)	262 (+39)
Striatum	222	195 (-12)	222 (-4)	190 (-14)	142 (-36)
Hypothalamus	180	170 (-6)	180 (0)	160 (-11)	180 (0)
Hippocampus	82	178 (+117)	210 (+144)	184 (+124)	199 (+142)
Midbrain	133	150 (+13)	153 (+13)	174 (+31)	240 (+81)
Cerebellum	133	107 (-20)	133 (0)	128 (-4)	40 (-70)

Values refer to peak stimulation (% of stimulation before) calculated from the data shown in Fig. 1. The figures in parentheses indicate the percent change considering the control values shown as 100%.

in control animals (vegetal oil) did not alter significantly GABA uptake in any region. However, treatment with 12 or 20 doses of CCl₄ resulted in a notable increase of GABA uptake in the cortex and a smaller but significant increase in the striatum and the hippocampus. In contrast to GABA release, these modifications seem to be due solely to the liver damage, since they were similar in the CCl₄-treated rats with or without coma (Figure 2).

DISCUSSION

It has been reported that chronic treatment with CCl₄ produces a cirrhotic state in the rat (13). The liver function tests give results similar to those obtained in human patients (27). However, this model of liver failure had not been previously used to produce hepatic coma. In this report it is shown that the rats treated chronically with CCl₄ developed a comatose state after the administration of a single dose of ammonium acetate, which acts as a precipitating agent as it occurs in clinical cases (1). In this model, coma appeared about 30 min after ammonium injection in rats treated with 12 doses of CCl₄ and this period was almost 50% shorter in the rats injected with 20 doses of the hepatotoxin. This observation suggests that coma occurs earlier if the extent of liver damage is greater, since after 20 doses such damage is already irreversible (13). This idea is supported by the results shown in Tables I and II, which indicate a progressive hepatic damage with longer CCl₄ treatment. Hindfelt et al. (28) used ammonium acetate administration to produce coma in rats with portacaval anastomosis. Interestingly, the time of appearance of coma after ammonium acetate injection was very similar to that we observed in rats treated with 20 doses of CCl₄.

The hypothesis of an increased function of the GABA system during hepatic coma was mentioned in the Introduction. The results of the present work do not support this hypothesis, since in all regions studied GAD activity was considerably inhibited during coma and it has been amply demonstrated that a decreased synthesis of GABA is linked to a deficiency in GABA inhibitory neurotransmission (29). GABA-T activity was also inhibited in comatose animals but, in contrast to GAD, this inhibition was not observed in all regions tested. Inhibition of GAD in the rat caudate, hypothalamus and cortex has been reported also in galactosamine-induced hepatic coma (2), whereas using the same experimental model no GAD changes were detected in rabbit cerebral cortex (30). In the latter study a notable inhibition of GABA-T was reported.

Although the inhibition of GABA-T observed in some areas might suggest a reduced GABA turnover and consequently an increase of GABA synaptic transmission, the clear generalized inhibition of GAD activity makes this conclusion very improbable. GABA levels in rat caudate, hypothalamus and cortex did not change during galactosamine-induced coma (2) nor in forebrain after portacaval anastomosis (28).

Our results of the release experiments in general also give no support to the possibility of increased GABAergic transmission as a mechanism of hepatic coma, since significant inhibition of the depolarization induced release of [3 H]GABA was observed during coma in the striatum and in the cerebellum. In the hippocampus this release was clearly stimulated in all groups of CCl₄ treated animals, including those with liver damage but no coma. This finding might suggest that some modifications in GABAergic function occur in certain regions during experimental cirrhosis, independently

of the presence of coma. In an *in vivo* study of GABA release from the striatum, no changes were found in rats with portacaval anastomosis, although no coma was induced in these animals (12).

Although GABA uptake was calculated after a 10 min incubation period and therefore most probably does not represent initial uptake velocities, our results also disagree with an enhancement of GABAergic transmission, since during coma there was either no change (hypothalamus, cortex and cerebellum) or an increase (striatum, cortex and hippocampus). One should expect that such increase would cause, if something is decreased, efficiency of GABA synaptic function. GABA uptake has been reported to be normal in whole brain P₂ fraction after galactosamine-induced hepatic coma (2).

In conclusion, we have demonstrated that it is possible to produce hepatic coma by the systemic injection of ammonium in rats previously made cytothetic by chronic administration of CCl₄. Using this experimental model we found that GAD activity in crude synaptosomal fraction is inhibited during hepatic coma in the six cerebral regions studied, whereas GABA-T activity is decreased but less extensively. GABA uptake was either unchanged or enhanced, and GABA release was unchanged or inhibited, except in the hippocampus where it was increased by CCl₄ treatment; independently of the presence or absence of coma. These results, taken together, indicate that GABAergic transmission is decreased during hepatic coma and therefore are contrary to the postulated increased efficiency of the GABA system. Further experiments are needed to know whether the changes in the GABA system observed represent an effect or a causative factor of the hepatic coma.

ACKNOWLEDGMENTS

The technical assistance of Mr. Jorner Sepúlveda, from the Electron Microscopy Unit of the Instituto de Fisiología Celular, is gratefully acknowledged.

REFERENCES

- Hosuyama, A. M. and Schenker, S. 1985. Hepatic Encephalopathy. Pages 309-320 in Scott, T. V. ed. Internal Medicine, Academic Press, New York.
- Zerangue, M. E., Juliano, E., Racagni, G., and Baraldi, M. 1992. Metabolism and uptake of γ -aminobutyric acid in galactosamine-induced hepatic encephalopathy in rats. *J. Neurochem.* 58:1219-1222.
- Perenna, P., Conell, D., Schafer, D. F., Waggoner, J. G., Strager, R. and Jones, E. A. 1981. Metabolism of the inhibitory neurotransmitter γ -aminobutyric acid in a rabbit model of fulminant hepatic failure. *Hepatology* 1:307-312.
- Mans, A. M., Bierbeck, J. F., Davis, D. W., Bryan, R. M., and Hawkins, R. A. 1983a. Regional cerebral glucose oxidation in rats with portacaval anastomosis. *J. Neurochem.* 40:966-969.
- Schafer, D. F., Fowler, J. M. and Jones, E. A. 1981. Cerebral bacteria: a source of γ -aminobutyric acid in blood. *Proc. Soc. Biol. Med.* 167:301-303.
- Zaky, A. E., D. F. D. Fide, R. J., Davis, M. and Williams, R. L. 1984. Experimental studies of the blood-brain barrier permeability in acute hepatic failure. *Regulatory* 4:195-200.
- Baraldi, M. 1982. Experimental hepatic encephalopathy: changes in the binding of γ -aminobutyric acid. *Science* 216:427-429.
- Schafer, D. F. and Jones, E. A. 1982. Hepatic encephalopathy and the γ -aminobutyric acid neurotransmitter system. *Lancet* 1:18-20.
- Roberts, E. 1984. The γ -aminobutyric acid (GABA) system and hepatic encephalopathy. *Hepatology* 4:42-543.
- Schafer, D. F. 1984. Hepatic encephalopathy index. *Lancet* 1:404-405.
- Thompson, J. S., Schafer, D. F., Schafer, G. J. and Hoegl, W. P. F. 1985. γ -aminobutyric acid plasma levels and brain binding in Eckhof syndrome. *J. Surg. Res.* 38:145-148.
- Tussman, L., Eriksson, S., Delin, A., Hagenfeldt, L., Law, D. and Engerstedt, L. 1983. Brain amino acids measured by microdialysis in portacaval shunted rats. *J. Neurochem.* 41:1046-1053.
- Reidling, M. 1975. Inhibition of liver enzymes by α -azetidine-2-carboxylic acid in rats treated with carbon tetrachloride. *J. Clin. Invest.* 52:2451-2456.
- Mans, A. M., Saunders, S. J., Kirwan, R. J. and Bierbeck, J. F. 1979. Correlation of plasma and brain amino acid and putative neurotransmitter alterations during acute hepatic coma in the rat. *Neurochem.* 32:283-292.
- Geiger, J. E. and Butterworth, R. F. 1984. Amino acid changes in regions of the CNS in relation to function in experimental portal-systemic encephalopathy. *Neurochem. Res.* 9:1189-1192.
- Heller, T. G., Hartman, J. A. and Sinden, L. S. 1980. A rapid method for the regional dissection of the rat brain. *Pharmac. Biochem. Behav.* 13:453-456.
- Loewcher, W., Hofbauer, G., Müller, J., and Fagiani, S. 1985. Improved method for isolating synaptosomes from 11 regions of one rat brain. Election microelectric and biochemical characterization and use in the study of drug effects on nerve terminal γ -aminobutyric acid release *J. Neurochem.* 45:876-886.
- Tapan, R. and Sigten, M. 1982. Effect of α -azetidine on transmitter release in synaptosomes. *Brain Res.* 250:291-296.
- Engel, L. 1978. Trisoval a new scintillation cocktail based on Triton-X-100. *Anal. Biochem.* 81:555-558.
- Albers, R. W. and Brady, R. D. 1976. The distribution of glutamic acid decarboxylase in the nervous system of the Rhesus monkey. *J. Biol. Chem.* 251:926-929.
- Jakobs, S. J. 1976. Soluble γ -aminobutyric-glutamate transaminase from Pseudomonas fluorescens. *J. Biol. Chem.* 251:927-937.
- Nun, E. J. and Kearnes, E. B. 1974. Aminoacids. Pages 1802-1816 in Bergmeyer, H. V. (ed.) *Methods of Enzymatic Analysis*, Academic Press, New York.
- Keitman, S. and Frankel, S. 1967. Determination of serum transaminase. *Am. J. Clin. Path.* 29:564.
- Malloy, H. T. 1937. The separation of serum pigments giving

- the direct and indirect Van den Bergh reaction. *Biol. Chem.* 119:481-489.
25. Lowery, D. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-275.
26. Kojlund, M., and Krasemannich, D. 1975. Effect of colchicine on collagen, albumin and transferrin synthesis by cirrhotic rat liver slices. *Biochim. Biophys. Acta.* 378:415-423.
27. Ferenci, P., Schafer, D. F., Kleinberger, G., Haindrup, J. H., and Jones, E. A. 1983. Serum levels of gamma aminobutyric acid like activity in acute and chronic hepatocellular disease. *Lancet* ii 811-814.
28. Hindfelt, B., Plum, F., and Duffy, T. E. 1977. Effect of acute ammonia intoxication on cerebral metabolism in rats with portacaval shunt. *J. Clin. Invest.* 59:1060-1066.
29. Tapia, R. 1983. γ -aminobutyric acid Metabolism and biochemistry of synaptic transmission, pages 423-466, in Laytha, A. 1st ed. Handbook of Neurochemistry, vol. 3, Plenum Press, New York and London.
30. Ferenci, P., Jacobs, R., Pappas, S. C., Schafer, D. F., and Jones, E. A. 1984. Enzymes of cerebral GABA metabolism and synaptosomal GABA uptake in acute liver failure in the rabbit. Evidence for decreased cerebral GABA-transaminase activity. *J. Neurochem.* 42:1487-1490.

T R A B A J O 3

" GLUTAMATE DECARBOXYLASE INHIBITION AND VITAMIN

B₆ METABOLISM IN BRAIN OF CIRRHOTIC RATS

CHRONICALLY TREATED WITH CCl₄ "

Glutamate Decarboxylase Inhibition and Vitamin B₆ Metabolism in Brain of Cirrhotic Rats Chronically Treated With Carbon Tetrachloride

M. Diaz-Munoz and R. Tapia

Departamento de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F.

In a previous work we found that the activity of glutamate decarboxylase (GAD), the enzyme responsible for the synthesis of the inhibitory neurotransmitter γ -aminobutyric acid (GABA), is decreased in comatose cirrhotic rats after chronic treatment with CCl₄. In the present report we studied the participation of pyridoxal phosphate in the inhibition of GAD, as well as the concentration of this coenzyme and the activity of its synthesizing enzyme, pyridoxal kinase, in the brain of the cirrhotic rats. Furthermore, cirrhotic animals were treated with three inhibitors of GAD, and the effects of such treatment were compared to those of ammonium. Liver failure resulted in a 25% inhibition of GAD activity when measured in the absence of added pyridoxal phosphate. Treatment with the GAD inhibitors thiosemicarbazide or 3-mercaptopropionic acid enhanced this inhibition and produced convulsions at a dose that had no behavioral effects in control rats. Treatment with ammonia resulted in a comatose state and in a 25–40% inhibition of GAD. Both pyridoxal kinase activity and pyridoxal phosphate levels were found to be decreased by 15–20% in the brain of the cirrhotic rats. We concluded that chronic liver failure results in a decreased pyridoxal phosphate and GABA synthesis in brain, with a consequent diminished efficiency of GABAergic neurotransmission; these effects are probably related to the manifestations of neuronal hyperexcitability that are frequently seen in human hepatic encephalopathy.

Key words: pyridoxal phosphate, pyridoxal kinase, hepatic encephalopathy, liver failure

INTRODUCTION

The mechanism of hepatic encephalopathy and its extreme consequence, hepatic coma, is an unsolved problem. Although several metabolic abnormalities have been described, the alterations of the central nervous system

responsible for the onset of coma are still unknown. Some recent observations have suggested that the γ -aminobutyric acid (GABA) mediated inhibitory synaptic transmission may be altered during hepatic encephalopathy and coma, although there is a discrepancy in the way this alteration occurs. Whereas some reports indicate that GABAergic transmission may be increased [Jones and Schaffert, 1956; Schaffert and Jones, 1982], others suggest that it is decreased [Zerangue et al., 1982].

We have recently reported [Diaz-Munoz and Tapia, 1988] that a single dose of ammonium induces coma in rats with experimental cirrhosis produced by chronic treatment with carbon tetrachloride (CCl₄). At the time of occurrence of coma we observed modifications in the release, uptake, and metabolism of GABA in six areas of the brain, most of them suggesting that GABAergic transmission is decreased. The more conspicuous finding was an inhibition of the GABA synthesizing enzyme, glutamate decarboxylase (GAD), in all regions studied.

With the aim of obtaining more information on the relationship between hepatic damage, coma, and cerebral GAD activity, in the present work we studied the behavioral effects of the administration of several inhibitors of this enzyme in CCl₄ treated cirrhotic rats, compared with the previously reported action of ammonium, we attempted to correlate such effects with the modifications in the activity of GAD. Since this enzyme is regulated by pyridoxal 5'-phosphate [Bayon et al., 1977; Tapia, 1983], its activity was studied in the presence and absence of this coenzyme. Furthermore, we measured the level of pyridoxal phosphate and α -2 activity of its synthesizing enzyme, pyridoxal kinase, in the brain of the cirrhotic rats.

Received February 10, 1988; accepted March 29, 1988.

Address reprint requests to Ricardo Tapia, Departamento de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70-00, 04510 México D.F., México.

TABLE I. Serum Metabolites in Control and Cirrhotic Rats*

Metabolites	Control	Cirrhotic
Glutamic-pyruvic transaminase (normal 0-40 IU/ml)	0.61 ± 0.09	4.52 ± 0.64
Glutamic dehydrogenase (normal NAHDH (100 ml))	2.67 ± 0.49	6.72 ± 0.56
Bilirubin (mg/100 ml)	0.54 ± 0.07	1.86 ± 0.21
NH ₄ (μmol/100 ml)	28 ± 5.6	76 ± 10
Albumin (mg/100 ml)	1.04 ± 0.36	1.18 ± 0.17
Globulins (mg/100 ml)	1.41 ± 0.23	1.27 ± 0.19
Albumin/globulin	2.16	0.91

*Cirrhotic was induced by treatment with 20 doses of CCl₄ as described in Materials and Methods. The administration of the GAD inhibitors did not modify the parameters shown, either in the control or in the cirrhotic animals; therefore, they were grouped together with the controls receiving same. Means ± standard error for seven to eight animals.

TABLE II. Body and Liver Weight and Liver Collagen and Free Proline in Control and Cirrhotic Rats*

Parameter	Control	Cirrhotic
Body weight (g)	264 ± 13	271 ± 16
Liver weight (g)	9.6 ± 0.9	14.4 ± 1.1
Collagen (μmol/g)	0.82 ± 0.07	3.45 ± 0.32
Free proline (μmol/g)	0.53 ± 0.02	0.52 ± 0.02

*Details as for Table I. The values of collagen refer to the hydroxyproline measured after hydrolysis of a collagen extract, as indicated in Materials and Methods.

MATERIALS AND METHODS

Materials

L-[1-¹⁴C] glutamic acid (sp. act. 50 mCi/mole) was obtained from New England Nuclear (Boston, MA). α-Keto-glutaric acid, NAIDP*, NAIDH, pyridoxal phosphate, ATP, thiosemicarbazide, 3-mercaptopropionic acid, and glutamic dehydrogenase were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). Pyridoxal phosphate-L-glutamyl-γ-hydrazine was synthesized from pyridoxal phosphate and L-glutamyl-γ-hydrazide, as previously described [Sah, 1954; Tapia and Asanuma, 1960]. Other chemicals used were of the best quality available.

Experimental Cirrhosis

Male Wistar rats (90-100 g) were injected intraperitoneally (i.p.) with 0.15 ml of CCl₄ in vegetable oil (1:9 w/w) 3 times weekly, for a total of 20 doses. The hepatic damage produced in this way is similar to the cirrhotic state reported in clinical cases [Rojkind, 1973]. A control group was treated in parallel with vegetable oil.

Pharmacological Treatments

Two types of pharmacological manipulation of the cirrhotic animals were used. One of them was the i.p. administration of ammonium acetate (5.2 μmoles/kg) to

induce coma, as previously described [Diaz-Munoz and Tapia, 1988]. The other was the i.p. injection of three different inhibitors of GAD, namely, the semicarbazide (82.5 μmoles/kg), 3-mercaptopropionic acid (70 μmoles/kg), and pyridoxal phosphate-γ-glutamyl hydrazine (Glu-hydrazine, 360 μmoles/kg) [Tapia, 1975]. The indicated doses of the inhibitors are subconvulsive and were chosen after a series of preliminary experiments in normal rats, showed that GAD activity was significantly decreased, but convulsions did not occur. The inhibitors of the enzyme were dissolved in saline and ammonium acetate in water; controls included animals injected with saline or with sodium acetate in water. Therefore, rats were divided in 12 groups, as follows: a) vegetable oil + saline; b) vegetable oil + thiosemicarbazide; c) vegetable oil + 3-mercaptopropionic acid; d) vegetable oil + Glu-hydrazine; e) vegetable oil + sodium acetate; f) vegetable oil + ammonium acetate; g) CCl₄ + saline; h) CCl₄ + thiosemicarbazide; i) CCl₄ + 3-mercaptopropionic acid; j) CCl₄ + Glu-hydrazine; k) CCl₄ + sodium acetate; and l) CCl₄ + ammonium acetate. The drugs were injected 24 hr after the last dose of CCl₄.

Animals were sacrificed by decapitation at the times indicated in Results, when they showed coma or motor alterations. Brains were immediately taken out, olfactory bulbs removed, and the forebrain was dissected on ice in three parts for the biochemical determinations: a frontal portion (frontal cortex), cut at the anterior edge of the caudate, and the two hemispheres of the remaining forebrain. Liver and blood samples were taken for the liver function tests described below.

GAD (EC 4.1.1.15) Assay

The activity of GAD was measured in homogenates of the frontal cortex, in the absence and in the presence of exogenous pyridoxal phosphate, by a micro-spectro technique [Albers and Brady, 1959]. Tissue was homogenized in a 50 mM sodium phosphate buffer, pH 6.4, containing 1.13 mM dithiothreitol and 0.5% Triton X-100. The incu-

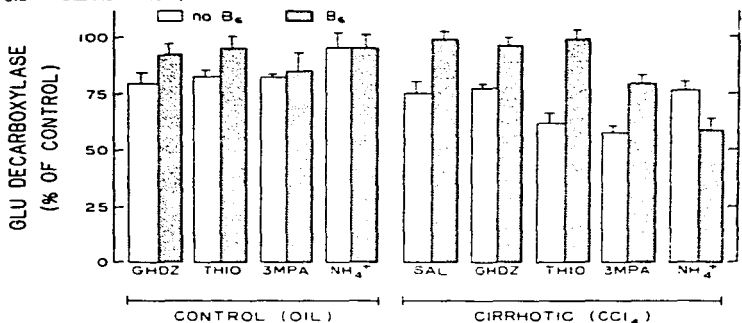


Fig 1. Changes of GAD activity in brain of control and cirrhotic rats treated with inhibitors of the enzyme and with ammonium acetate (GHZ), pyridoxal phosphate- γ -glutamyl hydrazine, THIO, thiosemicarbazide, 3MPA, 3-mercaptopropionic acid, SAL, saline). GAD activity was measured in the absence (empty bars) and in the presence of pyridoxal phosphate (B_6) in frontal cortex of animals sacrificed at the times indicated in Table III. 100% values refer to control rats injected with saline; absolute

control values were (mean \pm mg protein): 90 ± 6.8 and 127.3 ± 9.2 in the absence and in the presence of pyridoxal phosphate, respectively. Means \pm standard error of five or six rats in each group. All changes observed in the cirrhotic rats in the absence of pyridoxal phosphate were significant (saline, GHZ, and NH_4^+ , $P < 0.05$; THIO and 3MPA, $P < 0.1$). In the presence of the coenzyme only the decrease after NH_4^+ treatment was significant ($P < 0.025$) (Student's t test).

buffer mixture contained L-[1-¹⁴C] glutamate (10 mM, 0.05 μ Ci), the homocysteine and, when present, 0.5 mM pyridoxal phosphate, in a total volume of 70 μ l.

Pyridoxal Phosphate Levels

The levels of pyridoxal phosphate were measured in the right cerebral hemisphere. Homogenization and extraction were carried out according to Schreiber and Holzer [1965], the quantification of the coenzyme was performed by the phenylhydrazine method described by Wada and Snell [1961].

Pyridoxal Kinase (EC 2.7.1.35) Assay

Pyridoxal kinase activity was assayed in the left hemisphere. Homogenates (1.4 w/w) in 0.1 M phosphate buffer, pH 6.5, were centrifuged at 18,500g for 15 min, and the supernatant was used as enzyme source. The incubation mixture was as described by McCormick et al. [1961] in a final volume of 2.4 ml. The incubation time was 60 min

at 37°C; the pyridoxal phosphate formed was determined by the phenylhydrazine method [Wada and Snell, 1961].

Liver Collagen and Prolin

The Tris-NaCl insoluble protein from liver samples was extracted with 0.25 M acetic acid and dialyzed against 0.02 M Na_2HPO_4 , as previously described [Rojkind et al., 1979]. Collagen was analyzed by its hydroxyproline content according to Rojkind and Gonzalez [1974] after hydrolysis in 6 N HCl at 110°C for 24 hr. For the determination of free proline, liver samples were homogenized in 3 ml of 6% $HClO_4$ (w/v), the protein was sedimented by centrifugation, and proline was measured as described previously [Rojkind and Gonzalez, 1974] in the neutralized supernatants.

Serum Metabolites

The following metabolites were measured in serum, as indicators of liver function: ammonium, glutamic-

TABLE III. Behavioral Effects of Ammonium Acetate and of Glutamate Decarboxylase (GAD) Inhibitors in Cirrhotic Rats*

Drug	Dose (mmol/kg)	Behavior	Time (min)
Ammonium acetate	5200	Coma	16-23
Thiosemicarbazide	42.5	Convulsion	110-128
3-Mercaptopyruvic acid	70	Convulsion	9-16
Glu hydrazine	661	No effect up to	210

*Drugs were injected at the doses indicated 1 day after the last administration of CCl₄; the rats were sacrificed at the times shown. Control rats, treated in parallel, did not show any apparent behavioral alteration.

TABLE IV. Pyridoxal Kinase Activity and Pyridoxal Phosphate Levels in Brain of Control and Cirrhotic Rats Treated With Inhibitors of Glutamate Decarboxylase (GAD) and With Ammonium Acetate*

Drug	Pyridoxal kinase (nmol/hr/g tissue)	Pyridoxal phosphate (nmol/g tissue)
Control		
Saline	407 ± 52	7.51 ± 0.41
Glu hydrazine	726 ± 94	7.16 ± 0.23
Thiosemicarbazide	766 ± 46	7.37 ± 0.40
3-Mercaptopyruvic acid	764 ± 76	7.63 ± 0.37
Ammonium acetate	412 ± 64	7.45 ± 0.48
Cirrhotic		
Saline	646 ± 40	6.12 ± 0.37
Glu hydrazine	631 ± 48	6.28 ± 0.33
Thiosemicarbazide	645 ± 50	4.05 ± 0.39
3-Mercaptopyruvic acid	621 ± 45	6.15 ± 0.48
Ammonium acetate	603 ± 54	6.23 ± 0.43

*The determinations were carried out in the cerebral hemispheres of rats sacrificed at the times shown in Table III. Mean values of five to six animals in each group (n = 5). The differences between the cirrhotic and the control groups were all significant, for both pyridoxal kinase and pyridoxal phosphate (P < 0.25, Student's t test).

pyruvic transaminase, and bilirubin, by the methods previously reported [Díaz-Muñoz and Tapia, 1988], albumin and globulins by the method of Garnall et al. [1949], and glutamic dehydrogenase activity according to Hernandez-Muñoz et al. [1984].

Protein was determined by the method of Lowry et al. [1951].

RESULTS

Hepatic Function

Chronic CCl₄ treatment resulted in severe liver failure (Tables I and II). Cell necrosis was evidenced by the notable increase in serum glutamic-pyruvic transaminase and glutamic dehydrogenase, particularly the former. These changes were accompanied by increased levels of bilirubin and ammonia and decreased albumin concentration and albumin/globulin ratio (Table II).

The appearance of fibrosis is a striking feature of the CCl₄ chronic treatment. As shown in Table II, the hepa-

totoxic produced a 50% increase in liver weight and a four-fold increase in collagen, in agreement with other reports [Huberman et al., 1969]. There was also an increase in free proline, which is generally associated to high rates of fibrogenesis [Kerubensbuch et al., 1970].

Neither of the pharmacological treatments indicated in Materials and Methods affected the parameters shown in Tables I and II, either in control rats injected with vegetable oil or in cirrhotic rats.

Effects of Ammonium and of GAD Inhibitors

The behavioral actions of the drugs used in shown in Table III. Coma, defined as an unresponsive state with complete loss of reflexes and of muscular tone, was observed in the cirrhotic animals treated with ammonium acetate. In contrast, cirrhotic rats injected with two of the GAD inhibitors, thiosemicarbazide and 3-mercaptopyruvic acid, showed convulsive activity approximately 2 hr and 12 min, respectively, after treatment (Table III). Convulsions were characterized by continuous tonic-clonic

movements of the four limbs, with loss of the righting reflex; no generalized tonic convulsion was observed. Cirrhotic animals receiving Glu hydrazone, however, showed no apparent behavioral abnormalities up to 2.5 hr after the injection. As already stated in Materials and Methods, all the doses used neither of the GAD inhibitors employed produced convulsions in control, non-cirrhotic rats.

GAD Activity

Figure 1 shows the activity of GAD in brain of control and cirrhotic rats. In the absence of pyridoxal phosphate, GAD activity in the non-cirrhotic rats was decreased by 18–20% after the injection of thiosemicarbazide, 3-mercaptopropionic acid, or Glu hydrazone, confirming previously reported results [Tapia, 1975]. In the presence of exogenous pyridoxal phosphate the inhibitory effect of thiosemicarbazide and Glu hydrazone was reversed, but the inhibition by 3-mercaptopropionic acid remained constant. The administration of ammonium acetate had no effect on GAD activity in the non-cirrhotic rats, both in the presence and in the absence of exogenous pyridoxal phosphate (Fig. 1).

In the absence of pyridoxal phosphate, GAD activity was inhibited by 25% in the CCl₄ treated animals receiving only saline; this inhibition was reverted by the addition of the coenzyme to the assay medium (Fig. 1, right panel). After Glu hydrazone administration, the inhibition of GAD was similar to that observed after saline. However, treatment with both thiosemicarbazide and 3-mercaptopropionic acid notably inhibited the enzyme, which reached 43% when the enzyme was measured in the absence of pyridoxal phosphate. In the presence of the coenzyme the inhibition produced by thiosemicarbazide was totally reverted, whereas the reversion after 3-mercaptopropionic acid was only partial.

During coma produced by ammonium injection to the cirrhotic rats, there was a 40% inhibition of GAD in the presence of pyridoxal phosphate. In contrast to the effect of GAD inhibitors, this inhibition was less notable in the absence of the coenzyme, although the difference was not statistically significant (Fig. 1).

Pyridoxal Kinase Activity and Pyridoxal Phosphate Levels

The activity of pyridoxal kinase in brain of control animals was similar to that reported by McGinnick et al. [1961], and it was not significantly affected by any of the drugs used. Only in the rats receiving Glu hydrazone a small (10%) inhibitory effect was observed (Table IV). In contrast, the CCl₄ treated cirrhotic animals showed a 15–20% decrease of pyridoxal kinase activity; this value was not altered by any of the drugs used.

The inhibition of pyridoxal kinase activity was well correlated with a 15–20% decrease of pyridoxal phosphate levels in all groups of cirrhotic rats. The only exception was the group receiving thiosemicarbazide, in which the diminution of pyridoxal phosphate concentration was more

notable (46% decrease as compared to the non-cirrhotic control and 34% with respect to the cirrhotic control (Table IV)).

DISCUSSION

The results of the liver function tests confirm and extend the previously reported hepatic fibrosis and deficiencies produced by chronic treatment with CCl₄ [Diaz-Munoz and Tapia, 1968; Rookard, 1973]. The cirrhotic state of the liver was thus corroborated.

Using this experimental model, we had previously found that the function of GABA synapses seems to be depressed during hepatic encephalopathy and coma [Diaz-Munoz and Tapia, 1968]. We observed a generalized inhibition of both GABA release from synaptosomes and GAD activity, two parameters of paramount importance for the functioning of the GABAergic inhibitory mechanisms in the brain. In particular, GAD inhibition has been clearly correlated with neuronal hyperexcitability due to disinhibition of neuronal circuits [Rihak et al., 1982; Tapia, 1975, 1983]. It was therefore of interest to study in more detail the nature of the relationship between the behavioral alterations of hepatic encephalopathy and the inhibition of GAD, particularly in view of the tendency of patients to seizures and other motor abnormalities [Hoyumpa and Schenker, 1985].

Our approach to this question was to inject three different inhibitors of GAD activity to rats made cirrhotic by the chronic administration of CCl₄ and to compare their effects with those of ammonia. The inhibitors of GAD used act through different mechanisms. Thiosemicarbazide is a carbonyl-trapping compound that combines with pyridoxal phosphate [Wood and Abraham, 1971]. 3-Mercaptopropionic acid behaves as a competitive inhibitor [Wu, 1976] and the Glu hydrazone acts by decreasing pyridoxal phosphate levels as a consequence of pyridoxal kinase inhibition [Tapia and Awapara, 1969]. The effects *in vivo* of these drugs, regarding the alterations of motor excitability, have been well correlated with the inhibition of GAD activity, neither of the drugs used affect GABA transaminase at doses known to inhibit GAD [see Tapia, 1975 for review]. The inhibition of other transmitter-related enzymes, like DOPA decarboxylase, which is also blocked by Glu-hydrazone treatment, has been shown not to be related to motor hyperexcitability [Tapia and Pesaresi, 1971]. Therefore, the behavioral effects of the drugs may be ascribed to GAD inhibition, rather than to other actions not involving this enzyme. Furthermore, in this way it was also possible to study the participation of vitamin B₆ in the observed effects.

A striking finding of the present study was that all groups of cirrhotic animals showed a decreased GAD activity when pyridoxal phosphate was not added to the incubation mixtures. This inhibition was reverted by the addition

of the coenzyme, both in the rats not receiving any drug and in those treated with the GAD inhibitors which act by diminishing the interaction of the enzyme with pyridoxal phosphate (thiosemicarbazide and Glu hydrazine). This suggests that pyridoxal phosphate deficiency might be involved in the decrease of GAD activity in the cirrhotic animals. This conclusion is supported by the observation that both pyridoxal kinase and pyridoxal phosphate levels were decreased in the CCl₄-treated rats. In fact, previous studies from our laboratory have shown that there is a good correlation between pyridoxal kinase, pyridoxal phosphate, and GAD in the brain and have established the high degree of pyridoxal phosphate dependence of GAD activity in vivo [Tapia, 1973; 1983; Tapia and Awajara, 1969; Tapia et al., 1999].

In the cirrhotic animals treated with 3-mercaptopropionic acid the inhibition of GAD was not reversed by pyridoxal phosphate in vitro, which was to be expected since the coenzyme is not involved in the mechanism of action of this compound [Wu, 1976]. It seems possible that the enzyme was probably modified as a consequence of the liver damage and became more susceptible to inhibition by this drug and by ammonia.

Another remarkable observation of the present work was the occurrence of seizure activity in the cirrhotic rats but not in the control animals, treated with thiosemicarbazide or with 3-mercaptopropionic acid. This can be correlated with the considerably greater GAD inhibition in the absence of exogenous pyridoxal phosphate observed in these animals, as compared with both the non-cirrhotic rats receiving these two inhibitors and the cirrhotic group receiving Glu hydrazine. This observation agrees with the abundant data in the literature, which indicated that convulsions occur when the activity of GAD is inhibited to the extent of about 40-50% [Tapia, 1975, 1983], whereas, as mentioned above, other possible effects of the idiosyncrasy do not seem to be related to seizures.

The mechanism of production of coma by ammonia in the cirrhotic rats is a difficult problem. Our data indicate that in these animals the inhibition of GAD in the absence of added cofactor is smaller than that observed in convulsing rats treated with the inhibitors of GAD. This effect is similar to the cirrhotic non-convulsant rats, whether untreated or treated with Glu-hydrazine. This observation explains the lack of appearance of convulsion and, together with the data discussed above, leads to the conclusion that GAD inhibition is probably not related to coma but, rather, to the tendency to mouse hyperexcitability during hepatic encephalopathy. Although increased levels of ammonia in the brain may produce convulsions [Cooper and Plum, 1987], other effects, different from GAD inhibition, must be involved in the production of coma. The answer to this question remains elusive, but alterations of inhibitory postsynaptic potentials seem to be an important factor [Cooper and Plum, 1987].

In conclusion, our results do not support the hypothesis of an increased GABAergic transmission as a mechanism of the neurological alterations observed in hepatic encephalopathy, which has been proposed and defended by some authors [Jones and Schafer, 1986; Schafer and Jones, 1982]. On the contrary, the data obtained indicate that chronic liver damage results in an impairment of the inhibitory neurotransmission mediated by GABA and that such impairment may be causally related to the tendency to seizures and other manifestations of hyperexcitability frequently associated with human hepatic encephalopathy. Our results suggest also that the metabolism of pyridoxal phosphate in brain is affected by the liver damage and that this might be the primary defect causing the derangement of GABA metabolism. The nature of the relationship between chronic hepatic dysfunction and the alterations of vitamin B₆ and GABA synthesis in brain remains to be elucidated.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported in part by a grant from the Subsecretaría de Regulación Sanitaria y Desarrollo, Secretaría de Salud, Mexico.

REFERENCES

- Albers RW, Berk M (1980): The distribution of glutamic acid decarboxylase in the nervous system of the Rhesus monkey. *J Biol Chem* 254:926-928.
- Brown A, Pricom ED, Tapia M, Tapia R (1977): Kinetics of brain glutamate decarboxylase: Interaction with glutamate decarboxylase phosphate and glutamate pyridoxal 5-phosphate. *J Neurochem* 29:93-95.
- Cooper ME, Plum F (1987): Biochemistry and physiology of Brain ammonia. *Physiol Rev* 67:401-519.
- Diez Muñoz M, Tapia R (1988): Regional brain GABA metabolism affected by carbon tetrachloride coma produced in rats chronically treated with carbon tetrachloride. *Neurochem Res* 13:1244.
- Garnett A, Bradwell C, David M (1984): Determination of serum glutamate by means of the burst reaction. *J Biol Chem* 259:1117-1120.
- Hernández Muñoz R, Glendon W, Diez Muñoz M, Chagasta de Sánchez N (1984): Effects of aluminum on liver and brain induced by carbon tetrachloride. *Biochem Pharmacol* 23:259-264.
- Honuma AM, Schrier S (1985): Hepatic encephalopathy. In Scott T (ed): *Internal Medicine*. New York: Academic Press, pp 1093-1120.
- Huberman A, Neveu A, Rivkind M (1986): Glutamine biosynthesis in normal and cirrhotic rat liver slices. *Proc Soc Exp Biol Med* 181:204-207.
- Jones EA, Schafer DE (1986): Hepatic encephalopathy: A neurochemical disorder. In Popper H, Schaffner P (eds): *Progress in Liver Diseases*. New York: Grune and Stratton, Vol VIII, pp 624-640.
- Karshon SN, Jones J, Rivkind M (1976): The relationship between the rate of synthesis and utilization of glutamate in human liver. *Am J Clin Invest* 68:226-229.
- O'Riaghain N, Egan A, Randall RJ (1981): Brain measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 256:205-208.

- McCormick DB, Gregory ME, Snel EE (1961) Comparative inhibition of pyruvate kinase and glutamic acid decarboxylase by carboxyl reagents. *J Biol Chem* 236:2076-2084.
- Rubak CE, Brautspire RM, Harris AB (1982) A preferential loss of GABAergic, symmetric synapses in epileptic foci: A quantitative ultrastructural analysis of monkey neocortex. *J Neurosci* 1723-1735.
- Roykand M (1973) Inhibition of liver lipoprotein L-azetidine 2-carboxylic acid in rats treated with carbon tetrachloride. *J Clin Invest* 52:2451-2456.
- Roykand M, Guambene A, Bismipa L (1979) Collagen types in normal and carbonic liver. *Gastroenterology* 76:710-719.
- Roykand M, Gonzalez E (1974) An improved method for determining specific radioactivities of proline-¹⁴C and hydroxyproline-¹⁴C in collagen and non-collagenous proteins. *Anal Biochem* 57:1-7.
- Sah J (1954) N-acetyl and trimethylol hydrates of pyruvical. *J Am Chem Soc* 76:303.
- Schafer DE, Jones EA (1982) Hepatic encephalopathy and the γ -aminobutyric acid neurotransmitter system. *Lancet* 1:18-20.
- Schreier G, Holzer H (1965) Pyruvical-5-phosphate. In Bergmeyer HU (ed): "Methods of Enzymatic Analysis." New York: Academic Press, pp 446-469.
- Tapia R (1977) Biochemical pharmacology of GABA in CNS. In Isenberg LL, Isenberg SD, Snyder SH (eds): "Handbook of Psychopharmacology," Vol. 4. New York: Plenum Press, pp 1-38.
- Tapia R (1981) γ -Aminobutyric acid: Metabolism and neuromodulation of synaptic transmission. In Lajtha A (ed): "Handbook of Neurochemistry," Vol. 3. New York: Plenum Press, pp 423-469.
- Tapia R, Awajana J (1969) Effects of various substituted hydrazones and hydrazones of pyruvical 5' phosphate of brain glutamate decarboxylase. *Biochem Pharmacol* 18:145-152.
- Tapia R, Pazantes H (1971) Relationships between pyruvical phosphate availability, activity of vitamin B₆-dependent enzymes and convulsions. *Brain Res* 29:111-122.
- Tapia R, Perez de la Mora M, Massieu G (1969) Correlative changes of pyruvical kinase, pyruvical 5' phosphate and glutamate decarboxylase in brain during drug-induced convulsions. *Ann NY Acad Sci* 160:257-266.
- Wada H, Snel EE (1961) The enzymatic oxidation of pyruvate and pyruvylamine phosphates. *J Biol Chem* 235:2069-2084.
- Ward JD, Abraham DE (1971) The comparative effects of various hydrazones on γ -aminobutyric acid and its metabolism. *J Neurochem* 18:1017-1025.
- Wu JY (1976) Glutamate decarboxylase. In Roberts E, Chase TN, Tower DB (eds): "GABA in Nervous System Function." New York: Raven Press, pp 7-35.
- Zerangue ML, Juliano E, Racagni G, Baraldi M (1982) Metabolism and uptake of γ -aminobutyric acid in galactosamine-induced hepatic encephalopathy in rats. *J Neurochem* 38:1216-1222.



T R A B A J O 4

" FUNCTIONAL CHANGES OF BRAIN MITOCHONDRIA DU
RING EXPERIMENTAL HEPATIC ENCEPHALOPATHY "

FUNCTIONAL CHANGES OF BRAIN MITOCHONDRIA DURING EXPERIMENTAL
HEPATIC ENCEPHALOPATHY.

Mauricio Diaz-Muñoz and Ricardo Tapia

Departamento de Neurociencias. Instituto de Fisiología Celular.
Universidad Nacional Autónoma de México. 04510 México. D.F.,
México

Running title: Brain mitochondria during hepatic encephalopathy

Correspondence should be sent to:

Ricardo Tapia

Instituto de Fisiología Celular

Universidad Nacional Autónoma de México

Apartado Postal 70-600

04510 México D.F., México

Tel. (055) 550-5215 ext.- 4935

Abbreviations used: HE. hepatic encephalopathy; INP, 2,4-
dinitrophenol.

Abstract - Several functional parameters were studied in a non-synaptic population of brain mitochondria from rats made cirrhotic by chronic treatment with carbon tetrachloride, with and without coma produced by a single injection of ammonium acetate. The following changes were observed in mitochondria from cirrhotic rats, independently of the presence of coma: a) a large decrease in oxygen consumption with pyruvate-malate as substrates, but not with succinate, in both states 3 and 4; b) a modified volume oscillation pattern, characterized by a notable diminution in the amplitude of the oscillation; c) an altered pattern of acyl groups, with a decrease in the proportion of unsaturated with respect to saturated fatty acids. The following parameters were also measured in brain mitochondria from the cirrhotic rats and were found unchanged: a) malate dehydrogenase and ATPase activities; b) cytochrome content; c) phospholipid composition; d) total fatty acids content. The possible significance of the changes observed is discussed in terms of the membrane and biochemical alterations that might be involved in the mechanism of hepatic encephalopathy.

Hepatic encephalopathy (HE) may occur during acute or chronic liver failure, and is characterized by behavioral abnormalities, deficiencies in memory and attention, distal tremor, asterixis, and other neurological signs. Progressive impairment of consciousness and finally coma may result. The pathogenesis of this syndrome is still unknown, though the various factors that have been proposed to be involved in HE are impairment of cerebral bioenergetic function (1) and alterations of neuronal membrane composition (2).

Chronic treatment with carbon tetrachloride (CCl_4) produces hepatic failure, and the subsequent administration of ammonium results in coma (4,5). In the present work we have used this experimental model to study several functional parameters of brain mitochondria during liver cirrhosis and HE. We have measured the activity of some mitochondrial enzymes linked to oxidative phosphorylation, as well as the mitochondrial cytochromes content, oxygen consumption, volume oscillation and lipid composition.

MATERIALS AND METHODS

Experimental Groups. Male Wistar rats, weighing 90-100 g, were used. Liver cirrhosis was induced by the intraperitoneal administration of 0.15 ml of CCl_4 in vegetable oil (1:5 by vol), three times weekly for two months, for a total of 20 doses. Coma, defined in behavioral terms as an unresponsive state with a complete loss of reflexes and of muscular tone, was induced by a single dose of ammonium acetate (5.2 mmol/kg) administered 24 h

after the last injection of CCl_4 (6). Four groups of animal were used: a) rats receiving vegetable oil + sodium acetate (control); b) vegetable oil + ammonium acetate; c) CCl_4 + sodium acetate; and d) CCl_4 + ammonium acetate. At the time of coma animals were sacrificed and brain, liver and blood samples were taken for the assays described below.

Preparation of Brain Mitochondria. Free, noncytochrome c mitochondria, obtained by the Ficoll gradient procedure described by Lai and Clark (7), were used for all determinations. Free mitochondria were obtained from 4 pooled forebrains (a left olfactory bulb) after homogenization in 0.02 M sucrose containing 1mM EDTA and 10mM Tris-HCl, pH 7.4. The Ficoll used for the gradients was dialyzed overnight against glass-distilled water, and the density of the Ficoll solution was determined using a specific-gravity bottle. The final mitochondrial fraction was resuspended in the homogenization medium after being washed twice with albumin-containing medium. The yield routinely obtained was 375 mg of mitochondrial protein per g of tissue.

Submitochondrial particles were prepared from the mitochondrial fraction according to Bachler and Horstmann (8). The fraction was sonicated in a Lunham sonicator at 400 for 3 periods of 2 min with one min intervals. After one centrifugation at 10,000 g for 15 min to sediment the intact mitochondria, the supernatant was centrifuged at 45,000 g for 30 min to obtain the submitochondrial particles.

Enzyme Assays. All assays were carried out spectrophotometrically at 25°C. Triton D-100 (0.1% final

concentration) was present in the assays to ensure maximal enzyme activity. Lactate dehydrogenase (EC 1.1.1.27) and malate dehydrogenase (EC 1.1.1.37) were estimated by following NADH oxidation at 340 nm (3). Acetylcholinesterase (EC 3.1.1.7) was assayed colorimetrically by the method of Ellman et al. (10). ATPase (ATP phosphorylase, EC 3.6.1.3) was measured in the submitochondrial particles in an ATP-generating medium, according to Pullman et al. (11).

Mitochondrial respiration. Oxygen uptake was measured polarographically with an oxygen-sensitive electrode as described by Clark and Nicksie (12), in a medium containing 225 mM mannitol, 75 mM sucrose, 5 mM phosphate/Tris, 10 mM-Tris-HCl, 0.05 mM- Mg-EDTA and 5 mM- KCl , pH 7.4. State 3 conditions were initiated by the addition of 0.5 mM ADP in the presence of the substrates indicated in Results. The respiratory control ratio was the ratio state 3/state 4 (13). NADH (16 mM) was added to the mitochondrial and submitochondrial fractions in order to corroborate the integrity of the former and the metabolic activity of the latter.

Cytochrome measurements. Cytochromes c, b and aa₃ were detected at room temperature in a Aminco-Chance dual wavelength spectrophotometer. Samples were mitochondrial fractions subjected to one freeze-thaw cycle and reduced by the addition of 10 mM sodium hydrosulfite (dithionite). Extinction coefficient for each cytochrome was taken from Wilson and Egel (14).

Mitochondrial oscillations. Periodic changes in mitochondrial volume were followed by continuous measurement of

light absorption at 650 nm at room temperature, according to the method described by Packer et al. (15), in a medium containing about 1 mg mitochondrial protein, 100 mM sucrose, 10 mM Tris-HCl, 0.3 mM Tris-EDTA and 10 mM succinate, pH 8. Other additions are indicated in Results.

Lipid composition. Lipid constituents were extracted by the Folch method (16). The phospholipids cardiolipin, phosphatidylcholine, phosphatidylethanolamine, phosphatidyl-inositol and phosphatidylserine, together with phosphatidic acid, were separated according to the procedure of Garcia-Sainz and Fain (17), and after hydrolysis phosphate was measured by the Ames method (18).

Methyl esters of fatty acids from lipidic extracts were prepared for gas-liquid chromatography as described by Huang and Sun (19), and analyzed with a Hewlett Packard 7620A chromatograph equipped with dual flame ionization detectors. Methyl esters were separated on a 100 cm x 0.2 cm glass column packed with 10% SP-1200 on 100/120 Chromosorb W AW 1-100 (Gualico, Inc., Bellefonte, Pa. USA). The operating column temperature was 190°C, helium, the carrier gas, was delivered at a rate of 15 ml/min at a pressure of 40 psi. Peaks of fatty acids were identified by comparison with standards (Sigma Co.) and quantified with the help of a Hewlett-Packard integrator.

Electron microscopy. The resuspended mitochondrial fraction was fixed in 1% glutaraldehyde. After 2 h, the samples were centrifuged at 9000 g for 5 min, and the pellet was washed with Millonig medium (20), postfixed with 1% OsO₄ in Millonig medium, dehydrated stepwise with ethanol and propylene oxide and

embedded in Epon. Sections were cut on an LBE ultramicrotome, and stained with uranyl acetate and lead citrate.

Determination of serum metabolites. Serum glutamic-pyruvic transaminase was determined according to Reitman and Frankel (21). conjugated and unconjugated bilirubin were measured as described by Malloy (22) and albumin by the method of Garnall et al. (23).

Protein was determined by the method of Lowry et al. (23).

RESULTS

Liver function. Chronic CCl_4 treatment resulted in liver failure manifested by notable increases in liver weight, serum glutamic-pyruvic transaminase and bilirubin, and decreased serum albumin. The changes in these parameters were quantitatively very similar to those previously described (4,5) and therefore are not shown here. The cirrhotic rats that received ammonium acetate showed the symptoms of coma mentioned under Materials and Methods, 15-20 min after injection.

Mitochondrial fraction. The purity of the brain mitochondrial fraction was examined by electron microscopy. The fraction was enriched in well preserved mitochondria and essentially free from synaptosomes and myelin, confirming the results reported by Lai and Clark (7).

The distribution of some marker enzymes in the mitochondrial fraction in the four experimental groups is shown in Table 1. Whereas the concentration of lactate dehydrogenase and acetylcholinesterase is low, malate dehydrogenase, as expected,

was concentrated in this fraction. This pattern of enzyme distribution was not altered by CCl_4 or NH_4F treatment.

Substrate oxidation. Respiration of brain mitochondria from the four groups of experimental animals is summarized in table 2. With pyruvate-malate as substrate the mitochondria derived from CCl_4 -treated rats, both non-comatose and comatose, showed a notable decrease of oxygen consumption in both state 4 and state 3, as compared with the non-diphotic rats. This inability to oxidize pyruvate-malate was evident even in the presence of the uncoupler 2,4-dinitrophenol (DNP). Nevertheless, the stimulation of respiration during state 3 was of similar magnitude in the treated and control groups and consequently the respiratory control did not change. In contrast to the differences observed with pyruvate-malate, when succinate was added as substrate oxygen consumption was not affected in the diphotic animals.

ATPase activity. This enzyme was measured in the submitochondrial particles. No differences were observed between CCl_4 -treated and control rats or between comatose rats and noncomatose rats. The values were (micro/mg protein): oil + Na, 1.8 ± 0.2 ; oil + NH_4F , 1.7 ± 0.4 ; CCl_4 + Na, 1.7 ± 0.2 ; CCl_4 + NH_4F , 1.5 ± 0.3 ($n = 4$).

Cytochrome content. The cytochromes concentration found was similar to that reported (7) for nondysplastic mitochondria. No changes were observed in the cytochrome content of mitochondria during the HE or the comatose state. The ratio of cytochromes c:b₅₆₂ was 2.50:1.04:1.00 in all experimental groups.

Mitochondrial volume regulation. Oscillation of

mitochondrial volume resembles a damped harmonic oscillator and several parameters have been established to describe it (15). These parameters, obtained from traces such as those of Fig. 1, which were initiated by the addition of succinate, are shown in Table 3. It can be observed that in mitochondria from cirrhotic rats there is a diminution (44%) in expansion, and a notable decrease in contraction (34%), as compared to control mitochondria. This pattern is reflected in a 100% increase in damping factor in the CCl₄-treated rats.

Phospholipid composition. The phospholipid composition of brain mitochondria is shown in Fig. 2. This composition was similar to that of mitochondria from other tissues, both excitable (26) and non-excitable (26), and it was not altered in the cirrhotic rats.

Acyl group composition. The fatty acids found in the cerebral mitochondria of control groups were similar to those previously reported (27). The more abundant acyl groups detected were 16:0, 18:1, 18:0, 22:6 and 20:4, and the ratio unsaturated/saturated fatty acids was 1.38 (Table 4). These fatty acids accounted for more than 90% of the total identified acyl groups. Although the total acyl group content did not change, the mitochondrial fatty acid pattern of cirrhotic rats, both comatose and non-comatose, was profoundly altered. The two more abundant unsaturated fatty acids, 18:1 and 22:6, decreased, while the saturated fatty acids increased. As a consequence, the unsaturated/saturated ratio decreased by 33% and 26% in non-comatose and comatose cirrhotic rats, respectively.

DISCUSSION

The experimental model of HE in the rat used in this work has been shown to be equivalent to the human portal-systemic encephalopathy (6). In fact, the hepatic functional tests and the induction of coma by NH₄ in the CCl₄-treated rats are similar to the clinical symptoms described in cirrhotic patients (1).

Alterations in the cerebral energy-related metabolism have been associated with HE (2). Consistently with this proposal, in HE the cerebral rate of oxygen consumption and the cerebral blood flow decline roughly in parallel with the severity of the neurological alterations (2,3). Although the changes in whole brain ATP and phosphocreatine are modest, failures in glycolysis and the tricarboxylic acid cycle seem to occur as a consequence of the chronic high levels of ammonia which are characteristic of this syndrome (2,4). In spite of this, the possibility that such alterations might be associated to functional disturbances of brain mitochondria during HE had not been explored previously.

Several populations of brain mitochondria have been described, differing in their location (synaptic, neuronal or glial), morphology (5) and enzyme content (6). The nonsynaptic mitochondria used in the present investigation, most probably derived from neuronal and glial areas (7), were metabolically active and well coupled, both with pyruvate and malate as substrates for site I and with succinate for site II (Table 2). The mitochondrial fraction used was also capable of oxidizing other substrates as citrate, glutamate, α -oxoglutarate and acetate (data not shown), as it has been previously reported (7).

In control rats the respiratory parameters with substrates for sites I and II were similar to those previously reported (7). The decreased respiration observed in the mitochondria from the cirrhotic rats, when pyruvatemalate was used as substrate, might be explained either by a failure in the transport of the substrates into the mitochondria or by an impairment in the activity of site I. The former possibility seems improbable, since the carriers for pyruvate and malate are different (12) and it would therefore be necessary to postulate that both carriers were affected. On the other hand, the fact that no alterations were observed with succinate as substrate, together with the normal response to ADP, suggests an efficient electron-transfer chain function. These data indicate that the decreased respiration with pyruvatemalate is probably due to a possible specific failure of site I in the cirrhotic rats. This interpretation is supported by the observation that neither the cytochrome content nor the ATPase activity were affected in submitochondrial particles from the experimental animals.

Oscillations of mitochondrial voltage have been related to several phenomena, including proton and ion diffusion, energy-linked ion translocation and membrane structural modifications reflecting changes in its molecular conformation (15). Changes in any of these parameters could be involved in the alterations of mitochondrial oscillation observed in the cirrhotic rats. However, since succinate was used as substrate, and as discussed above the electron-transfer chain and oxidative phosphorylation seem to be unaffected, it is probable that membrane modifications may be responsible for the decreased

oscillation parameters. The results of the acyl group determination support this possibility. Since a notable decrease in the mitochondrial unsaturated fatty acids was observed in the cirrhotic rats, without any change in the phospholipid pattern. In fact, it is known that mitochondria depleted of unsaturated fatty acids display an abnormal oscillatory behaviour (33), probably because this modification of the acyl hydrophobic moiety results in a diminished fluidity of the mitochondrial membrane with a consequent limitation in the function of ion carriers.

The neurological symptoms of HE have been generally ascribed to extracerebral factors appearing as a consequence of liver failure, such as hyperammonemia, increased plasma levels of short-chain fatty acids, increased levels of ceruleans in blood and cerebrospinal fluid and the presence of false neurotransmitters as octopamine (34). Brain dysfunction, including the structural alterations of glial cells observed in HE (35), could be the results of the effect of these factors. At the present time it is difficult to suggest a mechanism for the alterations of brain mitochondrial function observed in this study as a consequence of hepatic damage. They could be the result of the action of one or more of the factors mentioned, or of other unidentified metabolic alterations. Equally difficult is to relate our findings to the pathogenesis and development of HE. All that can be said in this respect is that HE must be considered as a multifactorial syndrome, whose biochemical mechanism cannot be ascribed to a single specific alteration at a subcellular level in the brain.

REFERENCES

1. Hoyumpa AM and Shenker S. Hepatic encephalopathy. In: Internal medicine (Ed. Scott FM), pp. 3089-3120. Academic Press, New York, 1985.
2. Cooper AJL and Plum F. Biochemistry and physiology of brain ammonia. Physiol. Rev. 67:449-519, 1987.
3. Pappas SI, Fernandez P, Salim N, Vergalla J and Jones EA. Synaptic plasma membrane composition is altered in hepatic encephalopathy. Hepatology 2:708-715, 1982.
4. Diaz-Muñoz M and Tapia A. Regional brain GABA metabolism and release during hepatic coma produced in rats chronically treated with carbon tetrachloride. Neurochem Res 10:37-44, 1985.
5. Diaz-Muñoz M and Tapia A. Glutamate decarboxylase inhibition and vitamin B₆ metabolism in brain of cirrhotic rats chronically treated with carbon tetrachloride. J Neurosci Res in press.
6. Rojkind M. Inhibition of liver fibrosis by L-azatidine-2-carboxylic acid in rats treated with carbon tetrachloride. J Clin Invest 52:2451-2456, 1973.
7. Lai JCR and Clark JB. Preparation of synaptic and non-synaptic mitochondria from mammalian brain. In: Methods in Enzymology, Vol. 55 (Eds. Fleischer S and Packer L), pp. 51-60. Academic Press, New York, 1979.
8. Racker E and Horstmann LL. Partial resolution of the enzymes catalyzing oxidative phosphorylation. 13. Structure and function of submitochondrial particles. J Biol Chem 242:2547-

- 2551, 1967.
9. Leong SF, Lai JCK, Lim L and Clark JB. Energy metabolism enzymes in brain regions of adult and ageing rats. *J Neurochem* 37:1548-1566, 1979.
 10. Eilman GL, Courtney KR, Andres V Jr, and Featherstone RM. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol* 7:88-95, 1961.
 11. Pullman ME, Faneffsky HS, Datta RR and Racker E. Partial resolution of the enzymes catalyzing oxidative phosphorylation. I. Purification and properties of soluble dinitrophenol-stimulated adenosine triphosphatase. *J Biol Chem* 235:3322-3324, 1960.
 12. Clark JB and Nicholas WJ. The metabolism of rat brain mitochondria. *J. Biol Chem* 245:4724-4731, 1970.
 13. Chance B and Williams GH. The respiratory chain and oxidative phosphorylation. *Adv Enzymol* 17:65-134, 1956.
 14. Wilson DF and Spel P. The catecholase system of sea urchin sperm. *Arch Biochem Biophys* 126:35-39, 1968.
 15. Packer L, Utsumi T and Mustafa MG. Oscillatory states of mitochondria. *Arch Biochem Biophys*, 117:331-393, 1966.
 16. Folch J, Lees M and Sloane SM. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem* 226:497-509, 1957.
 17. Garcia-Sainz JA and Fain JN. Effect of insulin, catecholamines and calcium ions on phospholipid metabolism in isolated white fat cells. *Biochem J* 186:731-739, 1980.

18. Ames L. Analysis of phosphate in a lipid sample from animal tissue. *J Biol Chem* 209:773-775. 1966.
19. Huang SF-L and Sun GY. Cerebral ischemia induced quantitative changes in brain membrane lipids involved in phosphoinositide metabolism. *Neurochem Int* 9:185-190. 1986.
20. Leong SF, Lai JG, Lim L and Clark JB. The activities of some energy-metabolizing enzymes in non synaptic (free) and synaptic mitochondria derived from selected brain regions. *J Neurochem* 41:1026-1032. 1984.
21. Reitman S and Frankel S. Determination of serum transaminase activity. *Am J Clin Pathol* 20:56-64. 1957.
22. Malloy HT. The separation of serum pigments giving the direct and indirect Van der Bergh reaction. *J Biol Chem* 119:481-489. 1937.
23. Gannell A, Sandewill C and Davis MJ. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *J Biol Chem* 177:751-766. 1949.
24. Lowry O, Rosebrough N, Farr A and Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265-275. 1951.
25. Chang MCJ and Roots SI. The effect of temperature - and oxygen - acclimation on phospholipids of goldfish (*CARRASINUS auratus* L.) brain mitochondria. *Neurochem Res* 10:1231-1246. 1985.
26. Waring AJ, Rottenberg H, Ohnishi T and Rubin E. Membranes and phospholipids of liver mitochondria from chronic alcoholic rats are resistant to membrane disordering by alcohol. *Proc Nat Acad Sci USA* 78:2562-2566. 1981.

27. Cerafelli E, Dooms EM and Kimura H. Mitochondrial fatty acid composition of brain liver and kidney of the rat. *Biochim Biophys Acta* 151:472-479, 1968.
28. Fazekas JF, Tichkin HE, Ehrentraut WF and Alman RW. Cerebral metabolism in hepatic insufficiency. *Am J Med* 21:343-349, 1956.
29. Wiedde HA, Lockwood AM, Duffy TE and Plum F. Cerebral blood flow and metabolism in chronically hyperammonemic rats: effect of an acute ammonia challenge. *Ann Neurol* 3:325-330, 1978.
30. Fernandez B, Suarez I and Gianonatti G. Fine structure of astrocytic mitochondria in the hypothalamus of hamster. *J Anat* 127:482-488, 1969.
31. Fowler JS, Macgregor RR, Wolf AP, Annett CA, Dewey SL, Schyer D, Christman D, Logan J, Smith M, Sachs M, Aquilonius M, Bjurling P, Halliday G, Hartvig P, Leenders L, Lundqvist H, Orsland L, Staines CG and Lonatrow B. Mapping of human brain monoamine oxidase A and B with ¹⁴C-labeled suicide inactivators and PET. *Science* 235:481-485, 1987.
32. Minn A, Gavet J and Pelegrin P. The penetration of the membrane of brain mitochondria by anions. *J Neurochem* 24:149-156, 1975.
33. Williams MA, Standliff RC, Backer L and Keith AF. Relation of unsaturated fatty acid composition of rat liver mitochondria to oscillation period, spin label motion, permeability and oxidative phosphorylation. *Biochim Biophys Acta* 267:444-456, 1972.

34. Butterworth RF, Gienger JF, Michard J, Lavoie J and Lavyrques GP. Ammonia: Key factor in the pathogenesis of hepatic encephalopathy. *Neurochem Pathol* 6:11-12, 1987.
35. Adams RD and Foley JM. The neurological disorder associated with liver disease. In: *Metabolic and Toxic Diseases of the Nervous System* (Eds. Merritt H and Hare CC). Vol. 32. pp. 198-207. Williams and Wilkins, Baltimore, 1959.

FIGURE LEGENDS

Fig. 1. Oscillations of brain mitochondria from control (A) and cirrhotic (B) rats. The loss of the oscillation pattern was observed in the CCl_4 -treated animals, irrespective of the occurrence of coma. The traces illustrate the oscillation patterns observed in 4 experiments.

Fig. 2. Mitochondrial phospholipids in brain of control, cirrhotic and comatose rats. C, cardiolipins; PC, phosphatidylcholine; PE, phosphatidylethanolamine; PI, phosphatidylinositol; PS + PA, phosphatidylserine plus phosphatidic acid; ., Vegetable oil + Na acetate; ., Vegetable oil + NH_4 acetate; ., CCl_4 + Na acetate (cirrhotic); ., CCl_4 + NH_4 acetate (comatose). The results are mean values of 4 experiments \pm SEM.

Table 1. Enzyme distribution in brain mitochondria from control and cirrhotic rats

Treatment	LDH			AChE			MDH			Protein	
	n	M	M/H	n	M	M/H	n	M	M/H	n	M
Oil + Na Acetate	0.65	0.13	0.21	0.11	0.02	0.24	2.26	14.2	6.50	947	16
Oil + NH ₄ Acetate	0.70	0.16	0.23	0.10	0.02	0.19	2.44	15.2	6.26	960	18
CCl ₄ + Na Acetate	0.62	0.14	0.23	0.12	0.02	0.20	2.21	14.1	6.70	953	17
CCl ₄ + NH ₄ Acetate	0.65	0.16	0.25	0.11	0.02	0.17	2.40	14.8	6.20	958	17

n, homogenate; M, mitochondrial fraction; LDH, lactate dehydrogenase; AChE, acetylcholinesterase; MDH, malate dehydrogenase. Enzyme activities are expressed as $\mu\text{mole/min. per } \mu\text{g}$ of protein, and protein is expressed as $\mu\text{g/fraction}$. Mean values of 4 experiments; the SEM was in all cases less than 10%.

Table 2. Respiration of brain mitochondria from control and cirrhotic rats

Treatment	Pyruvate-malate (5 mM-2.5 mM)				
	ADP/O	State 4	State 3	RCR	SEF
Oil + Na acetate	2.3	13	99	5.2	114
Oil + NH ₄ acetate	2.3	15	95	4.0	112
CCl ₄ + Na acetate	2.7	2	10	5.9	42
CCl ₄ + NH ₄ acetate	2.3	2	9	4.6	46

Treatment	Succinate (10 mM)				
	ADP/O	State 4	State 3	RCR	SEF
Oil + Na acetate	1.9	34	93	2.7	121
Oil + NH ₄ acetate	1.3	39	36	2.5	117
CCl ₄ + Na acetate	1.3	30	94	2.3	126
CCl ₄ + NH ₄ acetate	1.3	42	109	2.5	122

Respiration is expressed as ratios $\mu\text{mol O}_2/\text{mg protein}/\text{min}$. State 3 conditions were initiated by the addition of 0.5 mM ADP. RCR, respiratory control ratio. INP concentration was 0.3 mM. The values are means of 4 independent experiments; the SE% was in all cases less than 12%.

Table 3. Modifications of brain mitochondrial oscillation in cirrhotic rats

Treatment	Damping factor	Amplitude of mitochondrial oscillation ($\mu\text{m} \times 10^3/\text{mg protein}$)	
		Expansion	Contraction
Oil + Na Acetate	7.7 \pm 2.1	34 \pm 4	22 \pm 4
Oil + NH ₄ Acetate	6.9 \pm 1.0	32 \pm 5	21 \pm 4
CCl ₄ + Na Acetate	15.3 \pm 2.2*	20 \pm 4*	4 \pm 2*
CCl ₄ \pm NH ₄ Acetate	16.3 \pm 2.7*	22 \pm 2*	3 \pm 1*

The criteria used for evaluation of oscillation parameters were according to Packer et al (15). The results are means \pm SEM of 4 experiments.

* $p < 0.05$ as compared to controls.

Table 4. Mitochondrial fatty acid composition in brain of control and diimetic rats

Treatment	Total fatty acids (ug/mg protein)	Composition (%)							Ratio <u>Unsaturated</u> Saturated
		16:0	18:0	18:1	18:2	20:4	22:4	22:6	
Dil + Na acetate	31 ± 4	22.2	13.9	20.7	2.0	12.8	2.7	18.5	1.38
Dil + Me ₂ acetate	29 ± 3	21.8	20.4	20.1	2.6	12.9	2.4	18.9	1.37
CCl ₄ + Na acetate	28 ± 3	24.3	27.9	14.1	2.2	12.9	2.0	15.7	0.91
CCl ₄ + Me ₂ acetate	29 ± 4	25.3	28.6	13.6	2.3	13.5	2.9	15.9	0.98

Total fatty acids values are means ± SEM. Composition is presented as mean relative percentages determined from at least 4 different samples from each experimental group. Fatty acids are designated by the number of carbon atoms followed by the number of double bonds.

FIG. 1

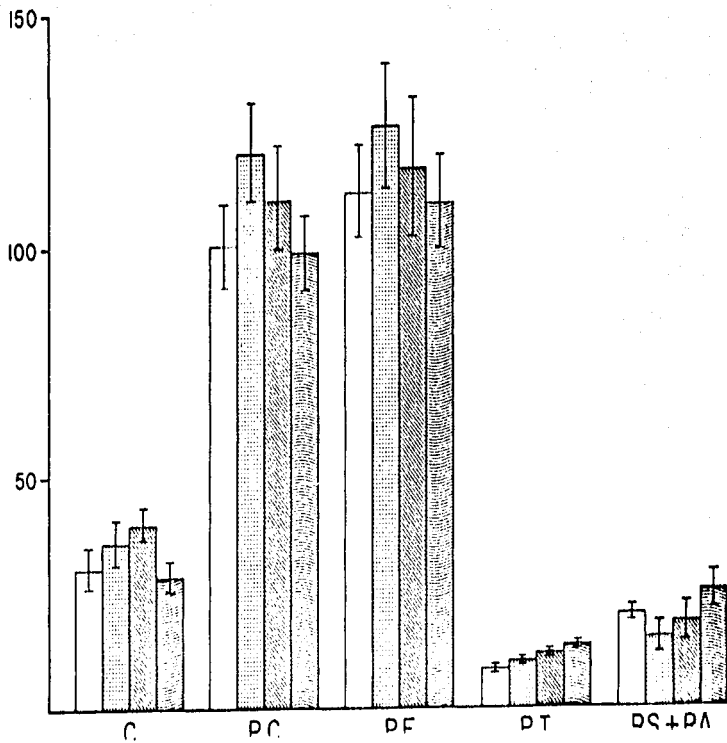
A

B



1 min

FIG. 2



T R A B A J O S

" CARACTERIZACION DE 2 PARAMATROS CONDUCTUALES

Y SU MODIFICACION POR TRANSPLANTES DE TEJIDO

CEREBRAL FETAL EN RATAS

CIRROTICAS "

- CARACTERIZACION DE 2 PARAMETROS CONDUCTUALES Y SU MODIFICACION
POR TRANSPLANTES DE TEJIDO FETAL EN RATAS CIRRÓTICAS -

- Antecedentes.

Los modelos de encefalopatía hepática experimental empleados hasta el momento, carecen de una descripción conductual precisa. A lo más, se hace distinción del estado comatoso del no comatoso, pero, a excepción de algunos reportes, no se ha trabajado en la caracterización conductual de animales experimentales con insuficiencia hepática.

El objetivo de esta parte del proyecto fue estudiar en las ratas cirróticas por tratamiento crónico con CCl₄ la realización de 2 pruebas conductuales. La primera de ellas, relacionada con una tarea de memoria-aprendizaje como es la prevención pasiva, y la segunda consistió en una prueba de actividad motora.

Los resultados obtenidos, y que se detallarán en las siguientes secciones, presentaron una gran semejanza con reportes conductuales llevados a cabo en un modelo de lesión electrolytica en el núcleo estriado anterior de la rata. Ya que en el referido modelo de lesión electrolytica se ha probado con éxito la reversión de las alteraciones conductuales por medio del uso de transplantes de tejido cerebral fetal, se asumió como hipótesis de trabajo que el empleo de la técnica de transplantes cerebrales podría mejorar de manera semejante las alteraciones conductuales de las ratas cirróticas.

El interés por abordar con estas técnicas las alteraciones conductuales que se presentan durante la encefalopatía hepática, estriba en comparar los efectos de los transplantes de tejido

cerebral fetal en un modelo experimental en donde la lesión que provoca las alteraciones conductuales es de carácter metabólico, con los modelos de lesión física o farmacológica ya ampliamente caracterizados.

Es conveniente mencionar que antes de colocar los trasplantes cerebrales de tejido fetal en la ratas cirróticas, se practico una lesión electrolitica puntual en la region aceptora del trasplante. El objetivo de esta pequeña lesión fue doble, por una parte, crear un espacio que facilitara el acomodo del tejido transplantado, y ademas, promover la liberación de factores a partir de la zona dañada que permitieran un desarrollo óptimo del tejido fetal.

- Prevención Pasiva.

Cuando se somete a un organismo a un estímulo aversivo, éste puede responder de varias formas, dependiendo de la instrumentación del paradigma conductual ensayado. Usualmente el estímulo empleado en condiciones experimentales es un choque eléctrico, ya que puede ser cuantificado y manipulado fácilmente. De manera general, el organismo desarrolla una de las siguientes conductas al ser enfrentado con el estímulo aversivo: realice alguna tarea específica, la cual le evita sufrir el estímulo eléctrico, o se inmoviliza y evita cualquier clase de desplazamiento con el mismo fin. La primera de estas conductas se conoce como prevención activa, mientras que la segunda se denomina prevención pasiva.

Un aparato típico para encayar la prevención pasiva consiste

de un pequeño compartimento iluminado con luz brillante que se comunica a través de una compuerta a un segundo compartimento, el cual es oscuro y contiene un dispositivo para recibir corriente eléctrica. En la sesión de adquisición, que es única, la rata se coloca en el compartimento luminoso y después de un periodo de exploración pasa al lado oscuro (2-50 seg). Una vez en el lado oscuro se procede a la aplicación de un choque eléctrico (0.1 watt) durante 3-5 seg; acto seguido se permite a la rata escapar al lado luminoso. Al día siguiente de la adquisición, la rata se vuelve a colocar en el lado iluminado y sin aplicar corriente eléctrica alguna se mide el tiempo que tarda la rata en ingresar al compartimento oscuro. Las ratas normales no pasan al lado oscuro, que asocian con el lugar donde sufrieron el choque eléctrico. Para fines prácticos, se considera que una rata aprendió si no ingresa al lado oscuro en 5 min. Ratas control muestran una curva de olvido característica, tardando alrededor de 10 días en comportarse de nueva cuenta como en la sesión de adquisición.

La discusión de la prevención pasiva en términos de aprendizaje es curiosa, ya que se define exclusivamente en base a la inmovilidad de la rata en el compartimento luminoso. Se asume que la rata debe evitar regresar al lugar donde sufrió el castigo eléctrico. Como una medida práctica, la prevención pasiva es razonable, pero no necesariamente un parámetro de aprendizaje. En las condiciones empleadas se puede considerar a la prevención pasiva como un conflicto entre la prevención no condicionada que los roedores muestran a la luz y la prevención condicionada al choque eléctrico. Además, la respuesta observada bien podría ser

asignada a una disminución del "miedo al choque eléctrico", a un incremento del "miedo a la luz", a un aumento en la conducta exploratoria o a un incremento general de la actividad motora. No olvidemos, sin embargo que la prevención pasiva no es más o menos simple de interpretar que cualquier otra prueba conductual.

Las regiones cerebrales y los sistemas de neurotransmisión implicados en la prevención pasiva no están bien definidos. Sin embargo se acepta que las áreas implicadas en el proceso de memoria y aprendizaje, como son el cuerpo estriado, la amígdala, el hipocampo y otras zonas del sistema límbico, participan de una manera muy importante en la prevención pasiva. En lo que respecta a los sistemas de neurotransmisión, el papel que juegan estos en el paradigma de la prevención pasiva todavía es poco claro.

- Movilidad.

La conducta es movimiento. Cualquier movimiento de un animal en relación a su medio, o cualquier movimiento de una parte de su cuerpo en relación al resto, caen en el contexto de una posible definición empírica de conducta.

Para definir la conducta en términos de movimiento, es necesario enfocar el fenómeno desde un punto de vista físico considerando la energía empleada. Al ser medida por un transductor adecuado, se han desarrollado muchos métodos para detectar y registrar la actividad motora. Esta se considera como la aceleración de una masa, y el resultado es una conducta que puede ser observada.

Entre los métodos para cuantificar la actividad motora se

encuentran la rueda giradora y las pruebas de vibración.

La rueda giradora es uno de los métodos más antiguos para registrar actividad motora. Consiste en un sistema circular-vertical que se pone en movimiento impulsado por el caminar del animal que se estudia, usualmente ratas o ratones. Esencialmente este dispositivo registra desplazamiento. Entre las formas modernas de cuantificar el desplazamiento de los animales experimentales se han implementado el uso de fotoceldas. Un haz de radiación electromagnética cruza la jaula o la caja de registro y cuando el animal se mueve a lo largo de la superficie de la jaula interrumpe el haz infrarrojo (se utiliza luz infrarroja, ya que no es detectada por los roedores), impresionando el sistema de registro.

Varios métodos registran otros movimientos además del desplazamiento. La mayor parte de ellos dependen de la detección del movimiento por las vibraciones transmitidas a través del piso de la jaula. Estas vibraciones mecánicas pueden ser convertidas en señales eléctricas. La fuerza de la señal depende no solo del vigor del movimiento realizado por el animal, sino también de su peso corporal y la postura adoptada.

Más versátil y conveniente es el método que emplea un dispositivo de capacitancia. La caja donde se encuentra el animal a registrar se coloca en un campo electromagnético sintonizado con un circuito oscilador de alta frecuencia (100 MHz), donde funciona a modo de dieléctrico en un capacitor. Cualquier clase de movimiento desintonizará el circuito y este hecho se detecta por un sistema transductor para registrar los movimientos del animal.

La sensibilidad del sistema puede variar, y de esta manera percibirse, ya sea movimientos a gran escala como el desplazamiento de animales grandes, o movimientos tan finos como la respiración de una ratón. Algunos dispositivos presentan dos canales que permiten la medición de ambas clases de movimientos de manera simultánea.

- Procedimiento Experimental.

a).- Grupos Experimentales. Se indujo un estado de disfunción hepática por la administración crónica de CCl₄ en ratas Wistar macho siguiendo el protocolo detallado en los artículos que forman parte de esta tesis. Los animales controles recibieron dosis de aceite vegetal. Después de ensayar las pruebas conductuales los grupos experimentales fueron sometidos a una lesión electrolítica bilateral en el núcleo caudado, con el objeto de preparar una cavidad receptora al tejido fetal implantado y de promover la liberación de factores necesarios para el desarrollo exitoso del trasplante cerebral (las coordenadas estereotáxicas fueron las siguientes: anteroposterior +0.05, lateral +3.2 y vertical -5.8).

La lesión se produjo en ambos núcleos caudados haciendo pasar una corriente de 1 mA durante 1 min, bajo anestesia con halotano, y retirándose el electrodo de lesión después de 1 min de reposo. A las ratas lesionadas se les concedió un lapso de 5 - 10 días de recuperación postquirúrgica, y se volvió a evaluar su actuación en los parámetros conductuales estudiados. Los animales lesionados fueron divididos en 2 subgrupos: a) como control-

testigo y b) para ser receptores de los trasplantes de tejido fetal. A lo largo de todo el experimento se mantuvo un grupo de ratas cirróticas intactas con sus correspondientes controles, como testigos temporales.

b).- Trasplantes cerebrales. Los explantes de tejido fetal se obtuvieron de fetos de 16 días de gestación, mientras la madre portadora se encontraba bajo anestesia por pentobarbital. Se procedió a la disección cuidadosa de los dos núcleos estriados fetales y, mantenidos en solución fisiológica, el tejido fue aspirado en una microjeringa que se adaptó al aparato de estereotaxia. Este tejido fue implantado por inyección en las dos regiones previamente lesionadas. Después de serles colocados los trasplantes a las ratas cirróticas y al grupo control, se permitió un período de 2 semanas de recuperación quirúrgica y de maduración del tejido fetal, antes de volver a ensayar las pruebas conductuales.

c).- Pruebas conductuales. El paradigma de prevención pasiva se ha descrito ya, y se ensayó según el método reportado por Silverman (11). El movimiento fue evaluado con cajas Steeling según la técnica reportada por Tapia (12).

d).- Determinación de metabolitos séricos. Las pruebas de funcionamiento hepático, que ya han sido mostradas y comentadas en los artículos aneros, mostraron que los grupos experimentales se comportaron conforme a lo esperado. Las ratas tratadas con el CC14 continuaron mostrando signos de disfunción hepática durante todo el rango temporal en que transcurrió el presente

experimento. Lo anterior corrobora que las ratas tratadas con el hepatotóxico y que fueron sometidas a los trasplantes cerebrales conservaron durante toda la duración del experimento la condición cirrótica y las alteraciones asociadas a la encefalopatía hepática.

- Resultados.

En la Tabla I se detallan los resultados obtenidos en relación a la prueba de prevención pasiva. Durante la sesión de prueba en el grupo control inicial, la totalidad de las ratas evitaron pasar a la parte oscura de la cámara de castigo al menos durante 600 seg. mientras que las ratas cirróticas lo hicieron en 43 seg como promedio. En las ratas control se presentó una curva de extinción normal. Este comportamiento se mantuvo en las ratas lesionadas electrolíticamente, ya que la intensidad de corriente y el tiempo utilizado durante la lesión, solo fue suficiente para producir un daño pequeño. Sin embargo, un alto porcentaje (75%) de las ratas cirróticas que recibieron trasplante, presentaron un incremento muy significativo e impresionante en sus tiempos de espera de la zona iluminada a la oscura (3 con más de 600 seg. y las otras 3 con tiempos de 460, 487 y 503 seg). Las ratas cirróticas intactas, que funcionaron a modo de control temporal en el experimento, siguieron presentando una respuesta similar al grupo cirrótico estudiado a la semana siguiente de haber terminado el tratamiento con CC14.

En la Tabla II se encuentran los resultados de los experimentos de movilidad, expresados como unidades por 2 horas de prueba. Es de hacer notar que todos los experimentos de

movilidad se verificaron entre las 19.00 y las 20.00 hr. para evitar fluctuaciones circadianas del parámetro estudiado. Se puede observar que el grupo de ratas cirróticas, recién terminada la administración del hepatotónico, presentó un incremento significativamente estadístico, de un 61%, en relación al grupo tratado únicamente con el aceite vegetal. A pesar de que la lesión electrolítica bilateral se realizó de manera discreta, tanto el grupo control como el cirrótico presentaron un ligero incremento en la movilidad (13% y 3% respectivamente), pero ninguno de estos resulta significativo. Las pruebas llevadas a cabo en los grupos experimentales que recibieron el trasplante de núcleo estriado fetal no mostraron diferencia alguna con el patrón híbrido antes del trasplante. Esto es, las ratas cirróticas siguieron presentando un aumento en la motilidad (49%), a pesar de haber recibido los trasplantes de tejido fetal.

Los resultados obtenidos en estas 2 pruebas, prevención pasiva y movilidad, en ratas intactas fueron muy similares a los observados en los grupos controles en todos los casos y a través de todas las manipulaciones ya referidas.

En conclusión, las ratas cirróticas presentaron alteraciones notables en la ejecución de los paradigmas conductuales de prevención pasiva y de movilidad, caracterizándose por una falta de respuesta en la primera y un incremento importante en la segunda. El trasplante de núcleo estriado fetal revirtió en la mayor parte de los animales estudiados la falta de respuesta en la prueba de prevención pasiva, pero no tuvo mayor efecto sobre

la alteración motriz.

- Discusion.

Ya se ha reportado extensamente (13) que animales experimentales con lesiones severas en el cuerpo estriado anterior presentan un deterioro en la conducta de aprendizaje y un aumento general en la actividad motriz. La observación de que los mismos síntomas se presentaron en las ratas con disfunción hepática sugirió que, independientemente de que las alteraciones neuroquímicas durante la encefalopatía hepática no están bien caracterizadas, ni se conocen con precisión las regiones cerebrales que participan en este síndrome, las modificaciones conductuales observadas en las ratas cirróticas pudieran ser consideradas como resultado de un daño metabólico en el cuerpo estriado equivalente al producido por lesiones electrolíticas o farmacológicas.

En relación a la conducta de aprendizaje manifestada en la prueba de prevención pasiva, varios trabajos han implicado la transmisión colinérgica del cuerpo estriado anterior como uno de los sistemas claves en el proceso (14). Asimismo es ampliamente reconocida la participación del cuerpo estriado, como parte de los ganglios basales, en la regulación y modulación extrapirramidal de la actividad motora (15). En este contexto, la inervación dopaminérgica desempeña un papel importante en la fisiología del cuerpo estriado en relación a la movilidad.

El argumento anterior sirvió de base para la hipótesis de que se podría lograr una mejoría de las alteraciones metabólicas que caracterizan a la encefalopatía por medio de los trasplantes

cerebrales de tejido fetal, y que como consecuencia se pudiera revertir o atenuar las alteraciones conductuales en la prevención pasiva y en la movilidad que presentaron las ratas cirróticas.

El éxito que se observó en la respuesta de las ratas cirróticas transplantadas en la prueba de prevención pasiva no se puede circunscribir, ni referir a un evento o fenómeno específico. Esto se debe a que, como se indicó en el inicio de esta sección, la prevención pasiva implica varios niveles jerarquizados del funcionamiento del sistema nervioso para llevarse a cabo. En este sentido se hace necesario un número más amplio de paradigmas conductuales para contextualizar la fase o faceta del fenómeno de aprendizaje que se ve comprometido por la encefalopatía hepática y de esta manera inferir un posible mecanismo de recuperación por parte de los trasplantes de tejido fetal.

Como se comentó en los resultados, la actividad motora alterada que presentaron las ratas cirróticas no se vio normalizada por los trasplantes, a diferencia de la respuesta en la prueba de prevención pasiva. Este hecho puede explicarse de varias formas: la modificación original puede no localizarse total o parcialmente en el núcleo caudado; el trasplante, al interaccionar con el cerebro de la rata aceptora, pudo haber influido en ciertas conexiones nerviosas, pero no en otras, de tal forma que la inervación colinérgica pudo ser "reparada", por lo que la ejecución de la prevención pasiva mejoró. Pero el sistema dopaminérgico pudo no ser modificado por la interacción con el tejido fetal por lo que la alteración en la motilidad

persistió: la posible modificación que sufrió el cerebro de la rata cirrótica aceptora pudo desencadenarse por la lesión electrolítica, realizada para implantar el trasplante, explicándose este fenómeno por la liberación de ciertos factores tróficos. Cualquiera que sea la explicación se clarificará este punto con el estudio y la interpretación de parámetros neuroquímicos.

- Conclusiones.

Las alteraciones conductuales que presentaron las ratas cirróticas representan una herramienta diagnóstica que permite identificar estados de encefalopatía hepática, sin necesidad de recurrir a la condición extrema que es el coma. De esta manera, surge como posibilidad estudiar las modificaciones neuroquímicas y neurofisiológicas que la distensión hepática produce en el sistema nervioso central en estados precómicos a través de paradigmas conductuales.

A pesar de que la encefalopatía hepática debe considerarse como un síndrome cuyas alteraciones funcionales son ubicuas en muchas regiones del sistema nervioso, la conducta modificada en la prevención pasiva y en la motilidad general permitió hacer una disección conceptual de las zonas cerebrales más afectadas, e identificar de este modo las de mayor injerencia en la generación del problema observado, como fue en este caso el cuerpo estriado.

Existen numerosos reportes en que se muestra mejoría a lesiones físicas y farmacológicas en el sistema nervioso gracias al empleo de trasplantes de tejido fetal (10). En este trabajo se sugiere que esta técnica es capaz de revertir cierta conducta

originada por una lesión de tipo metabólico, como fue la falta de respuesta en la prueba de prevención pasiva en las ratas cirróticas.

Posteriores estudios, sobre todo los de naturaleza neuroquímica podran sugerir algun posible mecanismo para explicar la recuperacion de las ratas cirróticas que recibieron el trasplante en la prueba de prevención pasiva y la falta de efecto en la prueba de movilidad.

- Perspectivas.

Varios tipos de experimentos deben aun realizarse para que esta parte del proyecto se pueda considerar completa. Un ejemplo de ellos es la utilizacion de trasplantes heterotopicos. Estos grupos controles contemplan 2 enfoques experimentales: en uno de ellos se selecciona una region cerebral fetal, diferente al estriado, y se coloca en el estriado adulto de las ratas tratadas; en el otro el estriado extraido de los fetos se coloca en una region diferente al estriado adulto. Estos 2 experimentos darnian informacion, el primero, sobre la especificidad que debe tener el trasplante para ser exitoso, ya que la conducta podria recuperarse simplemente colocando cualquier fragmento de tejido cerebral fetal en el estriado adulto; y el segundo, sobre algun posible factor o factores tróficos que pudieran ser liberados por el estriado transplantado y que a distancia interaccionaran con el estriado metabólicamente dañado por la disfuncion hepática.

Es necesario tambien caracterizar el curso temporal de la recuperacion conductual inducida por el trasplante, ya que es

posible una reversión de la mayoría al persistir la disfunción hepática, la cual se presenta con carácter de irreversible por el tratamiento crónico con CCl4.

TABLA I

ALTERACION EN LA RESPUESTA A LA PRUEBA DE PREVENCIÓN PASIVA EN RATAS CIRRÓTICAS TRATADAS CRÓNICAMENTE CON
TETRAFLUORURO DE CARBONO.

Tratamiento	n	Sesiones (seg)			
		Adquisición	1ra.	2da.	3ra.
Intactas	8	25 ± 4	600	340 ± 70	59 ± 10
Cáritano	18	19 ± 6	600	381 ± 52	40 ± 9
CCl ₄	18	38 ± 9	43 ± 7	35 ± 6	46 ± 8
Cáritano + Lesión	16	23 ± 4	600 (10) 542 ± 62 (6)	278 ± 80	39 ± 15
CCl ₄ + Lesión	16	26 ± 6	30 ± 8	36 ± 10	28 ± 7
Cáritano + Transplante	8	18 ± 4	600 (6) 569 ± 12 (2)		
CCl ₄ + Transplante	8	19 ± 9	600 (3) 483 ± 13 (3) 54 ± 17 (2)		

El estado cirrótico fue producido por la administración de 20 dosis de 0.15 ml de una solución 1:6 de CCl₄ en cáritano. La lesión electrofítica previa al transplante, y el transplante de tejido estriado fetal se llevaron a cabo como se menciona en el texto.

La primera sesión se verificó después de 24 hrs. de la sesión de adquisición; la segunda y tercera sesiones se realizaron a los 2 y 6 días después de la primera sesión, tal y como se refiere en el texto.

Las cifras en seg. indican el tiempo en que el animal permaneció en el comportamiento iluminado, a los 600 seg se dio por terminado el experimento (para más detalles ver el texto).

Las diferencias entre los grupos experimentales, cirróticos v.s. controles, fueron altamente significativas ($p < 0.001$) excepto en los grupos transplantados.

Los resultados están expresados como promedio ± error standard

TABLA II

ALTERACION DE LA ACTIVIDAD MOTORA EN RATAS CIRRÓTICAS TRATADAS CRÓNICAMENTE CON CCl_4

Tratamiento	Actividad Motora (unidades arbitrarias)	n
Intactas	6 782 \pm 435	8
Cártamo	6 336 \pm 486	18
CCl_4	10 917 \pm 573	18
Cártamo + Lesión	7 699 \pm 500	16
CCl_4 + Lesión	11 790 \pm 636	16
Cártamo + Transplante	7 175 \pm 479	8
CCl_4 + Transplante	10 667 \pm 712	8

El estado cirrótico fue producido por la administración de 20 dosis de 0.15 ml de una solución 1:6 de CCl_4 en cártamo.

La medición de la actividad motora se realizó en todas las ocasiones de las 18:00 a las 20:00 hr.

Las diferencias entre los grupos tratados con CCl_4 y los grupos controles, fueron en todos los casos estadísticamente significativas ($p < 0.02$).

Los resultados están expresados como promedio \pm error standard.

- DISCUSION GENERAL -

- MECANISMOS IMPLICADOS EN LA GENERACION DEL ESTADO COMATOSO.

Se conocen varias situaciones y agentes asociados a la genesis del coma. que como en el coma hepatico, cursan sin alteraciones estructurales importantes y son potencialmente reversibles. Entre ellos se encuentran el coma por etanol, anestésicos, hipoglucemia y uremia. Cúvas bases neuroquímicas y neurofisiológicas se desconocen. De los varios mecanismos que se han sugerido, un cambio en la estructura y función de las membranas neuronales, así como anomalías en el metabolismo de los neurotransmisores son de gran interés. En contraste, los cambios en el flujo energético cerebral se han considerado generalmente como fenómenos secundarios, aunque estudios en zonas críticas o células específicas pueden modificar este punto de vista. La información sobre la composición de las membranas neuronales en modelos experimentales de falla hepática fulminante o de encefalopatía porto-sistémica, y de los efectos que sobre ella ejercen varias toxinas, es escasa, a pesar de la observación que la exposición a etanol y varios anestésicos pueden incrementar la fluidez de las membranas sinaptosomales. Además, el amonio y otras "neurotoxinas" postuladas pueden alterar el flujo iónico y la conductancia de los impulsos en estas membranas de una manera reversible. A lo anterior se suma un probable papel de los falsos neurotransmisores originados por el perfil de aminoácidos alterado durante la encefalopatía porto-sistémica, así como cambios en los aminoácidos excitatorios, ácidos glutámico y

aspártico, y en los neurotransmisores inhibitorios, GABA y glicina.

La serie de observaciones que involucran al GABA en la genesis del coma ya han sido descritas en esta tesis (ver el trabajo publicado en Neurochem. Res.). Un aspecto interesante es que se ha reportado una disminucion de los sistemas de neurotransmisores excitatorios, el noradrenérgico y el aspártatergico, en modelos experimentales y en observaciones en autopsias de pacientes cirróticos (17). Estas alteraciones en el balance y desequilibrio de los neurotransmisores, inhibidores y excitadores, pueden estar estrechamente relacionadas con la genesis del estado comatoso.

Finalmente, el papel de la barrera hematoencefalica durante la encefalopatía hepática es incierto. Una fragilidad de la barrera hematoencefalica se ha reportado en algunos estudios de animales con falla hepática fulminante, aunque no está claro si este fenomeno es causa o efecto del estado comatoso. Se ha observado edema cerebral en pacientes con falla hepática fulminante y las células astrogliales, que metabolizan preferencialmente el amonio y que se encuentran morfológicamente alteradas en la encefalopatía hepática, forman parte importante de la barrera hematoencefalica. Los cambios estructurales en la barrera hematoencefalica en animales modelo con encefalopatía portosistémica son mas sutiles y las anomalías primarias pueden ser de naturaleza química en las proteínas membranales. Posteriores estudios de las bases neuroquímicas y neurofisiológicas de la encefalopatía hepática en general y del estado comatoso en particular, son necesarios para tratar de resolver estos interrogantes.

- CONCLUSIONES.

1.- Las pruebas de funcionamiento hepático, así como los datos de la literatura, demuestran que el modelo experimental empleado, el tratamiento crónico con CC14, es similar y representativo de un daño hepático característico del cuadro fibrotico encontrado en pacientes cirróticos. Las repercusiones que la disfunción hepática genera en el funcionamiento del sistema nervioso, aunado al carácter crónico que tiene el tratamiento con el hepatotóxico, se ajustan a la descripción de encefalopatía portosistémica enunciada por Hoyumpa y Roberts (18).

2.- El estado de encefalopatía portosistémica generado por el tratamiento crónico con el hepatotóxico, se ve confirmado por la inducción de un estado comatoso, tras la exposición a un agente precipitante como lo es el acetato de amonio, en dosis subumbrales e inoivas para los grupos controles.

3.- De manera adicional a la inducción del coma, las ratas cirróticas presentaron alteraciones conductuales como la falta de respuesta en la prueba de prevención pasiva y un incremento importante en la movilidad general, parámetros que caracterizarían un estado precomatoso en las ratas tratadas.

4.- Se observaron varias alteraciones del sistema GABAérgico en los estados precomatoso y comatoso del tratamiento, siendo las principales las siguientes:

a) Una inhibición generalizada de la glutamato descarboxilase durante el estado comatoso en todas las regiones del encéfalo

estudiadas, corteza, núcleo estriado, hipotálamo, hipocampo, mesencefalo y cerebelo, en presencia de PLP exógeno en el ensayo.

b) Una disminución de la GABA transaminasa en las regiones estudiadas, con la excepción de la corteza y el cerebelo también durante el estado comatoso.

c) La liberación de 3H-GABA en sinaptosomas, se vio disminuida en el estriado y el cerebelo, y aumentada en el hipocampo previamente a la inducción del coma; durante el estado comatoso se presentó un decremento en el estriado, el mesencefalo y el cerebelo, y un incremento en la corteza y el hipocampo.

d) La captación de 3H-GABA se vio incrementada en las ratas cirróticas, sin importar si estaban o no en coma, en la siguientes regiones: la corteza, el estriado y el hipocampo.

Estos resultados, tomados en conjunto, indican que la transmisión GABAérgica está disminuida durante el coma hepático, no concordando con la hipótesis planteada por varios grupos (19), que postula una mayor eficiencia del sistema GABAérgico durante la encefalopatía hepática.

5.- La disminución en la actividad de la glutamato descarboxilasa no parece ser un factor causal del coma. Pero si es indicativo de un umbral mas bajo de las ratas cirróticas hacia fármacos convulsivantes inhibidores de la enzima, como la tiosemicarbazida y el ácido 3-mercaptopropiónico.

6.- La administración de la gama-glutamil hidrazona de PLP no produjo ningún cambio conductual, ni en los grupos controles ni en los cirróticos, aunque si promovió un decremento en la

actividad de la glutamato descarboxilasa en ambos grupos.

7.- La distorsión hepática resultó en una disminución de los niveles de PFLP endógenos, sin alterarse este fenómeno por la inducción del estado comatoso.

8.- Los niveles de PFLP disminuidos en las ratas cirróticas pueden explicarse por la inhibición observada en la actividad de la piridoxal cinasa en estos grupos experimentales.

9.- La actividad de la glutamato descarboxilasa presentó una disminución en las ratas cirróticas en estado precomatoso cuando el ensayo enzimático se realizó en ausencia de PFLP exógeno. Este hecho sugiere que en las ratas cirróticas, los niveles disminuidos de PFLP pudieran modular in vivo la actividad de la GAD, originando de este modo una alteración del sistema GABAérgico durante la encefalopatía hepática.

10.- Durante el estado comatoso la glutamato descarboxilasa sufre un cambio que se traduce en una inhibición que no puede ser revertida en presencia de PFLP exógeno, situación que es diferente a la inhibición observada en el estado precomatoso, que sí puede ser superada en presencia de la coenzima exógena.

11.- La inhibición de la GAD durante la encefalopatía hepática y el bajo umbral a los fármacos convulsivos que mostraron las ratas cirróticas serían indicativos del incremento en la excitabilidad neuronal que caracteriza la encefalopatía hepática en observaciones clínicas.

12.- Se describieron varios parámetros alterados en la estructura y fisiología de las mitocondrias no sinápticas o libres durante la encefalopatía hepática. Los principales fueron los siguientes:

a) Una disminución en la capacidad oxidativa exclusiva del sitio 1 de la cadena mitocondrial. Las bases de este fenómeno pueden radicar en una falla del complejo que o ide al NADH o en una incapacidad de los sustratos por penetrar al interior de la matriz mitocondrial.

b) Un patrón oscilatorio mitocondrial completamente distorsionado en las ratas cirróticas que no pueda achacarse a parámetros energéticos, por las condiciones del ensayo empleadas, sino que más bien sugieren alteraciones estructurales de las mitocondrias no sinápticas durante la disfunción hepática.

c) Una modificación en la relación entre los ácidos grasos insaturados y los saturados localizados en los fosfolípidos de las membranas mitocondriales, disminuyendo los ácidos grasos insaturados durante la encefalopatía hepática.

d) Las 3 anteriores alteraciones del funcionamiento y estructura de las mitocondrias no sinápticas se presentaron por igual en los grupos de ratas cirróticas, sin hacer diferencia si estaban o no en coma.

e) No hubo diferencia entre los grupos experimentales en la cuantificación de los siguientes parámetros mitocondriales: niveles de citocromos, actividad de la H-ADPasa, patrón de fosfolípidos y criterios de purificación de la fracción de mitocondrias no sinápticas.

13.- Los trasplantes de tejido fetal fueron capaces de revertir

la falla en la respuesta al paradigma de prevención pasiva que presentaron las ratas cirróticas, pero no tuvieron efecto en modificar la movilidad incrementada de los animales con distorsión hepática.

14.- Los resultados anteriores confirman el carácter multifactorial y las alteraciones a varios niveles de organización del sistema nervioso durante la encefalopatía hepática.

15.- El fase crítica o terminal de la encefalopatía hepática, el coma, presenta algunas características propias que lo diferencian del estado pre-comatoso, aunque cabe señalar que ambos estados, el comatoso y el pre-comatoso, comparten por igual cierto número de alteraciones. El fenómeno que consistentemente resulta privativo del estado comatoso fue la inhibición de la actividad de la GAD en presencia de PLP exógenos mientras que la disminución del PLP endógeno, la inhibición de la piridoxal cinasa y todos los parámetros alterados en la función y estructura de las mitocondrias no sinápticas fueron similares en las ratas cirróticas, independientemente de si estaban o no comatosas.

-BIBLIOGRAFIA.

- 1) Cannon, W.B. (1939) *The Wisdom of the Body*. 2nd. ed. Norton:New York.
- 2) Bauman, G. et al. (1982) *Fed. Proc.* 41:2208-2244.
- 3) Kennedy, P. (1967) *Neuroendocrinology* 36:254-269.
- 4) Shimazu, F. et al. (1986) Neural metabolic interaction in the liver during aging in rats. en "Liver and Brain" (Kitam K., ed). pp:45-56. Elsevier Science Publishers B.V. (Biomedical Division), U.S.A.
- 5) Recknagel, R. (1967) *Pharmac. Review* 19:145-207.
- 6) Ver referencia 18 del manuscrito en *Neurochem. Res.*
- 7) Fitzpatrick, S.M. et al. (1980) *J. Neurochem.* 41:1070-1080.
- 8) Ver referencia 6 del manuscrito enviado a *Biochem. Pharmacol.*
- 9) Butterworth, R.F. et al. (1937) *Neurochem. Pathol.* 6:131-144.
- 10) Sherlock, S. (1966) *GUT* 28:1040-1048.
- 11) Silverman, P. (1978) *Animal Behaviour in the laboratory* (Retnam, T. ed). pp:146-159. London, Chapman and Hall, U.S.A.
- 12) Tapia, R. (1978) *Neurosci. Lett.* 30:73-77.
- 13) Prado Alcalá, R. et al. (1975) *Physiol. Behav.* 15:283-287.
- 14) Prado Alcalá, R. (1985) *Life Sci.* 37:2135-2145.
- 15) Prado Alcalá, R. et al. (1973) *Physiol. Behav.* 12:249-253.
- 16) Bermudez-Rattoni, F. et al. (1987) *Brain Research* 416:147-152.
- 17) Giguère, J.F. y Butterworth, R.F. (1984) *Neurochem. Res.* 9:1309-1321.
- 18) Ver referencia 17 del manuscrito en *J. Neurosci. Res.*
- 19) Ver referencias 11 y 12 del manuscrito en *Neurochem. Res.*