

## **LA ENCEFALOPATIA HEPATICA: UNA DESCONOCIDA CON ALTA INCIDENCIA**

Vicente Felipo

Laboratorio de Neurobiología. Centro de Investigación Príncipe Felipe.

Valencia. vfelipo@cipf.es

Este artículo trata sobre la encefalopatía hepática y el papel que juegan en ella las alteraciones en la función de algunos receptores iónotrópicos de los neurotransmisores glutamato y GABA y de las vías de transducción de señales asociadas a los mismos. Estos receptores (NMDA y GABA<sub>A</sub>) son canales iónicos que se activan por la unión de los correspondientes ligandos (glutamato para NMDA y ácido  $\gamma$ -aminobutírico para los receptores GABA<sub>A</sub>). Una descripción detallada de los receptores ionotrópicos de glutamato y su papel como dianas en otras enfermedades neurológicas se puede encontrar en el artículo SICI de marzo de 2011 de Sonia Marco, Isabel Pérez Otaño y Rafael Luján (in this same section).

Alteraciones en la función de los receptores NMDA y GABA<sub>A</sub> y de algunos transportadores de glutamato juegan un papel esencial en las alteraciones neurológicas (cognitivas y motoras) que presentan los pacientes con encefalopatía hepática.

A la mayoría de la gente les suena muy raro el término “encefalopatía hepática”. Sin embargo la incidencia de la encefalopatía hepática es alta y afecta notablemente la calidad de vida de un gran número de personas, pudiendo conducir en sus estados avanzados al coma y a la muerte. A pesar

de ello, es una situación poco conocida a nivel general, con muy escasa presencia en los medios de comunicación.

¿Qué es la encefalopatía hepática? Se utiliza la denominación “encefalopatía hepática” para una amplia gama de situaciones en las que se produce una alteración de la función cerebral que es consecuencia de un fallo previo en la función del hígado.

El hígado es el órgano que se ocupa de detoxificar la mayor parte de las sustancias tóxicas, tanto las que ingerimos como las que fabricamos endógenamente. Cuando el hígado falla ó la sangre no circula adecuadamente a través del mismo, como ocurre en la cirrosis y otras enfermedades hepáticas crónicas ó en el fallo hepático agudo, estas sustancias no se eliminan adecuadamente y pueden alcanzar el cerebro, alterando su función y conduciendo a alteraciones neurológicas y pueden conducir al coma hepático y a la muerte.

Una de las sustancias que no se elimina adecuadamente en situaciones de fallo hepático es el amonio. El amonio se forma como producto de degradación de las proteínas que ingerimos en la dieta y por el metabolismo de otras sustancias nitrogenadas. Sin embargo, el amonio es neurotóxico y, si supera determinadas concentraciones altera la función cerebral. Para evitar estos efectos tóxicos el amonio se elimina normalmente en el hígado mediante su incorporación en urea, que se elimina en la orina. Cuando el hígado falla (e.g. cirrosis hepática, fallo hepático agudo, ..) el amonio no se elimina adecuadamente y se acumula en la sangre (hiperamonemia) y en los tejidos, incluido el cerebro. El aumento de amonio en el cerebro es uno de los

principales contribuyentes a las alteraciones neurológicas en encefalopatía hepática.

Las alteraciones neurológicas son inicialmente imperceptibles, pudiéndose detectar únicamente mediante la realización de tests psicométricos. Esta fase se denomina encefalopatía hepática mínima y en ella los pacientes presentan déficits en la atención y alteraciones cognitivas y motoras que pese a ser sutiles, producen enlentecimiento psicomotor y afectan su calidad de vida, reduciendo su capacidad para la realización de tareas de la vida diaria como conducir vehículos, aumentando su riesgo de padecer accidentes laborales, de tráfico y domésticos y predisponiéndoles a padecer encefalopatía hepática clínica mas grave.

En esta fase clínica el deterioro neurológico puede progresar paulatinamente conduciendo a alteraciones del sueño, de la personalidad, neuropsiquiátricas y a alteraciones cognitivas y de la actividad y coordinación motoras mas serias (hipoquinesia, asterixis, deterioro cognitivo, etc).

En casos avanzados de enfermedad crónica ó en fallo agudo la encefalopatía puede progresar hasta el coma hepático, que puede ser reversible ó conducir a la muerte.

Pese al escaso conocimiento de la misma por la población en general, la incidencia de la encefalopatía hepática y sus consecuencias clínicas, sociales y económicas son altas.

La incidencia de las enfermedades hepáticas crónicas se estima alrededor del 0.5-0.9% de la población. Es decir en España habría entre 230,000 y 400,000 afectados. Entre un 33 y un 50% de los pacientes con cirrosis hepática (la enfermedad hepática crónica mas frecuente) presentan encefalopatía hepática

mínima. Se estima que entre 80,000 y 160,000 personas sufren algún grado de encefalopatía hepática en España. Por otra parte, los pacientes con cirrosis hepática pueden vivir bastantes años con un deterioro progresivo de su estado neurológico y de su calidad de vida y de la de sus familiares.

Una forma menos frecuente (pero mas grave) de encefalopatía hepática es la que se presenta en situaciones de fallo hepático agudo, que se puede producir por diversas causas. Las mas frecuentes en países occidentales son intoxicaciones por paracetamol, por ingestión de setas venenosas, etc. En otros países como la India la incidencia del fallo hepático agudo es mucho mayor, siendo la causa mas frecuente los virus de la hepatitis A ó B. En el fallo hepático agudo se produce una muerte de las células del hígado que, si es masiva, puede conducir rápidamente al coma y a la muerte. Afortunadamente, el hígado es el único órgano capaz de regenerarse por si mismo. Por tanto, si los pacientes sobreviven al episodio de fallo hepático agudo, el hígado se regenera y pueden volver a llevar una vida normal. Sin embargo, la mortalidad continúa siendo muy alta en pacientes con fallo hepático agudo.

El número de fallecidos por enfermedades hepáticas crónicas ó agudas en España es de más de 10,000 al año, lo que representa entre un 3 y un 4% del total de fallecimientos (aproximadamente el triple que los fallecidos por accidentes de tráfico).

Estos datos muestran por tanto que la encefalopatía hepática es un serio problema clínico, social y económico.

**Papel del receptor NMDA en la muerte inducida por hiperamonemia y fallo hepático agudos. Implicaciones terapéuticas.**

En el fallo hepático agudo se produce una muerte de células del hígado que conducen a una serie de alteraciones que incluyen un rápido aumento de los niveles de amonio y de otras sustancias tóxicas y de la inflamación, fallo multiorgánico, encefalopatía hepática, coma y, con frecuencia, la muerte de los pacientes. La muerte se produce en muchos casos por un aumento de la presión intracraneal a la que contribuyen la hiperamonemia aguda, la aparición de edema cerebral y alteraciones de la barrera hematoencefálica y del flujo sanguíneo cerebral. Los mecanismos moleculares no se conocen en detalle. Para conocer en detalle los mecanismos por los que la hiperamonemia aguda contribuye a la muerte nuestro grupo inició una serie de estudios hace 20 años. La intoxicación aguda por dosis altas de amonio conduce rápidamente a la muerte. Una situación similar se da en la hiperamonemia neonatal grave (por deficiencias del ciclo de la urea, asfixia neonatal, etc). Un aumento rápido y muy elevado de los niveles de amonio conduce a la muerte.

Estudios previos del grupo nos llevaron a plantear la hipótesis de que la intoxicación aguda por amonio conduciría a una activación excesiva del receptor NMDA que contribuiría a la muerte. La activación excesiva de este receptor de glutamato (denominada excitotoxicidad) es neurotóxica y conduce a la degeneración y muerte neuronal. Otra situación en la que la activación excesiva del receptor NMDA conduce a la muerte neuronal y contribuye a la muerte de los pacientes o animales es la isquemia cerebral.

Para poder analizar la activación del receptor NMDA en cerebro in vivo diseñamos un experimento utilizando microdiálisis cerebral in vivo, en ratas despiertas y en libre movimiento. La microdiálisis cerebral es una técnica que permite implantar una pequeñísima sonda con una membrana semipermeable

en el área cerebral que deseemos y recoger a través de ella, continuamente, muestras del fluido extracelular. En este medio recogido podemos medir los niveles de neurotransmisores, GMPc, etc. De este modo podemos analizar la neurotransmisión y vías de transducción de señales en cerebro in vivo en las ratas despiertas.

La activación del receptor NMDA abre el canal iónico y aumenta los niveles de calcio en la neurona post-sináptica, el calcio activa una serie de enzimas incluida la óxido nítrico sintasa neuronal. El óxido nítrico así formado activa a su vez la guanilato ciclasa, que forma GMP cíclico (GMPc), parte del cual se libera al medio extracelular, permitiendo su determinación por microdiálisis. Esta vía se denomina glutamato-óxido nítrico-GMPc (Figura 1).

En condiciones fisiológicas modula algunas formas de aprendizaje y memoria (ver abajo), pero su activación excesiva conduce a la degeneración y muerte neuronal.

Comprobamos que la activación del receptor NMDA se puede evaluar in vivo por microdiálisis cerebral midiendo la función de esta vía glutamato-óxido nítrico-GMPc y el consiguiente aumento de GMPc en el medio extracelular recogido por microdiálisis en ratas despiertas.

Aplicando esta técnica comprobamos que la intoxicación aguda (por inyección intraperitoneal) de ratas con amonio conduce rápidamente a la activación del receptor NMDA en el cerebro, que se refleja en un aumento del GMPc extracelular. Si bloqueamos el receptor NMDA con un antagonista específico la inyección de amonio ya no aumenta el GMPc extracelular, indicando que este aumento es consecuencia de la activación del receptor NMDA en la hiperamonemia aguda.

Para averiguar si esta activación del receptor NMDA es responsable de la muerte inducida por la intoxicación aguda por amonio estudiamos si bloqueando el receptor se previene la muerte.

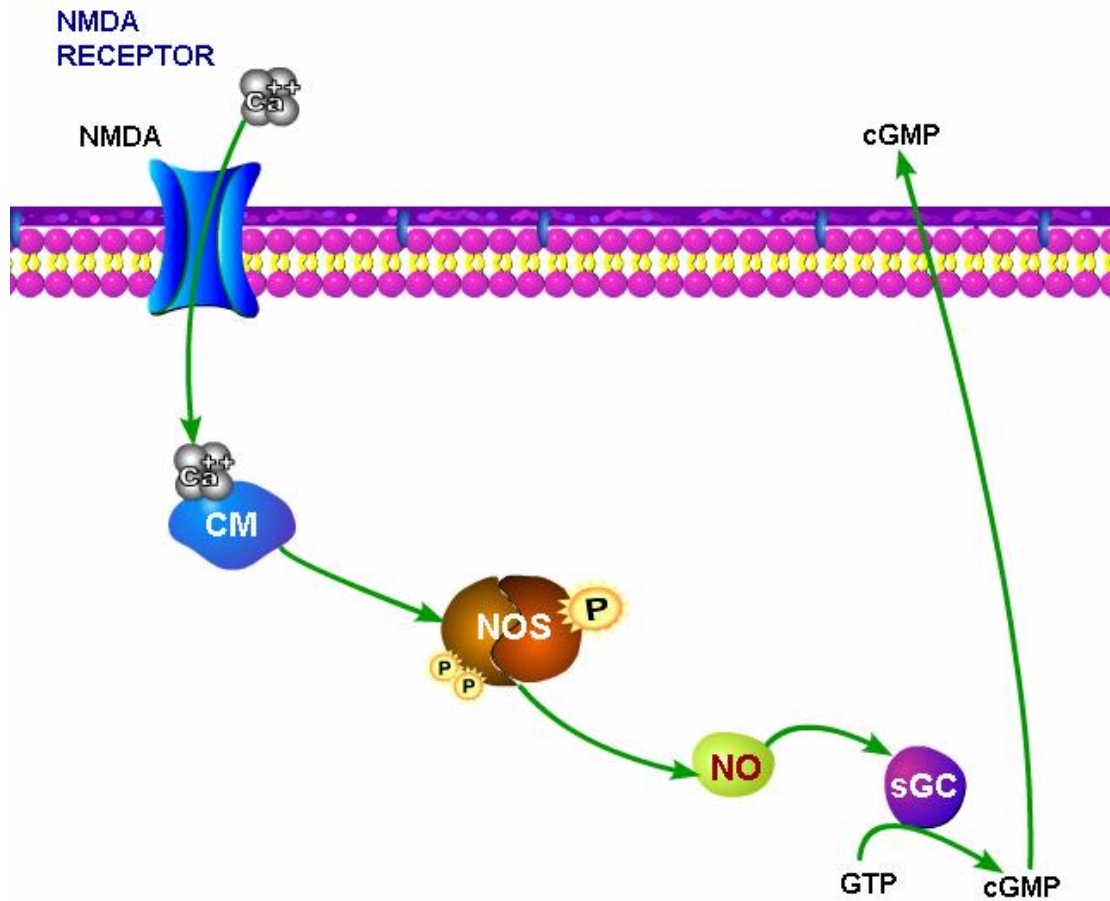


Figura 1. Esquema de la vía glutamato-óxido nítrico-GMPc, asociada al receptor NMDA. La activación del receptor NMDA aumenta el calcio en la neurona post-sináptica, el calcio activa la óxido nítrico sintasa neuronal (NOS). El óxido nítrico (NO) formado activa a su vez la guanilato ciclasa soluble (sGC), que forma GMP cíclico (cGMP), parte del cual se libera al medio extracelular.

Comprobamos que la muerte de ratones inducida por amonio se previene casi completamente por 10 antagonistas diferentes del receptor NMDA que actúan en 3 sitios diferentes del receptor.

Estos estudios demuestran que la hiperamonemia aguda activa el receptor ionotrópico NMDA; que esta activación es responsable de la muerte y que se puede prevenir la muerte en situaciones de hiperamonemia aguda bloqueando este receptor.

Como hemos comentado antes, uno de los principales contribuyentes a la muerte en situaciones de fallo hepático agudo es la hiperamonemia. Por tanto es probable que la activación excesiva del receptor NMDA también contribuya a la muerte en fallo hepático agudo. Para comprobarlo realizamos estudios similares a los descritos arriba para la hiperamonemia aguda, pero utilizando un modelo de fallo hepático agudo inducido por inyección de un hepatotóxico (galactosamina).

Comprobamos, por microdiálisis cerebral in vivo, que el fallo hepático agudo también conduce a una activación excesiva del receptor NMDA en cerebro.

Para determinar la contribución de esta activación al proceso por el que el fallo hepático conduce a la muerte estudiamos los efectos del bloqueo del receptor NMDA con antagonistas específicos (MK-801 y memantina).

El fallo hepático agudo puede ser masivo, con muerte de la mayor parte de las células del hígado ó moderado, con muerte de menos células hepáticas.

Estudiamos el efecto de los antagonistas del receptor NMDA en situaciones de fallo hepático masivo, con muerte del 100% de las ratas, ó moderado, con muerte del 62% de las ratas.



En fallo hepático masivo, el bloqueo del receptor NMDA prolonga la supervivencia de las ratas de 24 a 38 horas. En fallo hepático moderado, el bloqueo del receptor NMDA aumenta considerablemente la supervivencia, pasando de un 38% a un 77% de las ratas. Además en las ratas que mueren, el bloqueo del receptor NMDA aumenta la supervivencia de 48 a 77 horas. Estos resultados indican que la activación excesiva del canal iónico del receptor ionotrópico NMDA para glutamato contribuye al proceso por el que el fallo hepático agudo conduce a la muerte. El bloqueo del receptor NMDA retrasa la progresión de la encefalopatía hepática y aumenta la supervivencia en fallo hepático moderado (probablemente dando tiempo a que se regenere el hígado lo suficiente para mantener la vida) y retrasa la muerte en fallo hepático masivo. En humanos este aumento del tiempo de supervivencia puede ser suficiente para encontrar un hígado adecuado para trasplante y salvar la vida del paciente.

### **Papel del receptor NMDA y de vías de transducción de señales asociadas al mismo en el deterioro cognitivo en encefalopatía hepática e hiperamonemia crónicas.**

Los mecanismos que conducen a las alteraciones neurológicas en encefalopatía hepática crónica no son bien conocidos. Empiezan a conocerse algunos de los mecanismos responsables de algunos tipos de alteraciones motoras y cognitivas gracias a los estudios realizados en modelos animales de encefalopatía hepática crónica.

Uno de los primeros síntomas de la encefalopatía hepática es el deterioro cognitivo, que puede comenzar con ligeros déficits de atención e ir afectando

progresivamente más funciones cognitivas. Modelos animales de encefalopatía hepática crónica (ratas con anastomosis portacava (PCS) ó ligadura biliar (BDL)), también presentan déficits cognitivos con disminución de la memoria y de la capacidad de aprendizaje de distintos tipos de tareas. Por ejemplo, hemos comprobado que las ratas PCS ó BDL tienen disminuida su capacidad para aprender una tarea de discriminación condicionada en un laberinto en forma de Y. Ratas con hiperamonemia crónica sin fallo hepático (inducida mediante la administración de acetato amónico en la dieta) también tienen disminuida su capacidad de aprender esta tarea, indicando que la hiperamonemia es un factor esencial en el deterioro cognitivo en encefalopatía hepática.

Hemos estudiado los mecanismos responsables de este deterioro cognitivo. Hemos comprobado que la capacidad para aprender esta tarea está modulada por la función de la vía glutamato-óxido nítrico-GMPc mencionada arriba. La activación del receptor NMDA activa esta vía y aumenta la formación de GMPc, que es necesaria para aprender la tarea en el laberinto en Y.

La función de esta vía se puede analizar en cerebro in vivo administrando NMDA a través de la sonda de microdiálisis y analizando el aumento de GMPc que se produce. Comprobamos que en ratas con encefalopatía hepática por PCS ó BDL ó en ratas hiperamonémicas, la activación del receptor NMDA mediante administración de NMDA a través de la sonda de microdiálisis conduce a una menor formación de GMPc que en las ratas control, indicando que la función de esta vía está disminuida en cerebelo in vivo.

También comprobamos que esto es debido a una mayor activación tónica basal del receptor NMDA, que aumenta la fosforilación de la óxido nítrico

sintasa neuronal y disminuye su localización en la sinápsis, disminuyendo su activación en respuesta a la activación del receptor NMDA.

Existe una excelente correlación entre la función de la vía glutamato-óxido nítrico-GMPc en cerebelo (el aumento de GMPc inducido por NMDA) y la capacidad del mismo animal para aprender la tarea en el laberinto en Y. Si la función de la vía disminuye (en ratas PCS, BDL, hiperamonémicas, expuestas a PCBs, metilmercurio, etc) también disminuye la capacidad de aprender esta tarea. Cuando aumenta la función de la vía (e.g. en ratas prenatalmente expuestas a PBDE99) también aumenta la capacidad de aprender esta tarea. Estamos estudiando en detalle los mecanismos moleculares que regulan la función de la vía en condiciones fisiológicas con el fin de poder modularla farmacológicamente y restaurar la formación de GMPc en los modelos de encefalopatía hepática. Hemos identificado varios mecanismos que modulan la vía y varios procedimientos para restaurar su función en encefalopatía hepática.

Una forma de recuperar los niveles de GMPc es inhibir su degradación administrando inhibidores de la fosfodiesterasa que lo degrada. Hemos conseguido recuperar los niveles de GMPc en cerebelo administrando zaprinast o sildenafil, inhibidores de la fosfodiesterasa 5.

La función de la vía glutamato-óxido nítrico-GMPc asociada al receptor ionotrópico de glutamato NMDA se modula por otro tipo de receptores ionotrópicos, el receptor GABA<sub>A</sub>, que se activa por GABA. La activación de los receptores GABA<sub>A</sub> reduce la función de la vía (Fig. 2).

Hemos comprobado que en hiperamonemia y encefalopatía hepática está aumentada la activación tónica basal del receptor  $GABA_A$  en cerebelo. Esto contribuye a la disminución de la función de la vía.

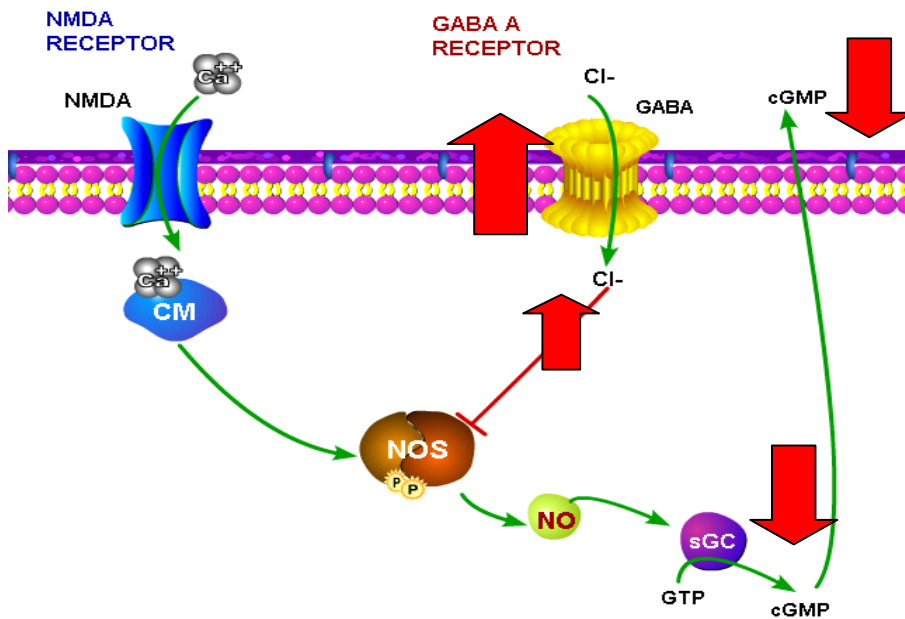


Figura 2. La activación del receptor  $GABA_A$  reduce la función de la vía glutamato-óxido nítrico-GMPc

Se puede restaurar la función de la vía (la formación de GMPc en condiciones basales y tras activación del receptor NMDA) bloqueando el receptor  $GABA_A$  con bicuculina (Fig. 3).

En ratas con hiperamonemia crónica la administración de NMDA a través de la sonda de microdiálisis induce un aumento de GMPc significativamente menor que en ratas control. Cuando las ratas se tratan con bicuculina para bloquear el receptor ionotrópico  $GABA_A$  se recuperan los niveles de GMPc extracelular

en cerebelo y el aumento de GMPc inducido por la activación del receptor NMDA (Fig. 3)

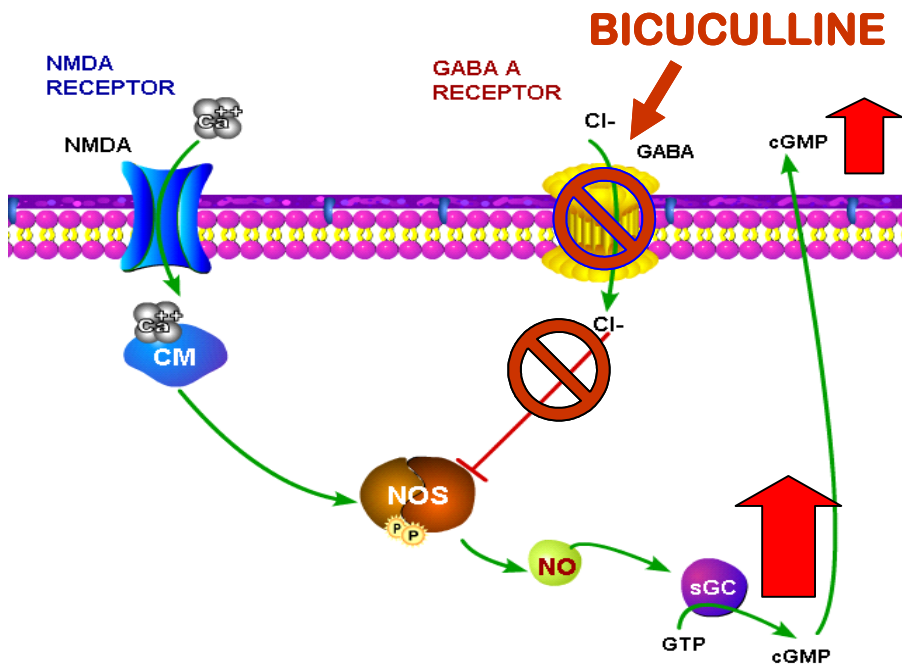


Figura 3. El bloqueo del receptor  $GABA_A$  con bicuculina restaura la función de la vía glutamato-óxido nítrico-GMPc en cerebelo de ratas hiperamonémicas in vivo.

Uno de los factores que media la disminución de la función de la vía en ratas PCS o con hiperamonemia es la neuroinflamación. Tanto las ratas PCS como las hiperamonémicas presentan una activación de la microglia en cerebelo y neuroinflamación, con aumento de marcadores inflamatorios como la actividad de ciclooxigenasa u óxido nítrico sintasa inducible y de los niveles de prostaglandina E2 e interleucinas inflamatorias como IL-6 y TNF- $\alpha$ . Esta

neuroinflamación contribuye a la disminución de la función de la vía. El tratamiento con anti-inflamatorios (ibuprofeno) reduce la neuroinflamación y restaura la función de la vía glutamato-óxido nítrico-GMPc en cerebelo.

Los estudios anteriores muestran que:

- 1) la función de la vía glutamato-óxido nítrico-GMPc, asociada al receptor NMDA, está disminuida en cerebelo in vivo en ratas con encefalopatía hepática
- 2) existe una correlación entre la función de la vía y la capacidad de aprender la tarea en el laberinto en Y
- 3) podemos restaurar la función de la vía en ratas con encefalopatía hepática administrando inhibidores de fosfodiesterasa 5, antagonistas del receptor GABA<sub>A</sub> ó anti-inflamatorios.

Esto sugiere que estos tratamientos podrían restaurar la capacidad de aprender la tarea en el laberinto en Y. Realizamos los experimentos correspondientes y comprobamos que, efectivamente, el tratamiento crónico con zaprinast, sildenafil, bicuculina o ibuprofeno, en las dosis adecuadas, restaura completamente la capacidad de aprender la tarea en el laberinto en Y en ratas con hiperamonemia ó encefalopatía hepática.

Tratamientos similares, en condiciones seguras, podrían ser útiles para mejorar el deterioro cognitivo en pacientes con encefalopatía hepática.

Estos estudios también muestran que un aumento de la activación tónica basal de canales iónicos (los receptores ionotrópicos NMDA para glutamato y GABA<sub>A</sub> para GABA) en cerebelo está implicado en el deterioro cognitivo en encefalopatía hepática.