

11265

**Departamento de Psiquiatría y Salud Mental de la Facultad de Medicina de la
Universidad Nacional Autónoma de México
Instituto Mexicano de Psiquiatría**

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50

La Encefalopatía Hepática y la Actividad Sérica Benzodiacepínica

Tesis que para obtener el grado de Maestro en Psiquiatría presenta el

M.C. Carlos Antonio Hernández Avila

Tutor: M.C., M.C.M. Hector A. Ortega Soto

1999

273563

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



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.

PAGINACION
DISCONTINUA

A KARLA Y GUADALUPE

QUE SON LA LUZ DE MIS OJOS

A MIS PADRES Y MIS HERMANOS

RESUMEN

La encefalopatía hepática (EH) es un trastorno neuropsiquiátrico complejo secundario a la insuficiencia hepática aguda o crónica. Aunque las causas exactas de la EH no se han dilucidado se considera que un incremento en la inhibición neuronal por el complejo receptor GABA-benzodiazepinas, producido por un incremento en las concentraciones de ligandos endógenos del receptor de las benzodiazepinas (LRBZD), pudiera ser un mecanismo plausible. No obstante, investigaciones diversas que han explorado esta hipótesis han arrojado hallazgos contradictorios.

Con el objetivo de evaluar la presencia y los niveles de LRBZD en el suero de pacientes con EH y en el suero de pacientes de tres grupos control, efectuamos un escrutinio analítico y transversal empleando la técnica de radioreceptor. Los grupos control estuvieron integrados por: pacientes con cirrosis hepática sin encefalopatía (CH), pacientes con encefalopatía urémica (EU) y un grupo de sujetos sanos.

Los resultados mostraron que los pacientes con EH tuvieron niveles séricos de LRBZD significativamente más altos que los pacientes con EU y que los controles sanos. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre el grupo de pacientes con EH y el grupo de pacientes con CH en quienes se detectó también concentraciones séricas sinificativas de estos compuestos. Cuando los pacientes fueron estratificados de acuerdo a la severidad de la EH, incluyendo al grupo de pacientes con CH sin encefalopatía como el grupo de menor severidad, los niveles séricos de LRBZD mostraron una correlación modesta con el grado de severidad de la EH ($r = 0.46$). Por otro lado, aproximadamente una tercera parte de los pacientes con EH no mostró niveles séricos detectables de LRBZD.

Nuestros hallazgos sugieren que los LRBZD endógenos pudieran contribuir a la patogénesis de la EH. Sin embargo, los síntomas neuropsiquiátricos de la EH difícilmente pueden explicarse exclusivamente por la acumulación de estos compuestos.

ABSTRACT

Hepatic Encephalopathy (HE) is a complex neuropsychiatric disorder secondary to acute or chronic liver failure. Although the exact causes of HE have not been clarified, enhanced neuronal inhibition at the GABA-benzodiazepine receptor complex mediated by increased levels of endogenous benzodiazepine receptor ligands (BZDRL) has been proposed. Research exploring this hypothesis have yielded contradictory findings.

We conducted a cross-sectional study, with the objective of evaluating by radio-receptor assay, the presence and levels of BZDRL in plasma from patients with HE and three control groups: patients with liver cirrhosis without encephalopathy (LC), patients with uremic encephalopathy (UE), and a group of healthy subjects.

Results show that patients in the HE group had significantly higher plasma BZDRL levels compared to patients with UE and compared to healthy subjects, but not compared to patients with LC, in whom this compounds were also detected in significant concentrations. When patients were stratified according with severity of HE, including those patients with LC without encephalopathy as the lowest severity group, plasma levels of BZDRL show a modest correlation with stage of severity ($r = 0.46$). Interestingly, approximately one third of patients with HE did not show detectable levels of BZDRL.

Our findings suggest that endogenous BZDRL may play a role in the pathogenesis of HE, although neuropsychiatric symptoms in HE are difficult to explain in terms of these compounds alone.

Contenido

1. Introducción	1
1.1. Marcadores Diagnósticos	3
2. Hipotesis Sobre los Mecanismos Fisiopatogénicos de la EH	5
2.1. La Hipótesis del Amonio	6
2.2. La Teoría de los Neurotransmisores Falsos y de las Neurotoxinas	8
2.3. La Teoría GABAérgica de la EH	9
2.4. La Teoría Benzodiazepínica de la EH	14
3. Planteamiento del Problema	20
4. Objetivos de la Investigación	21
5. Hipotesis	22
6. Material y Metodos	23
6.1. Pacientes	23
a) Criterios de Inclusión y de Exclusión	23
6.2. Diseño	23
6.3. Variables	24
6.4. Procedimientos	24
7. Analisis de Resultados	27
8. Resultados	29
8.1. Descripción de la Muestra	29
8.2. Comparación de los Niveles Séricos de los LRBZD	30
8.3. Relación de los Niveles Séricos de los LRBZD con la CH y la Severidad de la EH	31
8.4. Comparación de los Metodos de Extracción y Purificación de los LRBZD	32
a) La actividad benzodiazepínica en extractos séricos "crudos"	32
b) La actividad benzodiazepínica en extractos séricos procesados por un método de purificación y concentración de fase sólida	33

9. Discusión	35
10. Anexos	42
Anexo 1. El estudio de la Interacción Ligando-receptor y la Técnica de Radiorreceptor	42
Anexo 2. Extracción y Purificación de los Ligandos Séricos Benzodiazepínicos	50
El Ensayo de Radiorreceptor	51
11. Agradecimientos	54
12. Referencias	55
Tablas y Figuras	

1. INTRODUCCION

La encefalopatía hepática (EH) es un síndrome caracterizado por el deterioro de la función mental que ocurre como complicación de la falla hepática en pacientes con enfermedad hepatocelular aguda, subaguda o crónica. No obstante que la patogénesis precisa de este síndrome se desconoce, se considera un componente importante el incremento de la inhibición neuronal.

La EH se considera reversible y no asociada a alteraciones estructurales del SNC, lo que excluye a los déficits neuropsiquiátricos relacionados con cambios morfológicos como los observados en la degeneración hepatocerebral. Aunque se desconoce si episodios recurrentes de EH pueden condicionar lesión neuronal, en algunos enfermos, particularmente aquellos que han fallecido con cirrosis y cortocircuitos portal-sistémicos, se ha descrito un incremento reversible y específico en el número y volumen de los astrocitos Alzheimer tipo II en la sustancia gris del cerebro, cerebelo, putamen y globus pallidus¹. Así mismo se ha demostrado el efecto tóxico del amoníaco sobre los astrocitos en cultivo². Sin embargo se desconoce cual es el significado de estos hallazgos.

El espectro de anormalidades neuropsiquiátricas de la EH es amplio. Desde déficits cognoscitivos sutiles, detectables solo por pruebas neuropsicológicas o electrofisiológicas, hasta el coma. Comunmente las primeras manifestaciones son alteraciones conductuales en compañía de deterioro intelectual leve, lo que aparentemente refleja un trastorno en el funcionamiento de las porciones anteriores del cerebro de manera bilateral. Conforme el cuadro avanza se puede presentar alteraciones del sueño, enlentecimiento o agitación psicomotriz, incremento importante del déficit cognoscitivo, cuadros confusionales, letargia y coma. Suele estimarse el estado mental clínicamente en

base a la clasificación³ que se muestra en la tabla 1. En general se considera que la EH puede presentarse en dos formas principales dependiendo de la rapidez con la que se desarrolle el daño hepático, su extensión, la magnitud de los cortocircuitos portal-sistémicos, así como la presencia de factores precipitantes. Una de ellas es la encefalopatía portal-sistémica considerada como la forma más común. Esta se acompaña del desarrollo de circulación colateral debido al desarrollo de cirrosis hepática (CH) e hipertensión portal-sistémica secundaria. Característicamente el inicio de la encefalopatía es insidioso y su desarrollo es lento. Episodios múltiples de este tipo de encefalopatía no son poco frecuentes. Otra de las formas principales en que la EH se presenta es la que se asocia con la falla hepática fulminante. Esta se caracteriza por ser un síndrome de inicio rápido resultado de inflamación severa o necrosis del hígado. En este caso el estado mental del paciente progresa de alteraciones cognoscitivas leves al coma profundo en cuestión de horas o días. La muerte frecuentemente se sucede como consecuencia de herniación cerebral secundaria al edema cerebral masivo y el consecuente incremento en la presión intracraneal. Un tercer tipo es la denominada encefalopatía portal-sistémica mínima, latente o subclínica, que generalmente ocurre en pacientes con cirrosis tanto de origen alcohólico como no alcohólico, y que se acompaña de hipertensión portal y cortocircuitos portal-sistémicos. El examen neuropsiquiátrico es generalmente normal, pero el uso de pruebas psicométricas o de los Potenciales Evocados Visuales (PEV) frecuentemente revela deficiencias características^{4,5}.

La EH se presenta cuando la función hepática se ve perturbada. Las causas de daño hepático que pueden conducir a la EH incluyen principalmente: Abuso o dependencia al alcohol, hepatitis virales, exposición a productos químicos o fármacos

hepatotóxicos, isquemia e hipoxia hepatocelular, trastornos metabólicos, oclusión de las vías biliares, lesiones vasculares como la oclusión de la arteria hepática, el síndrome de Budd-Chiari y la enfermedad veno-oclusiva. Se reconocen como factores desencadenantes el estreñimiento, infecciones, carga oral de proteínas, alteraciones hidroelectrolíticas y del balance ácido-base, diuréticos, cuadros diarreicos, vómitos, hipoglucemia, anemia, hipotensión, sangrado del tubo digestivo, paracentesis abdominal, hiperazoemia, así como el empleo de hipnóticos y sedantes, particularmente barbitúricos y benzodiazepinas.

1.1.- Marcadores Diagnósticos

Es importante señalar que no existen datos diagnósticos específicos de la encefalopatía hepática que permitan hacer un diagnóstico diferencial con otros estados confusionales o encefalopatías. En este sentido, ninguna prueba de laboratorio o gabinete ha demostrado su utilidad en la evaluación de este trastorno, aunque se ha observado una buena correlación entre las concentraciones de glutamina y alfa-glutarato en el líquido cefalorraquídeo (LCR) con la etapa de la EH⁶. Sin embargo, la punción lumbar raramente esta indicada en estos pacientes. Las anomalías en electroencefalograma no son específicas y pueden presentarse en otras encefalopatías. Los cambios típicos pueden presentarse antes de la aparición del cuadro clínico y persistir después de la remisión del síndrome. Sin embargo, suele haber una buena correlación entre la etapa clínica de la encefalopatía hepática y los cambios electroencefalográficos. Suele presentarse en las etapas iniciales, enlentecimiento progresivo del trazo electroencefalográfico. Posteriormente, conforme el trastorno progresa, aparecen ondas fásicas paroxísticas características pero no específicas, así como una disminución progresiva en la amplitud del

trazo no acompañada del retorno de frecuencias rápidas, a lo que se considera de mal pronóstico, al igual que la presencia de periodos de supresión del EEG ^{7,8}. Las anomalías en los potenciales evocados somatosensoriales (PES), particularmente en los PEV, también guardan una estrecha correlación con la etapa clínica del síndrome. Se proponen como un índice cuantitativo de la gravedad de la EH ^{5,9}. En conejos con encefalopatía inducida por la administración de gama-vinil-GABA se ha observado un incremento significativo en la amplitud de la primera onda positiva (P1)¹⁰. Por otro lado, cambios en los PES han sido empleados en el diagnóstico de la EH en humanos. Al parecer, los componentes tardíos de los PES son de utilidad en la determinación del estado de severidad de la EH, particularmente la latencia entre las ondas negativas N1 y N3¹¹. Se ha observado que este componente está asociado con la etapa clínica de la EH. En las etapas tardías los PES difieren no solo cualitativamente sino cuantitativamente, específicamente, se ha descrito que las ondas P3 y N3 desaparecen durante la etapa 4 de la EH. Algunos investigadores han sugerido que la prolongación de la latencia del componente N3 de los PES pueden discriminar entre la EH subclínica y clínica⁵. Así mismo se ha sugerido que la sensibilidad de los PES para el diagnóstico de la EH subclínica es mayor que el de las pruebas neuropsicológicas ¹², aunque la evidencia que apoya esto último es contradictoria¹³.

2. HIPOTESIS SOBRE LOS MECANISMOS FISIOPATOGENICOS DE LA EH

Inicialmente, se consideró que la falla hepática condicionaba la aparición de encefalopatía, a través de la disminución de la síntesis de una sustancia necesaria para el funcionamiento normal del cerebro, pero de naturaleza distinta a la glucosa¹⁴. En la actualidad se considera que la génesis de la encefalopatía hepática es multifactorial y resulta de la incapacidad del hígado para eliminar sustancias del plasma capaces de modular la función del Sistema Nervioso Central. La evidencia que apoyó inicialmente esta hipótesis, provino de las observaciones hechas durante experimentos de circulación cruzada en ratas con insuficiencia hepática experimental, en los que se mostró que la función cerebral, evaluada por el grado de anomalías electroencefalográficas, mejoraba si la sangre arterial de los animales afectados se perfundía en la vena porta de ratas normales. En contraste, el grado de mejoría de la función cerebral era menor si la perfusión se hacía en la vena yugular¹⁵. Por otro lado, el hecho de que el tratamiento estándar de la EH tendiente a reducir la interacción entre la flora bacteriana y sustancias nitrogenadas mejora el cuadro de encefalopatía en pacientes cirróticos, sugirió que la flora intestinal pudiera ser el origen de estas sustancias^{1,3,16}.

El estudio de la utilización cerebral de oxígeno ($CMRO_2$) y de la glucosa ($CMR_{glucosa}$) durante episodios de EH ha mostrado una reducción importante de la tasa del metabolismo cerebral. De esta manera se ha observado que esta reducción se da de manera paralela a la aparición y el progreso del deterioro cognoscitivo¹⁷. Es así, que se ha sugerido que la reducción en la utilización de la glucosa por el cerebro durante episodios de EH muy probablemente se debe al decremento en la demanda de energía, debido a su vez, a la reducción de la actividad neuronal. En este sentido, modelos experimentales de

la EH han demostrado que las manifestaciones neuropsiquiátricas de este síndrome preceden a la reducción de los niveles cerebrales de fosfatos de alta energía¹⁷. Los hallazgos anteriores sugieren que la EH es una consecuencia de la reducción de la actividad neuronal que resulta de la falla de los sistemas de neurotransmisión, y no como se pensaba anteriormente, una consecuencia de una falla energética primaria en el cerebro. Así, el estudio subsecuente del metabolismo cerebral por medio de la espectroscopía con ¹H-NMR y ³¹P-NMR, ha mostrado en modelos experimentales de EH fulminante, que las concentraciones de fosfatos de alta energía no se alteran significativamente durante los episodios de encefalopatía^{18,19}. Como consecuencia de lo anterior, las hipótesis actuales sobre la patogénesis de la EH continúan enfocándose en las anormalidades de los sistemas de neurotransmisión que pudieran ser responsables de la inhibición neuronal característica de este síndrome.

2.1.- La Hipótesis del Amonio

Hace más de un siglo Eck²⁰ describió los efectos de la alimentación con carne a perros con anastomosis porto-cava experimental. Dichos animales desarrollaron pérdida de la coordinación motora, estupor y coma, sugiriéndose que productos nitrogenados eran los responsables de lo que se denominó como la "intoxicación por carne". En 1952 Gabuzda y cols.²¹ intentaron el tratamiento de la ascitis experimentada por los pacientes cirróticos utilizando resinas de intercambio iónico. Estas resinas tienen la característica de absorber sodio a cambio de la liberación de amonio. Este tratamiento produjo una reducción significativa del volumen de la ascitis, pero precipitó síntomas neuropsiquiátricos severos similares a los síntomas observados durante episodios de EH.

Se acepta de manera general la participación del amonio en el síndrome. El amonio es un producto de la desintegración de las aminas, los aminoácidos y las purinas por parte de las bacterias entéricas y se convierte en urea y glutamina a través del ciclo de Krebs. El ciclo se encuentra alterado en la insuficiencia hepática, por lo que se eleva la concentración plasmática de amoniaco, aumentando su captación por el cerebro y el tejido muscular²². En niños con deficiencias congénitas del ciclo de Krebs, la hiperamonemia puede producir encefalopatía²³. Por el contrario, las medidas terapéuticas tendientes a evitar la absorción intestinal de amoniaco mejoran la encefalopatía en pacientes cirróticos^{1,16}. En contraste con lo que se pudiera suponer, los valores plasmáticos de amoniaco tienen una correlación pobre con la severidad de la encefalopatía²⁴. En la intoxicación aguda por amoniaco y la hiperamonemia congénita, las convulsiones son frecuentes y características, sin embargo, éstas son raras en la encefalopatía hepática aguda o crónica¹⁶. Las cargas de amoniaco en pacientes con cirrosis e insuficiencia hepatocelular no producen las alteraciones en el EEG observadas durante episodios de EH. Además, no quedan claros cuales son los mecanismos a través de los cuales el amoniaco interfiere con el funcionamiento neuronal. Se ha propuesto un efecto deletéreo del amoniaco sobre los mecanismos energéticos del SNC, principalmente sobre el ciclo del ácido tricarboxílico, en el que se produce una producción menor de alfa-cetoglutarato y hay una mayor formación de glutamina²⁵. Sin embargo esto no ha podido ser confirmado por otros estudios²⁶, sugiriéndose que la alteración en el estado energético cerebral durante la EH es una consecuencia más que una causa de la encefalopatía²⁷. Los datos acerca del efecto del amoniaco a nivel celular también son contradictorios. Se conoce que las concentraciones altas condicionan desinhibición neuronal postsináptica en algunas

regiones del cerebro²⁸. Sin embargo otros trabajos reportan inhibición neuronal en regiones diferentes²⁹.

2.2.- La Teoría de los Neurotransmisores Falsos y de las Neurotoxinas

En 1971 Fischer y Baldessarini³⁰ propusieron la hipótesis de los "neurotransmisores falsos o débiles" de la EH. Esta hipótesis propone que la EH es el resultado de la descarboxilación en el intestino grueso de varios aminoácidos, que conduce a la producción de "neurotransmisores falsos" tales como β -feniletilamina, tyramina y octopamina³⁰. Esta hipótesis sugiere que el incremento en la inhibición neuronal se debe a una síntesis preferencial de los "neurotransmisores falsos" y el remplazo subsecuente de los "neurotransmisores verdaderos", particularmente de la dopamina y de la noradrenalina. Esta hipótesis ha sido complementada por otras observaciones en las que también se ha involucrado al metabolito neuroactivo del triptofano triptamina y a las β -carbolinas como posibles "neurotransmisores falsos"³¹.

Así también, se ha sugerido que la disminución de la afinidad de los receptores dopaminérgicos observada en el estriado de ratas con EH experimental inducida por galactosamina pudiera contribuir a los efectos deletéreos de los "neurotransmisores falsos"^{30,32}. Sin embargo, se ha reportado que la administración intraventricular de octopamina no produjo cambios en el estado de alerta de ratas normales a pesar de condicionar depleción de noradrenalina cerebral³³, además de que no se han demostrado alteraciones funcionales en los receptores postsinápticos dopaminérgicos de conejos con coma hepático³⁴. Adicionalmente, ensayos clínicos controlados con L-dopa y bromocriptina en pacientes con EH han fallado en mostrar una mejoría clínica significativa posterior a su administración^{35,36,37}.

Se ha sugerido también, que la presencia combinada de neurotoxinas, específicamente mercaptanos, ácidos grasos de cadena corta y fenoles pudieran estar involucrados en la producción de la EH, describiéndose la acumulación de estas sustancias durante episodios de insuficiencia hepática^{38,39,40}. En este sentido, se ha mostrado que la administración conjunta de dosis "subcomatosas" de amoniaco, metanetiol y ácido octanoico a ratas normales puede producir encefalopatía. Se observó también, que las concentraciones cerebrales de estas neurotoxinas alcanzaron niveles similares a los de ratas con coma secundario a la desvascularización hepática experimental^{38,39}. Así mismo, se ha reportado que los PEV de ratas con coma inducido por la infusión de cloruro de amonio, dimetildisulfuro y ácido octanoico fueron similares a los PEV de ratas con EH experimental provocada por galactosamina⁴¹. Se ha propuesto como mecanismo de acción de las neurotoxinas en la EH, la interferencia de estas sustancias con el funcionamiento de la ATPasa encargada del transporte de sodio y potasio, condicionando un incremento del sodio intracelular y alteraciones de la neurotransmisión⁴². Sin embargo estos hallazgos tampoco han podido ser reproducidos^{24,43}. Además de que las concentraciones plasmáticas y cerebrales de los mercaptanos correlacionan pobremente con las etapas de severidad de la EH⁴⁴.

2.3.- La Teoría GABAérgica de la EH

Evidencia experimental sugiere que un incremento en la inhibición de la neurotransmisión mediada por el ácido gama-amino-butírico (GABA), puede contribuir a la presentación de las manifestaciones de la encefalopatía hepática. El GABA es el principal neurotransmisor inhibitorio del SNC de los mamíferos. Entre el 40 % y el 45 % de las terminaciones neuronales lo utilizan. Este es sintetizado por la descarboxilasa del

glutamato. La mayor parte del GABA se almacena en vesículas presinápticas y cuando es liberado a la hendidura se une a su receptor en las neuronas postsinápticas. La sustancia es rápidamente removida de la hendidura sináptica mediante dos procesos: un mecanismo de recaptura de alta afinidad a través del cual es reincorporado a las vesículas de almacenamiento y su destrucción enzimática por la transaminasa del GABA⁴⁵. La activación del complejo receptor GABA-ionoforo de cloro condiciona el influjo de iones de cloro incrementando la polaridad de la membrana neuronal en reposo y el umbral de su potencial de acción (Figura 1). En 1987 utilizándose secuencias parciales de aminoácidos provenientes de receptores GABAérgicos bovinos purificados, fue posible clonar varias de las subunidades que componen al principal receptor del GABA en el CNS, el receptor GABA_A⁴⁶ (Figura 1). Hasta la fecha ha sido posible clonar cinco clases distintas de subunidades polipeptídicas del receptor GABA_A: las subunidades α , β , γ , δ y ρ , así como numerosas isoformas de cada subunidad⁴⁷. No obstante que la composición exacta de subunidades de la mayoría de los receptores GABA_A se desconoce, se sabe que la composición de estos receptores varía de región a región, incluso entre neuronas dentro de una región específica del cerebro. Se ha sugerido que el sitio específico del receptor GABA_A se encuentra en la subunidad β , aunque la coexpresión de la subunidad α , particularmente de la isoforma α_1 parece ser necesaria para la expresión de un receptor con alta afinidad por el GABA. La presencia de otras isoformas de la subunidad α parecen condicionar diferencias en la afinidad del receptor GABA_A por su ligando⁴⁸.

La evidencia experimental que inicialmente apoyó a la hipótesis GABAérgica de la EH, provino de experimentos en los que se observó que la instilación de menos de una μmol de GABA en la región del hipocampo de conejos en estado de alerta, produjo una

disminución de la actividad locomotriz y el adormecimiento del animal. Estos cambios conductuales se acompañaron de un predominio de la actividad delta en el EEG, similar al observado en el EEG de pacientes con EH⁴⁹. Por otro lado, por medio de un ensayo de radioreceptor, se detectó en el suero de conejos con EH un factor capaz de desplazar a el ³H-GABA de membranas postsinápticas. La concentración detectada de este ligando en los conejos con EH fue 12 veces mayor que la observada en el suero de los conejos controles. El análisis cromatográfico de esta sustancia indicó que el perfil de este factor correspondía al del GABA⁵⁰. En otro estudio, las determinaciones seriadas de la concentración de el GABA en el plasma posteriores a la inyección de galactosamina, mostraron que conforme la función hepática declinaba, los niveles plasmáticos de el GABA se incrementaron progresivamente horas antes de la aparición de la encefalopatía⁵¹. Este incremento en los niveles séricos de el GABA se ha observado tanto en pacientes con encefalopatía secundaria a enfermedad hepatocelular aguda como crónica, pero particularmente después de episodios agudos de sangrado del tubo digestivo^{51,52}. Por otro lado, también se reportó que animales de laboratorio experimentaron un incremento en la amplitud de la onda P1 de los PEV. Este incremento se correlacionó con el grado de inhibición de la neurotransmisión mediada por la activación del receptor GABA_A¹⁰.

Evidencia adicional que ha apoyado a la hipótesis GABAérgica de la EH, ha provenido de experimentos en los que se empleó al inhibidor de la transaminasa del GABA, el gama-vinil-GABA. En este trabajo se mostró que el incremento de la actividad GABAérgica sérica y la consecuente acumulación de el GABA no catabolizado en el cerebro se asoció con la presentación de encefalopatía⁵³.

Con el objetivo de evaluar si la flora intestinal era la fuente de producción de los niveles excesivos de el GABA en la EH, se determinaron de manera simultánea las concentraciones plasmáticas del GABA en la sangre proveniente de la aorta y en la proveniente de la vena porta. De esta manera se reportó que la concentración plasmática de el GABA fue dos veces mayor en el sistema portal, sugiriéndose que los niveles excesivos de este compuesto durante los episodios de EH eran de origen intestinal⁵⁴. Así también, se ha reportado que la *Escherichia. Coli* y el *Bacteroides Fragilis* cultivados anaeróticamente, sintetizan a el GABA de manera proporcional al incremento de su población⁵⁴.

El estudio de las alteraciones de la barrera hematoencefálica durante episodios de insuficiencia hepática con el empleo del isómero no metabolizable de GABA, el ácido-C-alfa-aminoisobutírico (C-AIB) marcado radioactivamente, ha mostrado un incremento importante de su permeabilidad pocas horas antes de la aparición de la encefalopatía, especialmente en algunas áreas de la materia gris⁵⁵.

EL estudio de las membranas postsinápticas provenientes de cerebros de pacientes fallecidos durante episodios de encefalopatía hepática, por medio de la técnica de radioreceptor, utilizando ³H- GABA como ligando, ha mostrado la presencia de dos receptores con diferentes afinidades. El coma hepático se asoció con un incremento del doble en el número de ambos receptores sin reportarse cambios en su afinidad. En contraste, durante episodios de encefalopatía urémica, las membranas postsinápticas no mostraron dichas alteraciones^{51,56}. Se ha especulado que en la falla hepática, las altas concentraciones cerebrales de GABA pudieran inducir un proceso de regulación "hacia

arriba" de sus receptores, lo que condicionaría una mayor sensibilidad del cerebro a la inhibición GABAérgica⁵⁶.

La evidencia farmacológica ha mostrado que la manipulación de los receptores GABA-A con el antagonista del GABA, bicuculline, así como con el bloqueo directo de los canales de cloro con isopropilbiciclofosfato en conejos con EH experimental grado II y III, condiciona una mejoría transitoria pero consistente de la inhibición conductual, así como la normalización de la onda P1 de los PEV^{57,10}. Por otro lado, se ha observado que la dosis media de bicuculline requerida para provocar convulsiones, es significativamente mayor en los conejos con EH que en los animales controles, sugiriéndose un incremento de la resistencia neuronal al efecto proconvulsivo de la bicuculline asociado a la EH¹⁰. Este efecto "anticonvulsivo" de la EH ha sido descrito por otros autores. Así, también se ha reportado un incremento en la resistencia a los efectos proconvulsivos del inhibidor de la descarboxilasa de glutamato, el ácido 3-mercaptopropionico, en ratas con EH experimental⁵⁸.

Sin embargo, a pesar del cúmulo de evidencias que han sugerido el involucramiento del sistema de neurotransmisión GABAérgico en la patogénesis de la EH, estudios conducidos posteriormente en diversos modelos animales así como en tejido cerebral de origen humano, han arrojado evidencia contradictoria que ha cuestionado dicha hipótesis. De esta manera, los hallazgos iniciales que describían las alteraciones en los niveles plasmáticos y cerebrales de GABA, así como las alteraciones en los sistemas enzimáticos del sistema GABAérgico observados durante la falla hepática, no han podido ser reproducidos por otros investigadores^{57,59,60,61,62,63,64}. Así mismo, no se han observado nuevamente las alteraciones en la afinidad y en la densidad de los receptores

GABAérgicos postsinápticos descritas previamente en el modelo experimental de la EH^{57,61,62,65}. El estudio postmortem del tejido cerebral de paciente fallecidos durante un episodio de coma hepático, tampoco ha revelado cambios en las concentraciones de el GABA, alteraciones en las enzimas del sistema GABAérgico o cambios en la densidad y la afinidad de los receptores GABAérgicos⁶⁶. Además, existe evidencia que sugiere que los reportes iniciales que describían el incremento de la densidad de los receptores GABAérgicos en cerebros de pacientes fallecidos durante episodios de EH, pudieran haber sido sesgado por la inclusión de una proporción importante de pacientes alcohólicos, ya que se sabe que las membranas postsinápticos provenientes de cerebros de este tipo de pacientes tienen un incremento en la densidad de los receptores GABAérgicos⁶⁷.

2.4.- La Teoría Benzodiazepínica de la EH

Diversos estudios han documentado una asociación funcional entre los receptores de el GABA y los receptores de las benzodiazepinas. Por ellos se sabe que estas últimas incrementan los efectos electrofisiológicos de GABA. Más aun, se ha demostrado una asociación física entre los receptores benzodiazepínicos y los receptores GABA_A⁶⁸. Se ha sugerido que el sitio de unión de los ligandos benzodiazepínicos en el complejo receptor GABA-ionoforo de cloro se encuentra en la subunidad α (Figura 1). Al parecer, los receptores que se componen de las subunidades α_3 así como de las subunidades β_1 y α_2 , se caracterizan por mostrar la respuesta de mayor magnitud a los ligandos benzodiazepínicos, en comparación con la respuesta exhibida por los receptores compuestos por las subunidades α_1 y α_2 ⁶⁹. Además, parece ser que la coexpresión de la subunidad γ y la de sus diferentes isoformas ($\gamma_1, \gamma_2, \gamma_3$), es una condición necesaria para

que ocurra la potenciación alostérica de la respuesta al GABA producida por los ligandos benzodiazepínicos. Este fenómeno de potenciación es una característica que se ha observado en la mayoría de los receptores GABA_A⁷⁰.

La similitud entre los modelos de EH y los de la encefalopatía inducida por agonistas benzodiazepínicos, particularmente las anomalías en la respuesta de los PEV⁹, ha sugerido la posibilidad de que la potenciación alostérica de los efectos del GABA a nivel del receptor de las benzodiazepinas este involucrada en la EH. En este sentido, se ha reportado un incremento en la densidad de los receptores a las benzodiazepinas en membranas postsinápticas de ratas con coma hepático inducido con la administración de galactosamina⁷¹. Así también, se ha descrito un incremento en la sensibilidad de los receptores a las benzodiazepinas durante la falla hepática aguda experimental, susceptible de ser revertida con la administración del antagonista del receptor de las benzodiazepinas, el flumazenil¹⁰.

En una investigación que empleó la técnica de radioreceptor para determinar la actividad tipo benzodiazepina en extractos de cerebro de ratas con EH experimental, se reportaron concentraciones de sustancias con esta actividad cuatro a seis veces mayores que las detectadas en ratas controles normales, identificándose estos compuestos como diazepam y N-desmetil-diazepam⁷². En otro trabajo, por medio de radioinmunoensayo, se detectó en el líquido cefalorraquídeo y el suero de seis pacientes con encefalopatía hepática, concentraciones de actividad tipo benzodiazepina cuatro veces mayores en comparación con las encontradas en controles sanos, pacientes con insuficiencia hepática sin encefalopatía y pacientes con encefalopatía no hepática⁷³. Posteriormente se reportó que los niveles plasmáticos de diazepam y N-desmetildiazepam y la concentración total de

ligandos del receptor benzodiazepínico en 25 pacientes con diferentes estadios de EH correlacionaron significativamente con la severidad de la EH ⁷⁴.

Se ha propuesto que la elevación en la concentración de los ligandos del receptor benzodiazepínico, que se ha observado en ratas con EH experimental y pacientes con EH, se debe en parte al incremento en la disponibilidad de ligandos benzodiazepínicos que podrían ser sintetizados por bacterias intestinales⁷⁵. En este sentido, se ha descrito que la administración del antibiótico rifaximina redujo en un 40% los niveles de compuestos benzodiazepínicos en la sangre de pacientes con cirrosis hepática. Aunque en este reporte no se menciona si hubo cambios en el status cognoscitivo de los pacientes secundarios a la administración del antibiótico⁷⁶.

Por otro lado, se ha descrito por medio de la Tomografía por Emisión de Positrones (TEP), un incremento en la recaptura cerebral del ligando del receptor benzodiazepínico C¹¹-Flumazenil en pacientes con EH⁷⁷, lo que sugeriría un incremento en la permeabilidad de la barrera hemato-encefálica para estos compuestos durante episodios de EH.

Experimentos realizados en el modelo animal de la falla hepática aguda, así como de observaciones clínicas, en las que se ha reportado una mejoría de las alteraciones conductuales y de las anomalías electrofisiológicas secundarias a la administración de el antagonista benzodiazepínico flumazenil, han provisto de evidencia adicional en favor de la teoría benzodiazepínica de la EH. Así, se ha descrito que este compuesto induce un incremento en la frecuencia de disparo espontáneo de las neuronas de Purkinje en conejos con falla hepática fulminante⁷⁸. Los reportes anecdóticos sobre el uso de flumazenil en pacientes con cirrosis hepática y EH, en general han descrito una disminución de las

alteraciones clínicas y electroencefalográficas. De esta manera, se reportó que el uso del flumazenil en pacientes con falla hepática por hepatitis B y encefalopatía grado 4 condicionó una mejoría clínica significativa, aunque esta fué parcial y de breve duración⁷⁹. Dos reportes de manera independiente, describieron una mejoría de la encefalopatía en cuatro pacientes con falla hepática fulminante⁸⁰, así como en cuatro pacientes con cirrosis hepática alcohólica descompensada con encefalopatía grados 3 y 4⁸¹. Así mismo, se reportó que la administración de flumazenil se asoció con una remisión de los síntomas de la encefalopatía porto-sistémica crónica intratable⁸². Los resultados de un estudio clínico controlado en el que se comparó el efecto de la infusión de .2 mg. de flumazenil en el estado cognoscitivo de 10 pacientes con EH subclínica o latente, con el de la infusión de este compuesto a 10 sujetos normales, mostró que únicamente los pacientes con EH experimentaron un acortamiento significativo en el tiempo de reacción simple que siguió a la infusión de flumazenil. En contraste, la infusión de solución salina no produjo ningún cambio en el estado cognoscitivo de los pacientes con EH ni en el de los sujetos controles. Los hallazgos anteriores sugieren que el flumazenil tiene un efecto específico sobre el componente cognoscitivo de la prueba de reacción simple que no afecta al componente motor. De esta manera, se sugirió que el efecto antagónico del flumazenil sobre el receptor de las benzodiazepinas, pudiera mediar la mejoría de la función cognoscitiva, particularmente, la mejoría en la velocidad del proceso de información en pacientes con EH latente⁸³.

No obstante el cúmulo de evidencia en favor de la hipótesis benzodiazepínica de la EH, intentos posteriores de reproducir estos hallazgos han dado resultados contradictorios. Así, se ha reportado que aunque los cerebros de pacientes con EH secundaria a la falla

hepática fulminante presentaron niveles elevados de ligandos del receptor benzodiazepínico⁸⁴, los cerebros de pacientes con EH debida a la anastomosis portal-sistémica no mostraron cambios en las concentraciones de dichos ligandos⁸⁵. Tampoco ha sido posible detectar alteraciones en la densidad y afinidad de los receptores benzodiazepínicos en el tejido cerebral de pacientes cirróticos fallecidos durante episodios de EH⁶⁶. Por otro lado, se ha descrito que la EH experimental inducida por medio de la anastomosis porto-cava, no fué revertida con la administración de flumazenil, a pesar de que se administraron dosis suficientes para revertir el coma inducido con la administración de diazepam⁸⁶. Otro grupo de investigadores reportó hallazgos negativos similares, después de que intentaron mejorar las manifestaciones conductuales de la EH administrando flumazenil a conejos con falla hepática isquémica⁸⁷. Otros reportes han descrito una falta de efectividad del flumazenil o tan solo una mejoría modesta despues de la administración de dosis elevadas de flumazenil a ratas con falla hepática inducida con tioacetamida^{88,89}.

En humanos, los resultados de un ensayo clínico controlado con flumazenil en el tratamiento de la EH, mostraron que a pesar que la administración de flumazenil se asoció con una reducción del 50% en los síntomas de la EH, ésta unicamente se observó en 40% de los pacientes. Los autores de este trabajo ademas reportaron, que a pesar de la mejoría en la severidad de la EH, no pudieron detectar concentraciones plasmáticas de ligandos del receptor benzodiazepínico en los pacientes que respondieron al flumazenil⁹⁰.

Se han descrito anomalías importantes en la farmacokinética del flumazenil en pacientes que sufren de cirrosis hepática⁹¹, lo que ha sugerido que el incremento en la permeabilidad de la barrera hemato-encefálica para este compuesto observado en la TEP

durante episodios de EH⁷⁷, fué probablemente consecuencia del aumento en la disponibilidad de flumazenil no ligado a proteínas. Se ha propuesto que este fenómeno se debe a la reducción en la tasa de eliminación del flumazenil, la cual incrementa su recaptura cerebral⁹¹.

Se ha sugerido que las discrepancias entre los trabajos que han tratado de determinar la presencia de ligandos endógenos del receptor benzodiazepínico en pacientes y en los modelos experimentales de EH, pudieran deberse a diferencias en la metodología empleada para la extracción y purificación de estos ligandos. Se ha argumentado que los trabajos que han reportado hallazgos negativos han utilizado extracciones "crudas" sin la utilización de procedimientos de purificación y de concentración. La importancia de estos procedimientos se debe a que en el plasma y el tejido cerebral existen muchas sustancias que pueden interferir con el ensayo de radioreceptor⁹².

Otro problema importante con la teoría benzodiazepínica de la EH, es que la identidad de los ligandos endógenos del receptor de las benzodiazepinas involucrados en la génesis de la EH, no ha podido ser completamente caracterizada. En este sentido, se ha reportado que el LCR de pacientes con EH contiene diferentes moléculas capaces de desplazar ligandos benzodiazepínicos durante ensayos de radioreceptor. Algunos de estos compuestos han demostrado el tener propiedades agonísticas capaces de potenciar alostéricamente la neurotransmisión GABAérgica. Sin embargo se ha observado que la naturaleza y las concentraciones relativas de los ligandos benzodiazepínicos detectados en humanos difiere del de los detectados en los modelos animales de falla hepática fulminante⁸⁵.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La insuficiencia hepática es un problema de salud frecuente y la encefalopatía es una de sus complicaciones más importantes. Hasta el momento se desconocen los mecanismos neuroquímicos subyacentes. Evidencias recientes sugieren la participación de agonistas benzodiazepínicos endógenos en la génesis de este trastorno; sin embargo el número de pacientes estudiados es bajo y la evidencia disponible es conflictiva. Esto último debido probablemente a diferencias metodológicas en la extracción y purificación de los ligandos benzodiazepínicos endógenos. Debido a lo anterior es importante abordar esta línea de investigación.

4. OJETIVOS DE LA INVESTIGACION

- a) Comparar los niveles séricos de la actividad tipo benzodiazepínica de los pacientes con encefalopatía hepática , con los de pacientes con insuficiencia hepática sin encefalopatía, pacientes con encefalopatía urémica y los de sujetos normales.
- b) Determinar la relación existente entre los niveles séricos de la actividad benzodiazepínica y la severidad de la encefalopatía hepática en pacientes con insuficiencia hepática.
- c) Comparar los niveles de la actividad benzodiazepínica en extractos séricos "crudos" con los de extractos séricos procesados por medio de el método de extracción y purificación de fase sólida.

5. HIPOTESIS

- a) Los niveles séricos de la actividad tipo benzodiazepínica de los pacientes con EH serán significativamente mayores que aquellos determinados en el suero de pacientes con insuficiencia hepática sin encefalopatía, pacientes con encefalopatía urémica y los de sujetos normales.
- b) Los niveles séricos de la actividad tipo benzodiazepínica se correlacionarán positivamente con la severidad de la EH.
- c) Los niveles séricos de la actividad tipo benzodiazepínica serán detectados cuando se utilice un método de extracción y purificación de fase sólida para procesar los extractos séricos. En contraste la actividad tipo benzodiazepínica no será detectada en los extractos séricos que no se procesen de esta forma.

6. MATERIAL Y METODOS

6.1.- Pacientes

a) Criterios de Inclusión

Se estudió a pacientes que ingresaron al servicio de Urgencias y Medicina Interna del Instituto Nacional de la Nutrición "Dr. Salvador Zubiran" que cumplieron los siguientes criterios:

-Entre 18 y 55 años de edad

-Cualquier sexo

-Diagnóstico, por el servicio pertinente, de: insuficiencia hepática con o sin encefalopatía, encefalopatía urémica.

-Que el paciente y/o su familiar responsable firmaran una carta de consentimiento para participar en el estudio después de que se le explico a su satisfacción.

b) Criterios de exclusión

-Pacientes que en base a la historia clínica de ingreso tuviesen antecedentes de patología mental importante; v.g., trastorno esquizofrénico o demencia.

-Pacientes que estuviesen recibiendo alguna droga con efectos psicotrópicos (v.g. barbitúricos, benzodiazepinas, anticolinérgicos con acción central, antihistamínicos, etc.) las ultimas cuatro semanas previas a su ingreso al estudio.

-Negativa por parte del médico tratante para que el paciente fuera incluido en la investigación.

6.2.- Diseño

Se trató de un escrutinio analítico y transversal.

6.3.- Variables

- a) La concentración sérica (equivalentes de flunitrazepam) de los ligandos del receptor de las benzodiazepinas (LRBZD; Anexo 2).
- b) El estadio de severidad de la EH (Tabla 1).
- c) Los Puntajes de la escala del Exámen Cognoscitivo Breve de Folstein⁹³.
- d) Los procedimientos de extracción y purificación de los LRBZD (Anexo 2).
- e) El grado de inhibición del acoplamiento de ³H-flunitrazepam a su receptor en una preparación de sinaptosomas (cuentas de radioactividad por minuto o c.p.m), condicionado por la adición de los extractos séricos obtenidos (Anexo 2).

6.4.- Procedimientos

Posterior a la autorización del estudio por parte de la Comisión de Investigación y Ética del Instituto Nacional de la Nutrición de acuerdo a la Ley general de Salud en materia de Investigación para la Salud, se realizaron reuniones de información con el personal médico encargado del ingreso de los pacientes. La intención de esta actividad fue informarles acerca de las características del estudio para la captación de pacientes. El procedimiento se llevó a cabo de la siguiente manera:

- a) Los pacientes fueron capturados en el servicio de Medicina Interna y Urgencias del Instituto Nacional de la Nutrición, mediante visitas diarias a dichos servicios, haciendo una revisión de los ingresos y entrevistándose con el personal encargado de dichos pacientes.
- b) La selección de los pacientes se realizó en base a los criterios de inclusión y exclusión mencionados en el punto de población a estudiar (5.1). Se realizó una revisión exhaustiva del expediente clínico para recabar datos como edad, sexo, antecedentes

psiquiátricos personales y familiares, tipo y características de la hepatopatía, evolución y medicación. Todos los datos fueron registrados en un expediente ad hoc para cada paciente, el cual fué numerado de manera progresiva de acuerdo al orden de ingreso a la investigación.

c) Las evaluaciones clínicas de los pacientes se realizaron mediante un examen del estado mental de acuerdo a los criterios diagnósticos estándar para encefalopatía hepática (Tabla 1) y del DSM-III-R para Síndromes Orgánicos Cerebrales tipo Delirium. Así mismo, se aplicó la escala del Exámen Cognoscitivo Breve de Folstein⁹³ para una evaluación cuantitativa de las alteraciones cognoscitivas. Esto se llevó a cabo dentro de las primeras 24 horas de su ingreso. Además se entrevistó al personal del área o médico tratante acerca del comportamiento del paciente durante el tiempo en que el investigador no estuvo presente. Esta información fué registrada y tomada en cuenta para conformar el diagnóstico. De esta manera, tanto el diagnóstico y severidad de la encefalopatía fué determinado conjuntamente por el médico tratante y el investigador principal.

d) Para fines de comparación se estratificó a los pacientes estudiados de acuerdo a la presencia o no de encefalopatía hepática, así como a la severidad del cuadro en siete grupos: insuficiencia hepática sin encefalopatía, encefalopatía hepática etapa 1, encefalopatía hepática etapa 2, encefalopatía hepática etapa 3, encefalopatía hepática etapa 4, encefalopatía urémica y sujetos normales. En los casos en los que se presentó la entidad, el tratamiento se llevo a cabo de acuerdo a las normas del INN.

e) La toma de muestras sanguíneas para la medición de la actividad benzodicepínica, se realizo de manera simultánea a la evaluación del estado mental y fue

realizada por el personal de enfermería a cargo del paciente o por el investigador responsable.

f) El análisis de las muestras se llevó a cabo en el Laboratorio de Neurobiología del Departamento de Psiquiatría del Centro Médico de la Universidad de Connecticut por medio de la técnica de radiorreceptor (Anexo 1) y de acuerdo con los procedimientos descritos en el anexo 2.

7. ANALISIS DE RESULTADOS

Para el reporte de datos demográficos y clínicos, de acuerdo a las características de cada variable, se utilizaron porcentajes, promedios (M) y desviaciones estándar (DE). Pruebas de contraste de medias y de proporciones fueron entonces empleadas, dependiendo de la naturaleza de cada variable. Debido a la falta de normalidad en la distribución de las c.p.m. obtenidas con el ensayo de radiorreceptor, se procedió a transformar logarítmicamente esta variable, para posteriormente llevar a cabo la comparación entre los diferentes grupos diagnósticos con el análisis de varianza (ANOVA) de una vía. Se emplearon la prueba de Tukey-HSD y la prueba LSD para el análisis *post hoc*. Así también se empleó la prueba de Levene para determinar la homogeneidad de la varianza entre los grupos diagnósticos. Para los niveles séricos de LRBZD (equivalentes de flunitrazepam) se calcularon medianas (Md) y el intervalo de valores mínimo y máximo ($I_{\min-\max}$), esto último debido también a la falta de normalidad y al sesgo en su distribución. Las comparaciones entre los grupos con y sin EH se hicieron utilizando el ANOVA de Kruskal-Wallis de una sola vía para el contraste de rangos. Posteriormente, se empleó la prueba U de Mann-Whitney para el análisis *post hoc*. Los pacientes con EH fueron entonces estratificados en cuatro grupos de acuerdo al grado de severidad de la encefalopatía procediéndose a calcular la matriz de correlación de Spearman entre las concentraciones séricas de los LRBZD y el grado de severidad de la EH. En este último análisis se incluyó también a las concentraciones séricas de los LRBZD de los pacientes con CH como el grupo de menor severidad. Posteriormente y debido a que en algunos pacientes la concentración de los LRBZD detectada fue farmacológicamente insignificante (< 2 nMol), se utilizó la prueba exacta de Fisher para

comparar la proporción de pacientes en cada grupo diagnóstico con concentraciones séricas de LRBZD que fueran farmacológicamente significativas. El nivel de α se fijó a un nivel de 0.05 en todas las pruebas estadísticas realizadas.

8. RESULTADOS

8.1.- Descripción de la Muestra

Un total de 47 individuos fueron incluidos en el estudio (Tabla 2), de estos, 24 pacientes (51%) fueron diagnosticados con un cuadro de EH, 10 pacientes (21%) lo fueron con CH sin encefalopatía, cuatro pacientes (9%) lo fueron con EU y nueve sujetos fueron voluntarios en buen estado de salud (19%). De los 24 pacientes diagnosticados con EH, siete pacientes (29%) tuvieron EH grado 1, nueve pacientes (37%) tuvieron EH grado 2, cuatro pacientes (17%) tuvieron EH grado 3 y otros cuatro pacientes (17%) tuvieron EH grado 4. Todos los pacientes, o sus familiares en su defecto, otorgaron su consentimiento informado para participar en la investigación. Los pacientes con EH, así como los pacientes con EU fueron reclutados en el servicio de urgencias durante visitas motivadas por el deterioro agudo en su estado mental, mientras que los pacientes con CH fueron captados durante visitas de rutina al servicio de consulta externa. Todos los pacientes con enfermedad hepática (independientemente de la presencia de encefalopatía o no) tuvieron documentado previamente, por medio de biopsia hepática, el diagnóstico de cirrosis hepática.

Las características demográficas y clínicas de los pacientes estudiados se resumen en la tabla 2. La mayoría de los pacientes con CH y de los pacientes con EH tuvieron un diagnóstico de alcoholismo o hepatitis viral como las principales causas de daño hepático. La mayoría de los pacientes en estos dos grupos también tuvieron un diagnóstico previo de hipertensión portal con severidad de moderada a severa. Poco más de la mitad de los pacientes con EH experimentaron sangrado del tubo digestivo alto como la causa desencadenante más frecuente de la encefalopatía. Así también, la mayoría de los

pacientes con EH tuvieron historia de episodios previos de EH, mientras que solo un tercio de los pacientes con CH tuvieron historia previa de encefalopatía.

La mayoría de los pacientes en el grupo de EU fueron varones, con nefropatía diabética como la causa principal de falla renal, seguida de nefropatía hipertensiva y de glomerulonefritis. Poco menos de la mitad de los voluntarios sanos fueron hombres.

Los puntajes promedio de la escala de Folstein de los tres grupos de pacientes se describen en la tabla 3. El grupo CH presentó los puntajes más altos y el grupo EU mostró los puntajes más bajos, con el grupo EH mostrando puntajes intermedios. Entre los pacientes con EH, el grupo EH grado 1 tuvo un puntaje promedio de 21.3 (DE = 1.5), el grupo EH grado 2 tuvo un puntaje de 14.4 (DE = 2.3), mientras que los grupos EH grado 3 y EH grado 4 tuvieron respectivamente puntajes de 7.5 (DE = 1.7) y de cero.

8.2.- Comparación de los Niveles Séricos de los LRBZD

Cuando las muestras de sangre obtenidas fueron procesadas por medio de un método de purificación y concentración de los LRBZD (Anexo 2), se detectaron concentraciones séricas de LRBZD farmacológicamente significativas ($>2\text{nMol}$; Tabla 3) en el grupo de pacientes con EH ($Md = 3.00$, $I_{\text{min-max}} = .001 - 1000.00$), y en el grupo de pacientes con CH ($Md = .36$, $I_{\text{min-max}} = .004 - 200.00$). No se detectaron concentraciones séricas con significancia farmacológica en el grupo de pacientes con EU ($Md = .005$, $I_{\text{min-max}} = .001 - .012$) y en el grupo de controles sanos ($Md = .001$, $I_{\text{min-max}} = .001 - .63$). Posteriormente, cuando se compararon las concentraciones séricas de LRBZD, se observaron diferencias estadísticamente significativas a través de los cuatro grupos diagnósticos ($\chi^2 = 13.12$, $df = 3$, $p = 0.004$; Tabla 3). Los niveles séricos de LRBZD de los pacientes que experimentaron un episodio de EH al momento de la toma de muestra

fueron significativamente mayores en comparación con los niveles séricos de los voluntarios sanos (U de Mann-Whitney, $p = 0.004$) y en comparación con los de los pacientes con EU ($p = 0.04$). Sin embargo los niveles séricos de LRBZD de los pacientes con EH no difirieron significativamente de los niveles detectados en pacientes con CH sin encefalopatía ($p = 0.20$). Adicionalmente, se observó que los niveles séricos de LRBZD de los pacientes con CH fueron significativamente mayores que los niveles encontrados en el grupo de los controles sanos ($p = 0.01$) y que los niveles séricos de los pacientes con EU ($p = 0.01$).

Por otro lado, cuando se comparó la proporción de pacientes con concentraciones séricas de LRBZD farmacológicamente significativas (> 2 nMol; Tabla 3) en cada grupo diagnóstico, ésta fue significativamente mayor en el grupo de pacientes con EH (71%) en comparación con el grupo de los controles sanos (0%; Prueba Exacta de Fisher, $p = 0.02$) y en comparación con en el grupo de pacientes con EU (0%; $p = 0.02$), en los que las concentraciones séricas de LRBZD fueron insignificantes. Aún más, la diferencia en la proporción de pacientes con niveles séricos de LRBZD farmacológicamente significativos, entre el grupo de pacientes con EH y el grupo de pacientes con CH sin encefalopatía (20%) fué también significativa ($p = 0.009$).

8.3.- Relación de los Niveles Séricos de los LRBZD con la CH y la Severidad de la EH

Los niveles séricos de LRBZD se encontraron moderadamente correlacionados con la CH y el grado de severidad de la EH ($r = .46$, $p = 0.007$; Figura 2), observándose que las concentraciones séricas más bajas de LRBZD se presentaron en los pacientes con CH ($Md = .35$, $I_{\min-max} = .00 - 200$) y en los pacientes con EH grado 1 ($Md = 4.0$, $I_{\min-max} =$

2.0 - 251) y grado 2 (Md = .001, I_{min-max} = .001 - 250). Mientras que las concentraciones más altas se observaron en pacientes con EH grado 3 (Md = 13.0, I_{min-max} = .02 - 20.0) y grado 4 (Md = 5.5, I_{min-max} = 2.0 - 1000.0). La correlación entre los puntajes de la escala de Folstein y la concentración sérica de LRBZD fué también significativa (r = -.53, p = 0.001; Tabla 3), donde las concentraciones elevadas de LRBZD se asociaron moderadamente con una disminución en el puntaje de la escala de Folstein.

8.4.- Comparación de los Metodos de Extracción y Purificación de los LRBZD

a) La actividad benzodiazepínica en extractos séricos "crudos".

En un primer experimento en el que se evaluó la habilidad de los sobrenadantes séricos "crudos" para desplazar ³H-flunitrazepam en el ensayo de radiorreceptor (Figura 3 y Anexo 2), se observó que los sueros provenientes de los pacientes con CH condicionaron el mayor grado de desplazamiento (M = 4.009), DE = 6.08E-02), seguidos de los sueros de los pacientes con EH (M = 4.012, DE = 9.57E-02), los sueros de los voluntarios sanos (M = 4.078, DE = 8.07E-02) y los sueros de los pacientes con EU (M = 4.091, DE = 9.94E-02). Sin embargo las diferencias en las c.p.m. entre los diferentes grupos diagnósticos no fueron estadísticamente significativas (p = 0.11). Más aun, al tratar de convertir las c.p.m. obtenidas en este experimento a equivalentes de flunitrazepam, utilizando la curva de desplazamiento estándar obtenida inicialmente (Anexo 2 y Figura 4), no se detectaron concentraciones séricas de LRBZD (equivalentes de flunitrazepam) en ninguno de los cuatro grupos diagnósticos principales.

b) La Actividad benzodiazepínica en extractos séricos procesados por un método de purificación y concentración de fase sólida.

En un segundo experimento en el que se evaluó la habilidad de desplazamiento de los extractos séricos procesados por medio de el método de extracción de fase sólida (Figura 5 y Anexo 2), se observó que los extractos séricos provenientes de los pacientes con EH (M = 3.278, DE = 0.436) condicionaron el mayor grado de desplazamiento en el ensayo de radiorreceptor, seguidos de los extractos séricos de los pacientes con CH (M = 3.526, DE = 0.334), los extractos séricos de los voluntarios sanos (M = 3.703, DE = 6.29E-02), y de los extractos séricos de los pacientes con EU (M = 3.720, DE = 1.79E-02). No obstante que la prueba de Levene mostró diferencias significativas en la homogeneidad de las varianzas entre los grupos diagnosticos (F = 6.76, df =3,43, p = .001), las diferencias en la capacidad de los extractos séricos para desplazar ³H-flunitrazepam entre los diferentes grupos diagnósticos fueron estadísticamente significativas tanto con el ANOVA de una via (F = 4.337, df = 3,43; p = 0.009) como con la prueba de contraste de rangos de Kruskal-Wallis ($\chi^2 = 10.55$, df = 3, p = 0.01). La comparación *post hoc* con la prueba de Tukey-HSD y con la prueba LSD, demostraron diferencias significativas entre el grupo de pacientes con EH con el grupo de voluntarios sanos y con el grupo de pacientes con EU (p < 0.02). Sin embargo no se encontraron diferencias significativas entre el grupo de pacientes con EH y el de los pacientes con CH. Un análisis detallado de la habilidad de desplazamiento de los extractos séricos de los pacientes en los diferentes subgrupos de severidad de la EH, mostró, que los extractos séricos de los pacientes con EH grado 3 condicionaron el mayor grado de desplazamiento de ³H-flunitrazepam (M = 3.093, DE = 0.535), seguidos de los extractos séricos de los

pacientes con EH grado 2 ($M = 3.156$, $DE = 0.317$), los de los pacientes con EH grado 4 ($M = 3.243$, $DE = 0.300$), y los extractos séricos de los pacientes con EH grado 1 ($M = 3.560$, $DE = 0.516$). Sin embargo estas diferencias en la capacidad de desplazamiento de los extractos séricos entre los subgrupos de severidad de la EH no fueron estadísticamente significativas ($F = 1.568$, $df = 3,20$; $p = 0.22$). No se detectaron diferencias significativas en la homogeneidad de las varianzas a través de los cuatro subgrupos de severidad de la EH ($F = .344$, $df = 3,20$, $p = .79$). Por otro lado, en contraste con los hallazgos observados con la utilización de extractos séricos "crudos", y como se describió previamente en el punto 8.2, al convertir las c.p.m. obtenidas en este experimento a equivalentes de flunitrazepam (calculando el antilogaritmo del \log_{10} de la concentración de flunitrazepam "frio" expresado en la curva de desplazamiento estándar; Figura 4 y Anexo 2) se detectaron concentraciones séricas farmacológicamente significativas de LRBZD en tres de los cuatro grupos diagnósticos principales (Tabla 3).

9.- DISCUSION

Los hallazgos reportados en este trabajo muestran que el grupo de pacientes con EH mostró niveles séricos de LRBZD significativamente más elevados que los niveles observados en el grupo de los controles sanos y en el grupo de los pacientes con EU. A pesar de que no pudimos encontrar diferencias significativas entre las concentraciones séricas de los LRBZD de los pacientes con EH y las de los pacientes con CH, si observamos una proporción mayor de pacientes con niveles séricos de LRBZD farmacológicamente significativos en el grupo de la EH que en el grupo de pacientes con CH. Adicionalmente, en este trabajo observamos una correlación moderada entre los niveles séricos de los LRBZD, tanto con la severidad de la EH, como con los puntajes de la escala de Folstein. Estos hallazgos sugieren que los LRBZD plasmáticos comienza a acumularse tempranamente cuando los pacientes con CH aun no desarrollan evidencia clínica de encefalopatía o ésta es subclínica. Posteriormente, los LRBZD continuarían acumulándose a través de las etapas tempranas de la EH, hasta alcanzar su máxima concentración en las etapas 3 y 4. Nuestros hallazgos son consistentes con esta hipótesis y con observaciones previas hechas por Olasma y cols.⁸⁵, quienes también reportaron que los niveles séricos de los LRBZD correlacionaron moderadamente con los cuatro estadios de severidad de la EH.

La carencia de significancia estadística para la diferencia en la concentración sérica de los LRBZD entre los pacientes con EH y los pacientes con CH, puede ser explicada por el reducido tamaño de la muestra y en consecuencia el reducido poder estadístico para detectar tales diferencias. Sin embargo es posible que algunos de los pacientes en nuestra muestra que fueron diagnosticados con CH sin encefalopatía, pudieran en realidad haber

experimentado un cuadro de encefalopatía subclínica caracterizada por déficits cognoscitivos sutiles, no detectados por los criterios diagnósticos estándar de la EH, pero detectables por un instrumento de tamizaje como el Exámen Breve Cognoscitivo de Folstein. El puntaje medio de la escala de Folstein observado en el grupo de pacientes con CH ($M = 25.3$, $DE = 1.8$) apoya esta posibilidad. Otros autores han reportado hallazgos similares. Pomier-Layrargues y cols.⁴, administraron una batería de pruebas neuropsicológicas a 22 pacientes alcohólicos con CH, 20 pacientes con CH no alcohólica y a 42 controles sanos. Los sujetos controles tuvieron una edad y nivel de educación similar al de los pacientes. Así mismo, el nivel de disfunción hepática fue similar entre pacientes alcohólicos y no alcohólicos. Aproximadamente 76% de los pacientes con CH mostraron algún déficit neuropsicológico, particularmente prolongación en la ejecución de la prueba de Reitan. Lo anterior podría explicar la razón por la que el 20% de los pacientes del grupo de la CH en nuestra muestra tuvieron niveles plasmáticos farmacológicamente significativos de LRBZD sin mostrar signos clínicos de encefalopatía.

Por otro lado, el hecho de que casi un tercio de los pacientes con EH en nuestra muestra no tuvieran niveles plasmáticos detectables de LRBZD, sugiere que los síntomas neuropsiquiátricos de la EH no pueden ser explicados únicamente por la presencia de estos compuestos. Olasma y cols.⁸⁵ así como Basile y cols.⁸⁴ describieron la falta de detección de niveles plasmáticos significativos de LRBZD en aproximadamente 40% de un grupo de pacientes con EH. Adicionalmente, el ensayo clínico controlado con flumazenil en el tratamiento de la EH conducido por Pomier-Layrargues y cols.⁹⁰, además de mostrar una mejoría en solo el 40% de los pacientes, no pudo detectar LRBZD en el plasma de estos pacientes. Estos hallazgos sugieren que otros factores diferentes al complejo

receptor GABA-benzodiazepinas y a los compuestos benzodiazepínicos endógenos pudieran jugar un papel importante en la patogénesis de la EH, Estos factores probablemente sensibilizarían al cerebro y potenciarían los efectos de los LRBZD endógenos⁹⁴.

Un mecanismo patofisiológico plausible pero más complejo, que podría explicar el origen de la EH, podría involucrar un desbalance entre el sistema de neurotransmisión inhibitorio GABA-benzodiazepínico y el sistema de neurotransmisión excitatorio glutaminérgico condicionado por el incremento en las concentraciones plasmáticas y cerebrales de amonio⁹⁵. Es bien sabido que la glutaminasa activada por fosfato es el paso limitante en la síntesis de glutamato y de que es inhibida importantemente por las concentraciones elevadas de amonio⁹⁵. La acumulación de el amonio en el cerebro durante episodios de insuficiencia hepática podría resultar en un reducción significativa en la síntesis de glutamato, y en consecuencia, en una reducción importante de su liberación en la hendidura sináptica. Esto a su vez, condicionaría una disminución del tono excitatorio en el sistema nervioso central. Por otro lado, la síntesis de GABA es afectada en menor grado por alteraciones en la actividad de la glutaminasa⁹⁵, de tal forma, que la acumulación de amonio en conjunción con el incremento de los niveles plasmáticos y cerebrales de los LRBZD endógenos producidos por la insuficiencia hepática, conduciría a un exceso neto de la neurotransmisión inhibitoria, con el consecuente deterioro del estado mental característico de la EH. En este sentido, se ha reportado una reducción de las concentraciones de glutamato cerebral en pacientes fallecidos durante episodios de EH y en modelos experimentales de EH⁹⁶. Se ha descrito también, que la recaptura de glutamato por los astrocitos se encuentra comprometida durante la falla hepática, además

de encontrarse una disminución en la densidad de los receptores glutaminérgicos postsinápticas (NMDA y no-NMDA)⁹⁶.

Además de los LRBZD, se ha reportado la presencia de niveles elevados de neuropéptidos que poseen una gran afinidad por el complejo receptor GABA-benzodiazepinas en humanos y modelos animales de EH. En un estudio se reportó concentraciones elevadas del neuropéptido Inhibidor del Acoplamiento del Diazepam (IAD) en el LCR de algunos pacientes con EH⁹⁷. El grado de severidad de la EH correlacionó significativamente con la concentración del IAD en el LCR. Sin embargo, es sabido que el IAD es un ligando del receptor benzodiazepínico con efectos moduladores alostéricos negativos sobre la neurotransmisión GABA-érgica, por lo tanto sería de esperarse que los niveles elevados de IAD resultaran en un decremento de la facilitación de la neurotransmisión GABA-érgica y por ende un incremento en el estado de alerta. Por otro lado el IAD así como el producto de su fragmentación, el octadecaneuropéptido, también se acopla al receptor periférico de las benzodiazepinas, localizado principalmente sobre las membranas mitocondriales de los astrocitos. Las concentraciones elevadas del IAD en el LCR de pacientes con EH podrían ser consecuencia de cambios astrocíticos en los cerebros de estos pacientes⁹⁷. En este sentido se ha reportado un incremento en la densidad de los receptores periféricos de las benzodiazepinas en el tejido cerebral de pacientes alcohólicos con cirrosis hepática que fallecieron durante episodios de EH⁹⁸ y de ratas con EH secundaria a la anastomosis portal-cava⁹⁹.

Otro elemento que ayudaría explicar el por qué una proporción importante de pacientes con CH presentó niveles plasmáticos significativos de LRBZD sin desarrollar EH, sería la influencia de factores genéticos. Existe evidencia de que la sensibilidad del

complejo receptor GABA-benzodiazepínico se encuentra bajo control genético⁷⁰. Esto sugiere que deben existir diferencias individuales en la sensibilidad cerebral a los LRBZD endógenos y consecuentemente para el desarrollo de la EH, sin embargo esta línea de investigación no ha sido explorada hasta el momento.

Nuestros hallazgos sugieren, al igual que los de Basile⁸⁴ y Olasmaa⁸⁵, que las discrepancias entre los reportes en los que no se detectó niveles cerebrales o plasmáticos de LRBZD durante episodios de EH¹⁰⁰ y los reportes que si los detectaron, muy probablemente se deban a la metodología empleada para la extracción y purificación de estos ligandos. Ya que, como se mencionó previamente, los reportes negativos emplearon extracciones "crudas" sin el empleo de procedimientos de purificación de las muestras y concentración de los LRBZD⁹².

Los resultados del presente estudio deben interpretarse a la luz de varias limitaciones. En primer lugar, aunque los pacientes en nuestra muestra no tuvieron antecedentes documentados de la administración de benzodiazepinas durante las dos semanas previas a su inclusión en el estudio, aun existe la posibilidad de que los pacientes hallan recibido de manera no documentado alguna benzodiazepina. Dicha posibilidad es significativa dado que la mayoría de los pacientes incluidos en el estudio tenían un diagnóstico de alcoholismo como causa primaria del daño hepático y es bien sabido que los pacientes alcohólicos experimentan una prevalencia mayor de el abuso de benzodiazepinas¹⁰¹ o tendrían mayores posibilidades de recibir alguno de estos fármacos para el tratamiento del síndrome de supresión alcohólica.

Una segunda limitación es el hecho de que en este estudio no identificamos completamente estos LRBZD séricos y por esta razón no fué posible el caracterizar a

estos compuestos, ya sea como 1,4-benzodiazepinas halogenadas de origen industrial o como compuestos producidos endógenamente por la flora bacteriana y acumulados durante el transcurso de la insuficiencia hepática.

Otro problema es el relacionado con el de las comparaciones múltiples entre los grupos diagnósticos que se llevaron a cabo al evaluar las diferencias en las concentraciones séricas de LRBZD (cinco comparaciones) y al comparar la proporción de sujetos con concentraciones farmacológicas de LRBZD (tres comparaciones). Estas comparaciones múltiples pudieron condicionar erróneamente la obtención de diferencias estadísticamente significativas entre los grupos. Sin embargo en la gran mayoría de las comparaciones que mostraron diferencias significativas, el nivel de alfa observado fue suficiente ($= .01$) para rechazar confortablemente la hipótesis nula de la falta de diferencias entre los grupos. Solo en el caso de la comparación de los niveles séricos de los LRBZD entre el grupo de la EH y el de la EU se observó una diferencia potencialmente espuria ($p = .04$) que debe de interpretarse con reservas.

Una cuarta limitación es que la gran mayoría de los pacientes en nuestra muestra padecía de falla hepática crónica. Esta situación podría hacer difícil el generalizar estas observaciones a otros grupos de pacientes con falla hepática aguda o subaguda. Sin embargo, hallazgos similares han sido reportados en una muestra de pacientes con falla hepática fulminante secundaria a una sobredosis aguda con acetaminofen⁸⁴.

Finalmente, observaciones basadas en un diseño longitudinal y prospectivo en lugar del diseño transversal empleado en el presente reporte, así como el empleo de marcadores diagnósticos y de severidad de la EH más objetivos que la impresión clínica, tales como los PEV y/o la aplicación de pruebas neuropsicológicas, podría proveer de

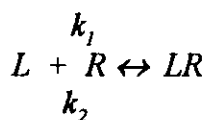
evidencia más sólida para apoyar o refutar una relación etiológica entre la EH y los niveles plasmáticos de los LBZD.

10. ANEXOS

Anexo 1.- El estudio de la Interacción Ligando-receptor y la Técnica de Radiorreceptor

Gracias a la disponibilidad de hormonas y fármacos (ligandos), que pese a estar marcados radioactivamente continúan reteniendo su actividad biológica, ha sido posible la identificación de los sitios de unión (receptores) que median los efectos fisiológicos producidos por dichos compuestos. Así mismo, la disponibilidad de radioligandos ha permitido también el estudio detallado de las interacciones ligando- receptor.

En 1926, A.J Clark (1885 –1941)¹⁰², basándose en el estudio del antagonismo de la acetilcolina y la atropina en diferentes preparaciones de músculo, postuló, que los ligandos se combinan con sus receptores a una tasa directamente proporcional a su concentración, así como a una tasa directamente proporcional a la concentración de su receptor. Así mismo, postuló que los complejos ligando-receptor se disocian a una tasa directamente proporcional al número de complejos formados. De esta manera, Clark propuso que las interacciones ligando-receptor se rigen por los principios de la ley de acción de masas, y que por lo tanto, estas interacciones pueden describirse por los mismos isoterms utilizados por Langmuir para describir la adsorción de los gases a las superficies metálicas. Así, Clark desarrolló la siguiente expresión matemática para describir las interacciones ligando-receptor:



Donde:

L = ligando
 $*L$ = ligando marcado radioactivamente o radioligando
 R = receptor
 LR = complejo ligando-receptor
 k_1 = constante de la tasa de asociación
 k_2 = constante de la tasa de disociación

Utilidad de la Técnica de Radiorreceptor

El ensayo de radiorreceptor permite evaluar, además de la localización del acoplamiento ligando-receptor, a la magnitud de dicho acoplamiento¹⁰². La técnica de radiorreceptor asume que el receptor se encuentra intacto, que éste se encuentra insertado propiamente en la membrana y que el ambiente químico es el adecuado.

La técnica de radiorreceptor puede ser modificada dependiendo de diferentes objetivos técnicos. Esta puede ser empleada para generar autorradiogramas y estudiar la localización anatómica de las diferentes familias de receptores. También se puede emplear para el estudio de la especificidad farmacológica y de la farmacocinética de las interacciones ligando-receptor (determinación de la K_D , la B_{max} , etc.). Por otro lado, esta técnica también permite la evaluación de ligandos de reciente descubrimiento así como el estudio de sus interacciones sobre receptores previamente bien caracterizados. Sin embargo esta técnica es laborioso y para su uso eficiente se deben tomar en cuenta algunas consideraciones.

El Radioligando

Uno de los problemas mas importantes en la aplicación exitosa de la técnica de radiorreceptor es el de disponer de un isótopo apropiado para marcar al ligando bajo consideración¹⁰². Entre los isótopos radiactivos utilizados más frecuentemente para la identificación de receptores se encuentra el ^3H (tritio), el ^{125}I , el ^{32}P , y el ^{14}C . El tritio es

un isótopo de uso muy frecuente debido a su prolongada vida media, lo que le permite el ser frecuentemente resintetizado o reciclado. Sin embargo, los compuestos tritiados son solo útiles cuando existe una disponibilidad amplia y económica de material biológico que contiene al receptor putativo. Cuando esto no es factible, como en el caso de los receptores localizados sobre neuronas de núcleos pequeños y aislados, el ^{125}I es una alternativa mejor.

El Proceso de Incubación

El proceso de incubación requiere de la preparación de una mezcla adecuada del material biológico que contenga a los receptores a estudiar (células intactas, homogenados, fracciones de membranas) y al radioligando¹⁰². La concentración de los reactantes y la duración de la incubación que son necesarias para la obtención de los complejos receptor - radioligando están determinadas por la ley de acción de masas donde:

$$\text{Tasa de asociación inicial} = k_1 [L] [R]$$

$$\text{Tasa de disociación inicial} = k_2 [LR]$$

En equilibrio la tasa de asociación = tasa de disociación o:

$$k_1 [L][R] = k_2 [LR]$$

De esta manera, el ratio entre la cantidad de complejos LR y la concentración de los reactantes se expresa de la siguiente manera:

$$\frac{[LR]}{[L][R]} = \frac{k_1}{k_2} = K_A, \text{ molar}^{-1}$$

Donde:

K_A = constante de asociación en equilibrio

Sin embargo, debido a que la K_A se expresa en unidades recíproco molar, se prefiere el utilizar a la K_D (constante de disociación en equilibrio) para expresar la afinidad de un ligando por su receptor. La K_D se expresa en unidades molares y refleja al 50% de la concentración del ligando que se necesita para ocupar a la totalidad de los receptores en equilibrio, donde:

$$K_{D,molar} = \frac{[L][R]}{[LR]} = \frac{k_2}{k_1}$$

Así, el incremento en la K_D se asocia con el decremento en la afinidad del receptor y viceversa. De esta manera el proceso de incubación debe continuarse hasta que niveles suficientes de complejos $*LR$ se hallan acumulado, de tal forma que la cantidad de radioligando acoplado pueda ser detectado. La tasa de asociación se puede incrementar incrementando las concentraciones de cualquiera de los reactantes.

Separación del radioligando libre ($*L$) de los complejos $*LR$

Para determinar la cantidad del complejo $*LR$ acumulada en la preparación, se debe de disponer de un método para la terminación del proceso de incubación que permita diferenciar al $*L$ de los complejos $*LR$ ¹⁰². Algunos de los métodos empleados son:

Diálisis de equilibrio.- Teóricamente, este método permite la manera más exacta de determinar las concentraciones de $*L$ y de los complejos $*LR$, debido a que con este, el equilibrio no es alterado cuando se toman muestras. Sin embargo esta ventaja es únicamente teórica, es difícil de emplear con un gran número de muestras, además de introducir niveles significantes de "ruido" o cuentas de radioactividad inespecíficas.

Centrifugación.- Con la técnica de centrifugación, la cantidad de complejos $*LR$ formados durante el proceso de incubación se determina por medio de la sedimentación de las membranas que contienen dichos complejos, dejando al $*L$ en el sobrenadante. Una desventaja de este método es la presencia de niveles elevados de radioactividad en el trasfondo debido al atrapamiento de el $*L$ libre en el sedimento.

Filtración al vacío.- Este método es empleado muy frecuentemente debido a que permite manejar un gran número de muestras con relativa facilidad así como la disponibilidad comercial de diversos instrumentos de filtración. Con este método, el proceso de incubación se finaliza por medio del aspirado de los reactantes a través de un filtro. Las membranas con los complejos $*LR$ son retenidas por el filtro dejando pasar al $*L$ libre a través de él.

Características del acoplamiento del $*L$ a su receptor

Una vez que se ha obtenido un ensayo de radiorreceptor que permite la detección de la acumulación de complejos $*LR$, se debe demostrar convincentemente que el sitio de

acoplamiento es realmente el receptor fisiológico para dicho ligando¹⁰². Los criterios mínimos que se deben de satisfacerse son:

a) El acoplamiento del ligando con el receptor debe de ser saturable. Debido a que existe un número finito de receptores en la preparación biológica, el acoplamiento del radioligando con su receptor teóricamente debe saturar a todos los receptores en la preparación.

b) Debe demostrarse que el acoplamiento detectado del radioligando es específico.

c) Los efectos fisiológicos de otros agentes que compiten con el $*L$ por acoplarse con su receptor debe ser similar a los efectos producidos por el acoplamiento de hormonas, neurotransmisores, fármacos u otros ligandos específicos del receptor de interés.

d) La quinética del acoplamiento debe de ser consistente con el curso temporal de los efectos biológicos producidos por el L y debe de existir consistencia entre el valor de la K_D del radioligando determinada por diferentes métodos.

Determinación de la saturabilidad del acoplamiento del radioligando

Para evaluar la saturabilidad del acoplamiento del radioligando con su receptor, se determinan las características del acoplamiento en función de concentraciones de radioligando que se incrementan gradualmente¹⁰². Cuando la radioactividad detectada representa el acoplamiento de un ligando a un receptor saturable con una K_D específica, la representación gráfica de la $[*LR]$ versus $*L$ resulta en una hipérbola rectangular (Figura 6), donde la K_D representa la concentración de ligando que ocupa al 50% de los receptores y la asíntota horizontal representa la concentración total de sitios de acoplamiento o receptores (B_{max}). Bajo circunstancias experimentales la B_{max} puede ser aproximada pero

nunca alcanzada debido a interacciones complejas del ligando con su receptor. En este sentido uno de los problemas mas importantes con la técnica de radiorreceptor es el de el acoplamiento no específico del radioligando a otros sitios de la membrana, filtros o sedimentados que puede interferir con la cuantificación del acoplamiento específico. Este problema se puede resolver por medio de añadir un ligando "frío" competidor en una concentración mayor o en concentraciones que se incrementan gradualmente a la preparación biológica, mientras que el radioligando se añade a la misma preparación con una concentración fija. Una tercera alternativa es a través del uso de modelos matemáticos y el análisis asistido por computadora.

Posteriormente, la transformación linear de los datos y su graficación en curvas de Scatchard (figura 7) permite, conociendo la pendiente y el intercepto en el eje de las x, determinar la afinidad del receptor (K_D) y su densidad (B_{max}). La forma de la curva de Scatchard que más frecuentemente se utiliza en el análisis del acoplamiento de radioligandos es una curva en la que $[*LR]/[*L]$ es representada sobre el eje de las ordenadas versus $[*LR]$ sobre el eje de las abscisas, o A/L versus A , donde:

$A = \text{acoplado} = [*LR] = \text{concentración del ligando en el incubado presente como complejo ligando-receptor.}$

$L = \text{libre} = [*L] = \text{concentración de radioligando libre presente en el incubado en equilibrio.}$

Otra forma de analizar la saturabilidad del acoplamiento del radiorreceptor es por medio de las curvas de Hill (Figura 8). Estas sirven para determinar si la interacción

ligando-receptor ocurre a través de sitios múltiples en la membrana y para evaluar la magnitud y la dirección de la interacción entre sitios múltiples (receptores) de acoplamiento.

Determinación de la Especificidad del Acoplamiento del Radioligando con su Receptor

La especificidad con la que el radioligando interactúa con su receptor se determina por medio de ensayos de acoplamiento competitivo, donde la preparación biológica que contiene a los receptores se mezcla con una concentración constante de radioligando *L y con otro u otros ligandos no marcados radioactivamente¹⁰² (ligandos "frios"), en concentraciones que gradualmente se incrementan. De esta manera el radioligando y el o los ligandos "frios" compiten por el receptor común. Para cuantificar la potencia de los ligandos competidores, se puede calcular de la curva de acoplamiento competitivo, la concentración del ligando competidor que efectivamente compite por 50% del acoplamiento específico del radioligando, el AE₅₀ (Figura 9).

Las curvas de acoplamiento competitivo (desplazamiento) son útiles también para determinar la presencia en una preparación biológica, de ligandos desconocidos que compiten por el sitio de unión de un radioligando previamente bien caracterizado. Estas curvas son también conocidas como curvas de Hill indirectas, donde el \log_{10} de la concentración del ligando competidor se expresa en el eje de las abscisas y el acoplamiento específico del radioligando se expresa en el eje de las ordenadas.

Anexo 2.- Extracción y Purificación de los Ligandos Séricos Benzodiazepínicos

Suero de cada sujeto fué obtenido por medio de centrifugación de las muestras de sangre entera por 15 minutos a 3 000 r.p.m. Las muestras de suero fueron entonces congeladas y almacenadas a -75° C. Posteriormente estas fueron empaquetadas en hielo seco y embarcadas para su análisis.

Con el objetivo de minimizar la interferencia no específica de las proteínas plasmáticas con el ensayo de radioreceptor, alícuotas de un ml de suero fueron acidificadas con un volumen equivalente de ácido perclórico (0.5 N) y posteriormente centrifugadas por 15 minutos a 3000 r.p.m. De esta manera el sobrenadante sérico fue separado del sedimento protéico y subsecuentemente neutralizado con 400 - 500 μ l de NaOH (1N) hasta obtener un pH de 7.3 - 7.4.

Posteriormente, dos series de experimentos fueron conducidos con el objeto de determinar los niveles séricos de los ligandos del receptor benzodiazepínico (LRBZD), empleándose la técnica de radioreceptor. En la primera serie se procedió directamente con la determinación de los LRBZD en el sobrenadante sérico "crudo". En la segunda serie de experimentos, los sobrenadantes séricos se procesaron por medio de un método de extracción de fase sólida (EFS). Para ésto, se emplearon cartuchos Sep-Pack C-18 (Waters, Milford MA, USA) tal y como fué descrito por Olasmaa y cols.⁸⁵. Este método permite la purificación de los LRBZ del suero, ya que los cartuchos funcionan como filtros químicos que retiene a los compuestos de interés para el ensayo de radioreceptor, permitiendo la eliminación de compuestos que potencialmente pueden interferir con el. Por otro lado, este método permite el concentrar los ligandos provenientes de una solución en la que su concentración es baja. Esto es particularmente importante cuando la

concentración de los ligandos se encuentra por debajo del umbral de detección del ensayo de radiorreceptor.

La fase estacionaria de cada cartucho fué inicialmente condicionada o "humedecida" aplicando al cartucho un solvente "fuerte" (acetonitrilo). Posteriormente esta fué estabilizada utilizando un solvente "débil" (ácido tricloroacético 0.1%). Se procedió entonces a cargar el cartucho con 1 ml de sobrenadante sérico en aproximadamente uno a dos minutos con el objetivo de dar tiempo suficiente para la interacción de los componentes del sobrenadante sérico con la fase sólida del cartucho. Posteriormente, con el objeto de eliminar los componentes que pudieran interferir con el ensayo y mantener a los ligandos adheridos a la fase sólida del cartucho, se procedió a lavar éste con ácido tricloroacético. Por último, se recuperó a los LRBZD lavándolos de la fase sólida por medio de la aplicación del acetonitrilo.

El material obtenido fué entonces liofilizado en una centrifuga de vacío a 20 000 r.p.m. por aproximadamente 12 horas. El sedimento obtenido fué reconstituido en 50 µl de solución Tris-buffer para el ensayo de radiorreceptor.

El Ensayo de Radiorreceptor

Inicialmente se obtuvo una preparación de sinaptosomas de acuerdo al siguiente procedimiento: Cortezas cerebrales disecadas de cerebros de ratas albinas fueron homogeneizadas en 30 volúmenes de Tris-HCl buffer a una concentración de 50mM (pH 7.4) empleando un homogeneizador Tecmark durante 45 segundos a 6.5 r.p.m.. El homogenado fué posteriormente centrifugado por 20 minutos a 20 000 r.p.m. y a una temperatura de 4° C. Subsecuentemente el sedimento fué resuspendido en 30 volúmenes del mismo buffer y el procedimiento mencionado previamente fué repetido dos veces más.

Los sinaptosomas aglutinados en el sedimento final fueron resuspendidos nuevamente con buffer helado hasta obtener una concentración final de proteínas de 0.5 a 0.8 mg/ml.

Con el propósito de obtener una curva de desplazamiento estándar, se llevó a cabo un experimento preliminar empleando la técnica de radiorreceptor de acuerdo con el procedimiento descrito por Faull y Villiger¹⁰³. En éste se empleó ³H-flunitrazepam (actividad específica 84.5 Ci/mmol; Dupont-NEN, Boston, MA, USA). Este experimento consistió de un ensayo de 12 puntos o concentraciones de flunitrazepam "frío" realizado por triplicado. Inicialmente se añadió a cada tubo 100 µl de homogeneizado de corteza cerebral. Posteriormente se añadieron concentraciones de flunitrazepam "frío" que se incrementaron gradualmente ($2.2E^{-10}M$ - $4.7E^{-10}M$), seguidas de la adición de un nM de ³H-flunitrazepam. La incubación se llevó a cabo en microtubos con un volumen de 1.0 ml (Skatron Inc., Sterling, VA, U.S.A.). Todos los ligandos fueron añadidos en alícuotas de 50 µl. El volumen final de la mezcla fue de 250 µl en cada tubo. Las tres series de 12 tubos fueron cubiertas y agitadas rápidamente por 60 segundos. La incubación se efectuó a una temperatura de 0°C - 4°C durante una hora. Al final de este período se efectuó la filtración rápida, lavado y colección por aspiración de los sinaptosomas y sus respectivos complejos receptor-ligando. Para esto se utilizó un cultivador de células Skatron tal y como fue descrito por Devlin y Shoemaker¹⁰⁴. La radioactividad fue medida utilizando un contador de líquido de cintilleo Beckman LS 3801 con una eficiencia de conteo del 45 %. Las cuentas por minuto (c.p.m.) fueron entonces expresadas gráficamente contra el \log_{10} de la concentración de flunitrazepam "frío" en una curva de desplazamiento estándar (Figura 4).

Posteriormente un segundo ensayo de radiorreceptor fué conducido siguiendo el procedimiento arriba mencionado. Sin embargo en esta ocasión alícuotas de 50 μ l del suero reconstituido de cada sujeto fueron empleadas en lugar del flunitrazepam "frío". Lo anterior con el objeto de determinar la habilidad del suero de los pacientes para inhibir el acoplamiento de un nM de 3 H-flunitrazepam a las membranas de la corteza cerebral.

El grado de inhibición del acoplamiento de 3 H-flunitrazepam a su receptor (expresada en c.p.m) que fué observado en la preparación de sinaptosomas, y que fué condicionado por la adición de los extractos séricos, se convirtió a una concentración equivalente de flunitrazepam utilizando el \log_{10} de la concentración de flunitrazepam "frío" en la curva de desplazamiento estándar obtenida preliminarmente (Figura 4). Los resultados expresados en equivalentes de flunitrazepam reflejan la concentración sérica de los LRBZD.

11. AGRADECIMIENTOS

Los autores desean agradecer al Dr. David Kershenobich del Instituto Nacional de la Nutrición "Salvador Zubiran" por su colaboración para el reclutamiento de los pacientes. Al Dr. William Shoemaker del Laboratorio de Neurobiología del Departamento de Psiquiatría del Centro Medico de la Universidad de Connecticut por sus enseñanzas y supervisión en la realización del ensayo de radiorreceptor y al Dr. Allesandro Guidotti de el Instituto de Psiquiatría de la Universidad de Illinois en Chicago por sus valiosos consejos para la conclusión exitosa de los experimentos reportados en este trabajo.

12. REFERENCIAS

1. Zieve L. Hepatic Encephalopathy. Schiff L. Schiff ER (eds). Diseases of the Liver. Philadelphia, J.B. Lippincott, 1987, pp 925-948
2. Gregorios JB. Mozes LW. Norenberg MD. Morphologic effects of ammonia on primary astrocyte cultures. II. Electron microscopic studies. Journal of Neuropathology & Experimental Neurology. 44: 404-414, 1985
3. Conn HO. Leevy CM. Vlahcevic ZR. Rodgers JB. Maddrey WC. Seeff L. Levy LL. Comparison of lactulose and neomycin in the treatment of chronic portal-systemic encephalopathy. A double blind controlled trial. Gastroenterology. 72: 573-83, 1977
4. Pomier-Layragues G., Nguyen N.H., Faucher C., Giguere J.F., Butterworth R.F. Subclinical hepatic encephalopathy in cirrhotic patients: Prevalence and relationship to liver function. Canadian Journal of Gastroenterology 5: 121-125, 1991
5. Zeneroli ML. Pinelli G. Gollini G. Penne A. Messori E. Zani G. Ventura E. Visual evoked potential: a diagnostic tool for the assessment of hepatic encephalopathy. Gut. 25: 291-299, 1984
6. Vergara F. Plum F. Duffy TE. Alpha-ketoglutarate: increased concentrations in the cerebrospinal fluid of patients in hepatic coma. Science. 183: 81-83, 1974
7. Trewby PN. Casemore C. Williams R. Continuous bipolar recording of the EEG in patients with fulminant hepatic failure. Electroencephalography & Clinical Neurophysiology. 45: 107-110, 1978
8. Woodgate C., Scott D.F. Triphasic waves with particular emphasis on phase shift. Electroencephalogr Clin Neurophysiol 55: 39 P, 1983
9. Schafer DF. Pappas SC. Brody LE. Jacobs R. Jones EA. Visual evoked potentials in a rabbit model of hepatic encephalopathy. I. Sequential changes and comparisons with drug-induced comas. Gastroenterology. 86: 540-545, 1984
10. Bassett ML. Mullen KD. Skolnick P. Jones EA. Amelioration of hepatic encephalopathy by pharmacologic antagonism of the GABAA-benzodiazepine receptor complex in a rabbit model of fulminant hepatic failure. Gastroenterology. 93: 1069-1077, 1987
11. Yang SS. Chu NS. Liaw YF. Somatosensory evoked potentials in hepatic encephalopathy.

- Gastroenterology. 89: 625-630, 1985
12. Levy LJ. Bolton RP. Losowsky MS. The use of the visual evoked potential (VEP) in delineating a state of subclinical encephalopathy. A comparison with the number connection test (NCT). *Journal of Hepatology*. 5: 211-217, 1987
 13. Sandford NL, Saul RE. Assessment of hepatic encephalopathy with visual evoked potentials compared with conventional methods. *Hepatology* 8: 1094-1098, 1988
 14. Gelger A, Magnes J, Taylor RM. Effect of blood constituents on uptake of glucose and on metabolic rate of the brain in perfusion experiments. *American Journal of Physiology* 177: 138-149, 1954
 15. Roche-Sicot J. Sicot C. Peignoux M. Bourdieu D. Degos F. Degos JD. Prandi D. Rueff B. Benhamou JP. Acute hepatic encephalopathy in the rat: the effect of cross-circulation. *Clinical Science & Molecular Medicine*. 47: 609-615, 1974
 16. Conn HO. Lieberthal MM. *The Hepatic Coma Syndromes and Lactulosa*. Baltimore, Williams & Wilkins, 1978
 17. Hindfelt B. Plum F. Duffy TE. Effect of acute ammonia intoxication on cerebral metabolism in rats with portacaval shunts. *Journal of Clinical Investigation*. 59: 386-396, 1977
 18. Deutz NE. Chamuleau RA. de Graaf AA. Bovee WM. de Beer R. In vivo ³¹P NMR spectroscopy of the rat cerebral cortex during acute hepatic encephalopathy. *NMR in Biomedicine*. 1: 101-106, 1988
 19. Bates TE. Williams SR. Kauppinen RA. Gadian DG. Observation of cerebral metabolites in an animal model of acute liver failure in vivo: a ¹H and ³¹P nuclear magnetic resonance study. *Journal of Neurochemistry*. 53: 102-110, 1989
 20. Hahn M. Massen O. Nencki M. Pavlov J. Die Ecksche Fistel zwischen der unteren Hohlvene und der Pfortader und ihre Folgen für den Organismus. *Arch Exp Path Pharmacol* 32: 161-170, 1893
 21. Gabuzda D. Philips GB. Davidson CS. Reversible toxic manifestations in patients with cirrhosis of the liver given cationic-exchange resins. *New England Journal of Medicine* 246: 124-130, 1952
 22. Lockwood AH. McDonald JM. Reiman RE. Gelbard AS. Laughlin JS. Duffy TE. Plum F.

- The dynamics of ammonia metabolism in man. Effects of liver disease and hyperammonemia. *Journal of Clinical Investigation*. 63: 449-460, 1979
23. Flannery DB. Hsia YE. Wolf B. Current status of hyperammonemic syndromes. *Hepatology*. 2: 495-506, 1982
 24. Pappas SC. Ferenci P. Schafer DF. Jones EA. Visual evoked potentials in a rabbit model of hepatic encephalopathy. II. Comparison of hyperammonemic encephalopathy, postictal coma, and coma induced by synergistic neurotoxins. *Gastroenterology*. 86: 546-851, 1984
 25. Bessman SP. Bessman AN. The cerebral and peripheral uptake of ammonia in liver disease with a hypothesis for the mechanism of hepatic coma. *Journal of Clinical Investigation* 34: 622-628, 1975
 26. Duffy TE. Vergara F. Plum F. Alpha-ketoglutaramate in hepatic encephalopathy. *Research Publications - Association for Research in Nervous & Mental Disease*. 53: 39-52, 1974
 27. Crossley IR. Wardle EN. Williams R. Biochemical mechanisms of hepatic encephalopathy. *Clinical Science*. 64: 247-252, 1983
 28. Iles JF. Jack JJ. Ammonia: assessment of its action on postsynaptic inhibition as a cause of convulsions. *Brain*. 103: 555-578, 1980
 29. Raabe W. The H-reflex in the encephalopathy due to ammonia intoxication. *Experimental Neurology*. 96: 601-611, 1987
 30. Fischer JE. Baldessarini RJ. False neurotransmitters and hepatic failure. *Lancet*. 2: 75-80, 1971
 31. Sourkes TL. Tryptophan in hepatic coma. *Journal of Neural Transmission. Supplementum*. 14: 79-86, 1978.
 32. Baraldi M. Zeneroli ML. Ricci P. Caselgrandi E. Ventura E. Down regulation of striatal dopamine receptors in experimental hepatic encephalopathy. *Life Sciences*. 32(13): 1417-25, 1983
 33. Zieve L. Olsen RL. Can hepatic coma be caused by a reduction of brain noradrenaline or dopamine?. *Gut*. 18: 688-691, 1977
 34. Ferenci P. Jones EA. Hanbauer I. Lack of evidence for impaired dopamine receptor function in experimental hepatic coma in the rabbit. *Neuroscience Letters*. 65: 60-64, 1986

35. Michel H. Solere M. Granier P. Cauvet G. Bali JP. Pons F. Bellet-Hermann H. Treatment of cirrhotic hepatic encephalopathy with L-dopa. A controlled trial. *Gastroenterology*. 79: 207-211, 1980
36. Uribe M. Farca A. Marquez MA. Garcia-Ramos G. Guevara L. Treatment of chronic portal systemic encephalopathy with bromocriptine: a double-blind controlled trial. *Gastroenterology*. 76: 1347-1351, 1979
37. Uribe M. Garcia-Ramos G. Ramos M. Valverde C. Marquez MA. Farca A. Guevara L. Standard and higher doses of bromocriptine for severe chronic portal-systemic encephalopathy. *American Journal of Gastroenterology*. 78: 517-22, 1983
38. Zieve L. The mechanism of hepatic coma. *Hepatology*. 1: 360-365, 1981
39. Zieve L. Doizaki WM. Lyftogt C. Brain methanethiol and ammonia concentrations in experimental hepatic coma and coma induced by injections of various combinations of these substances. *Journal of Laboratory & Clinical Medicine*. 104: 655-664, 1984
40. Windus-Podehl G. Lyftogt C. Zieve L. Brunner G. Encephalopathic effect of phenol in rats. *Journal of Laboratory & Clinical Medicine*. 101: 586-592, 1983
41. Zeneroli ML. Ventura E. Baraldi M. Penne A. Messori E. Zieve L. Visual evoked potentials in encephalopathy induced by galactosamine, ammonia, dimethyldisulfide, and octanoic acid. *Hepatology*. 2: 532-538, 1982
42. Seda HW. Hughes RD. Gove CD. Williams R. Inhibition of rat brain Na⁺,K⁺-ATPase activity by serum from patients with fulminant hepatic failure. *Hepatology*. 4: 74-79, 1984
43. Jones DB. Mullen KD. Roessle M. Maynard T. Jones EA. Hepatic encephalopathy. Application of visual evoked responses to test hypotheses of its pathogenesis in rats. *Journal of Hepatology*. 4: 118-126, 1987
44. Al Mardini H. Bartlett K. Record CO. Blood and brain concentrations of mercaptans in hepatic and methanethiol induced coma. *Gut*. 25: 284-290, 1984
45. Zorumsky FC. Isenberg EK. Insights into the structure and function of GABA-Benzodiazepine receptors: Ion channels and psychiatry. *American Journal of Psychiatry*. 148: 162-173, 1991
46. Barnard EA. Darlison MG. Seeburg P. Molecular biology of the GABA_A receptor: the receptor channel superfamily. *Trends in Neuroscience*. 10: 502-509, 1987

47. Burt DR. Kamatchi GL. GABA_A receptor subtypes: from pharmacology to molecular biology. *FASEB Journal*. 5: 2916–2923, 1991
48. Olsen RW. Tobin AJ. Molecular biology of GABA_A receptors. *FASEB Journal*. 4: 1469–1480, 1990
49. Smialowski A. The effect of intrahippocampal administration of gamma-amino-butiric acid (GABA) In: Fonum F. ed. *Amino acid as chemical trasmitters*. New York: Plenum Press: 1977-80, 1978
50. Schafer DF. Waggoner JG. Jones EA. Sera from rabbits in acute hepatic coma inhibit the binding of gama-amino-butiric acid. *Gastroenterology*. 78: 1320, 1980
51. Schafer D.F., Thakur A.K., Jones E.A. Acute hepatic coma and inhibitory neurotransmission: increse in gama-amino-butyric acid levels in plasma and receptors in brain. *Gastroenterology* 79: 1123, 1980
52. Ferenci P. Schafer DF. Kleinberger G. Hoofnagle JH. Jones EA. Serum levels of gamma-aminobutyric-acid-like activity in acute and chronic hepatocellular disease. *Lancet*. 2: 811-814, 1983
53. Hammond EJ. Wilder BJ. Gamma-vinyl GABA: a new antiepileptic drug. *Clinical Neuropharmacology*. 8: 1-12, 1985
54. Schafer DF. Fowler JM. Jones EA. Colonic bacteria: a source of gamma-aminobutyric acid in blood. *Proceedings of the Society for Experimental Biology & Medicine*. 167: 301-303, 1981
55. Horowitz ME. Schafer DF. Molnar P. Jones EA. Blasberg RG. Patlak CS. Waggoner J. Fenstermacher JD. Increased blood-brain transfer in a rabbit model of acute liver failure. *Gastroenterology*. 84: 1003-1011, 1983
56. Schafer DF. Fowler JM. Munson PJ. Thakur AK. Waggoner JG. Jones EA. Gamma-aminobutyric acid and benzodiazepine receptors in an animal model of fulminant hepatic failure. *Journal of Laboratory & Clinical Medicine*. 102: 870-880, 1983
57. Jones EA. Skolnick P. Gammal SH. Basile AS. Mullen KD. NIH conference. The gamma-aminobutyric acid A (GABAA) receptor complex and hepatic encephalopathy. Some recent advances. *Annals of Internal Medicine*. 110: 532-46, 1989
58. Ferreira MR. Gammal SH. Jones EA. Resistance to 3-mercaptopropionic acid-induced

- seizures in hepatic encephalopathy. *Hepato-Gastroenterology*. 44: 766-769, 1997
59. Levy LJ. Losowsky MS. Plasma gamma aminobutyric acid concentrations provide evidence of different mechanisms in the pathogenesis of hepatic encephalopathy in acute and chronic liver disease. *Hepato-Gastroenterology*. 36: 494-498, 1989
 60. Moroni F. Lombardi G. Carla V. Lal S. Etienne P. Nair NP. Increase in the content of quinolinic acid in cerebrospinal fluid and frontal cortex of patients with hepatic failure. *Journal of Neurochemistry*. 47: 1667-1671, 1986
 61. Butterworth RF. Giguere JF. Cerebral aminoacids in portal-systemic encephalopathy: lack of evidence for altered gamma-aminobutyric acid (GABA) function. *Metabolic Brain Disease*. 1: 221-228, 1986
 62. Roy S. Pomie- Layargues G. Butterworth RF. Huet PM. Hepatic encephalopathy in cirrhotic and portocaval shunted dogs: Lack of changes in brain GABA uptake, brain GABA levels and brain glutamic acid decarboxylase activity and brain postsynaptic GABA receptors. *Hepatology*. 8: 845-849, 1988
 63. Michalak A. Butterworth J. Butterworth RF. Neuroactive amino acids and glutamate (NMDA) receptors in frontal cortex of rats with experimental acute liver failure. *Hepatology*. 24: 908-913, 1996
 64. Maddison JE. Watson WE. Johnston GA. L-glutamate and gamma-aminobutyric acid uptake in synaptosomes from the cerebral cortex of dogs with congenital chronic hepatic encephalopathy. *Metabolic Brain Disease*. 10: 135-141, 1995
 65. Rossle M. Deckert J. Jones EA. Autoradiographic analysis of GABA- benzodiazepine receptors in an animal model of acute hepatic encephalopathy. *Hepatology*. 10: 143-47, 1989
 66. Butterworth RF. Lavoie J. Giguere JF. Pomier-Layrargues G. Affinities and densities of GABA-A receptors and of central benzodiazepine receptors are unchanged in autopsied brains tissue from cirrhotic patients with hepatic encephalopathy. *Hepatology*. 8: 1084-1088, 1988
 67. Tran VT. Snyder SH. Major LF. Hawley RJ. GABA receptors are increased in brains of alcoholics. *Annals of Neurology*. 9: 289-292, 1981
 68. Tallman J. Thomas J. Gallager D. GABAergic modulation of benzodiazepine binding

- site sensitivity. *Nature*. 274: 384-385, 1978
69. Luddens H. Wisden W. Function and pharmacology of multiple GABAA receptor subunits. *Trends in Pharmacological Sciences*. 12: 49-51, 1991
 70. Pritchett DB. Sontheimer H. Shivers BD. Ymer S. Kettenmann H. Schofield PR. Seeburg PH. Importance of a novel GABAA receptor subunit for benzodiazepine pharmacology. *Nature*. 338: 582-585, 1989
 71. Fowler JM. Schafer DF. A mechanism for the increased sensitivity to benzodiazepines in hepatocellular failure: evidence from an animal model. *Gastroenterology*. 80: 1359, 1981
 72. Basile AS. Pannell L. Jaouni T. Gammal SH. Fales HM. Jones EA. Skolnick P. Brain concentrations of benzodiazepines are elevated in an animal model of hepatic encephalopathy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 87: 5263-5267, 1990
 73. Olasmaa M. Rothstein JD. Goldman M. Endogenous benzodiazepines in hepatic encephalopathy. *Lancet* 1: 491-492, 1989
 74. Basile AS. Harrison PM. Hughes RD. Gu ZQ. Pannell L. McKinney A. Jones EA. Williams R. Relationship between plasma benzodiazepine receptor ligand concentrations and severity of hepatic encephalopathy. *Hepatology*. 19: 112-121, 1994
 75. Yurdaydin C. Walsh TJ. Engler HD. Ha JH. Li Y. Jones EA. Basile AS. Gut bacteria provide precursors of benzodiazepine receptor ligands in a rat model of hepatic encephalopathy. *Brain Research*. 679: 42-8, 1995
 76. Zeneroli ML. Venturini I. Stefanelli S. Farina F. Miglioli RC. Minelli E. Amedei ER. Ferrieri A. Avallone R. Baraldi M. Antibacterial activity of rifaximin reduces the levels of benzodiazepine-like compounds in patients with liver cirrhosis. *Pharmacological Research*. 35: 557-560, 1997
 77. Samson Y. Bernuau J. Pappata S. Chavoix C. Baron JC. Maziere MA. Cerebral uptake of benzodiazepine measured by positron emission tomography in hepatic encephalopathy. *New England Journal of Medicine*. 316: 414-415, 1987
 78. Basile AS. Gammal SH. Mullen KD. Jones EA. Skolnick P. Differential responsiveness of cerebellar Purkinje neurons to GABA and benzodiazepine receptor ligands in an animal model of hepatic encephalopathy. *Journal of Neuroscience*. 8: 2414-2421, 1988

79. Lavizzari GS. Steinman E. Reversal of hepatic coma by benzodiazepine antagonist (Ro 15-1788). *Lancet*. 1: 1324-1325, 1985
80. Grimm G. Lenz K. Kleinberger G. Ro 15-1788 improves coma in 4 out of 5 patients with fulminant hepatic failure: verification by long latency auditory and somatosensory evoked potentials. *Journal of Hepatology*. 4: S21, 1987
81. Bansky G. Meier PJ. Ziegler WH. Reversal of hepatic coma by benzodiazepine antagonist (Ro 15-7788). *Lancet*. 1: 1324, 1985
82. Ferenci P., Grimm G., Gangl A. Successful longtime treatment of chronic hepatic encephalopathy with a benzodiazepine antagonist. *Hepatology* 7: 1064, 1987
83. Gooday, R; Hayes, P. C; Bzeizi, K; O'Carroll, R. E. Benzodiazepine receptor antagonism improves reaction time in latent hepatic encephalopathy. *Psychopharmacology*. 119: 295-298, 1995
84. Basile AS. Hughes RD. Harrison PM. Murata Y. Pannell L. Jones EA. Williams R. Skolnick P. Elevated brain concentrations of 1,4-benzodiazepines in fulminant hepatic failure. *New England Journal of Medicine*. 325: 473-478, 1991
85. Olasmaa M. Rothstein JD. Guidotti A. Weber RJ. Paul SM. Spector S. Zeneroli ML. Baraldi M. Costa E. Endogenous benzodiazepine receptor ligands in human and animal hepatic encephalopathy. *Journal of Neurochemistry*. 55: 2015-2023, 1990
86. Zieve L. Ferenci P. Rzepczynski D. Ebner J. Zimmermann C. A benzodiazepine antagonist does not alter the course of hepatic encephalopathy or neural gamma-aminobutyric acid (GABA) binding. *Metabolic Brain Disease*. 2: 201-205, 1987
87. Van der Rijt CC. Schalm SW. Meulstee J. Stijnen T. Flumazenil therapy for hepatic encephalopathy: A double-blind cross-over study. (abstract) *Hepatology*. 10: 590, 1989
88. Gammal SH. Basile AS. Geller D. Skolnik P. Jones EA. Reversal of the behavioural and electrophysiological abnormalities of an animal model of hepatic encephalopathy by benzodiazepine receptor ligands. *Hepatology*. 11: 371-378. 1990
89. Steindl P. Puspok A. Druml W. Ferenci P. Beneficial effects of pharmacological modulation of the GABA_A - benzodiazepine receptor on hepatic encephalopathy in the rat: Comparison with uremic encephalopathy. *Hepatology*. 14: 963-968, 1991
90. Pomier-Layrargues G. Giguere JF. Lavoie J. Perney P. Gagnon S. D'Amour M. Wells J.

- Butterworth RF. Flumazenil in cirrhotic patients in hepatic coma: a randomized double-blind placebo-controlled crossover trial. *Hepatology*. 19: 32-37, 1994
91. Pomier Layrargues G. Giguere JF. Lavoie J. Williams B. Butterworth RF. Pharmacokinetics of benzodiazepine antagonist Ro15-1788 in cirrhotic patients with moderate or severe liver dysfunction. *Hepatology*. 10: 969-972, 1989
 92. Rothstein JD. Benzodiazepine-receptor ligands and hepatic encephalopathy: a causal relationship?. *Hepatology*. 19: 248-250, 1994
 93. Folstein MF. Folstein SE. McHugh PR. "Mini-Mental State" a practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *Journal of Psychiatric Research*. 12: 189-198, 1975
 94. Mullen KD. Basile AS. Benzodiazepine-receptor antagonists and hepatic encephalopathy: Where do we stand?. *Gastroenterology*. 105: 937-940, 1993
 95. Rao VL. Murthy CR. Butterworth RF. Glutamatergic synaptic dysfunction in hyperammonemic syndromes. *Metabolic Brain Disease*. 7:1-20, 1992
 96. Butterworth RF. Neuroactive amino acids in hepatic encephalopathy. *Metabolic Brain Disease* 11: 165-173, 1996
 97. Rothstein JD. McKhann G. Guarneri P. Barbaccia ML. Guidotti A. Costa E. Cerebrospinal fluid content of diazepam binding inhibitor in chronic hepatic encephalopathy. *Annals of Neurology*. 26: 57-62, 1989
 98. Lavoie J. Butterworth RF. Peripheral-type (mitochondrial) benzodiazepine receptors in hepatic encephalopathy. *Alcohol & Alcoholism*. Suppl. 2: 181-185, 1993
 99. Leong DK. Therrien G. Swain MS. Butterworth RF. Densities of binding sites for the "peripheral-type" benzodiazepine receptor ligand 3H-PK11195 are increased in brain 24-hours following portacaval anastomosis. *Metabolic Brain Disease* 9: 267-273, 1994
 100. Widler P. Fisch HU. Schoch P. Zimmermann A. Schlapfer TE. Reichen J. Increased benzodiazepine-like activity is neither necessary nor sufficient to explain acute hepatic encephalopathy in the thioacetamide-treated rat. *Hepatology*. 18: 1459-1464, 1993
 101. American Psychiatric Association. (1990) Benzodiazepine Dependence, Toxicity, and Abuse. In A Task Force Report of the American Psychiatric Association. American Psychiatric Press, Washington D.C. pp 49-60

102. Limbird LE. Cell surface receptors: A short course on theory and methods. Boston, Martinus Nijhoff Publishing, 1988
103. Faul RL and Villiger JW. Multiple benzodiazepine receptors in the human basal ganglia: a detailed pharmacological and anatomical study. *Neuroscience*. 24: 433-451, 1988
104. Devlin T. and Shoemaker WJ. Characterization of κ -opioid binding using dynorphin_{A1-13} and U69,593 in the rat brain. *J Pharm Exp Therap* 253: 749-769, 1990

Tabla 1. Clasificación de la Severidad de la Encefalopatía Hepática

<u>Etapa de la EH</u>	<u>Síntomas Neurpsiquiátricos</u>	<u>Signos Neuromusculares</u>
1	Trastornos del sueño Disminución de la atención Inquietud psicomotriz Ansiedad Agitación e irritabilidad Apatia	Temblor Incoordinación
2	Cambios en la personalidad Afecto inapropiado Desorientación en tiempo Respuestas lentas Memoria disminuida	Asterixis Ataxia Dysartria Anormalidades en el tono muscular
3	Conducta extraña Ideas paranoides Confusión Somnolencia Stupor	Reflejos hiperactivos Rigidez muscular Babinski positivo
4	Coma: a) Con reacción positiva a estímulos dolorosos b) Con reacción negativa a estímulos dolorosos	

Tabla 2. Características Demográficas y Clínicas de la Muestra

<u>Variables</u>	<u>Cirrosis Hepática</u> (CH; n = 10)	<u>Encefalopatía Hepática</u> (EH; n = 24)	<u>Encefalopatía Urémica¹</u> (EU; n = 4)	<u>Controles Sanos</u> (CS; n = 9)
<u>Demográficas:</u>				
Edad (años) ²	56.7 ± 7.7	46.1 ± 12.3	46.0 ± 19.8	42.8 ± 11.4
Hombres (%) ³	5 (50%)	13 (54%)	3 (75%)	4 (44.4%)
<u>Clínicas:</u>				
Etiología de la CH⁴				
Alcoholismo	7 (70%)	13 (54%)	-	-
Hepatitis Viral	2 (20%)	7 (29%)	-	-
Biliar	1 (10%)	3 (13%)	-	-
Otras	-	1 (4%)	-	-
Hipertensión Portal⁴				
Grado 1	2 (20%)	2 (8%)	-	-
Grado 2	5 (50%)	9 (38%)	-	-
Grado 3	3 (30%)	13 (54%)	-	-
Episodios Previos de EH⁵	3 (30%)	16 (67%)	-	-

¹Nefropatía diabética (n = 2), nefropatía hipertensiva (n = 1), y glomerulonefritis (n = 1)

²ANOVA de una vía: F = 2.74, df = 3,43; p = .05; Comparación *post hoc* con prueba LSD: CH > EH, CH > CS

³Comparación de EU vs. CS, EU vs. CH, EU vs. EH (Prueba Exacta de Fisher): Todos los valores de p > .05

⁴Comparación de CH vs. EH (Prueba Exacta de Fisher): Todos los valores de p > .05

⁵Comparación de CH vs. EH: Pearson $\chi^2 = 3.85$, df = 1; p = .05

Tabla 3. Concentración Sérica (nMol) de Ligandos del Receptor de las Benzodiazepinas (LRBZD) por Grupo Diagnóstico y Puntaje en el Exámen Cognoscitivo Breve de Folstein

<u>Grupo</u>	<u>[LRBZD]</u> <u>Mediana (Intervalo)</u> ^{1,2}	<u>Pacientes con Niveles</u> <u>Farmacológicamente Activos (>2 nMol)</u> <u>de LRBZD</u> <u>Número (%)</u> ³	<u>Escala de Folstein</u> <u>Media (DE)</u> ⁴
Controles Sanos (CS; n=9)	.00 (.00 - .63)	0 (0%)	-
Cirrosis Hepática (CH; n=10)	.35 (.00 - 200.00)	2 (20%)	25.3 (2.0)
Encefalopatía Hepática (EH; n=24)	3.00 (.00 - 1000.00)	17 (71%)	12.9 (7.7)
Encefalopatía Urémica (EU; n=4)	.00 (.00 - .00)	0 (0%)	7.3 (6.7)

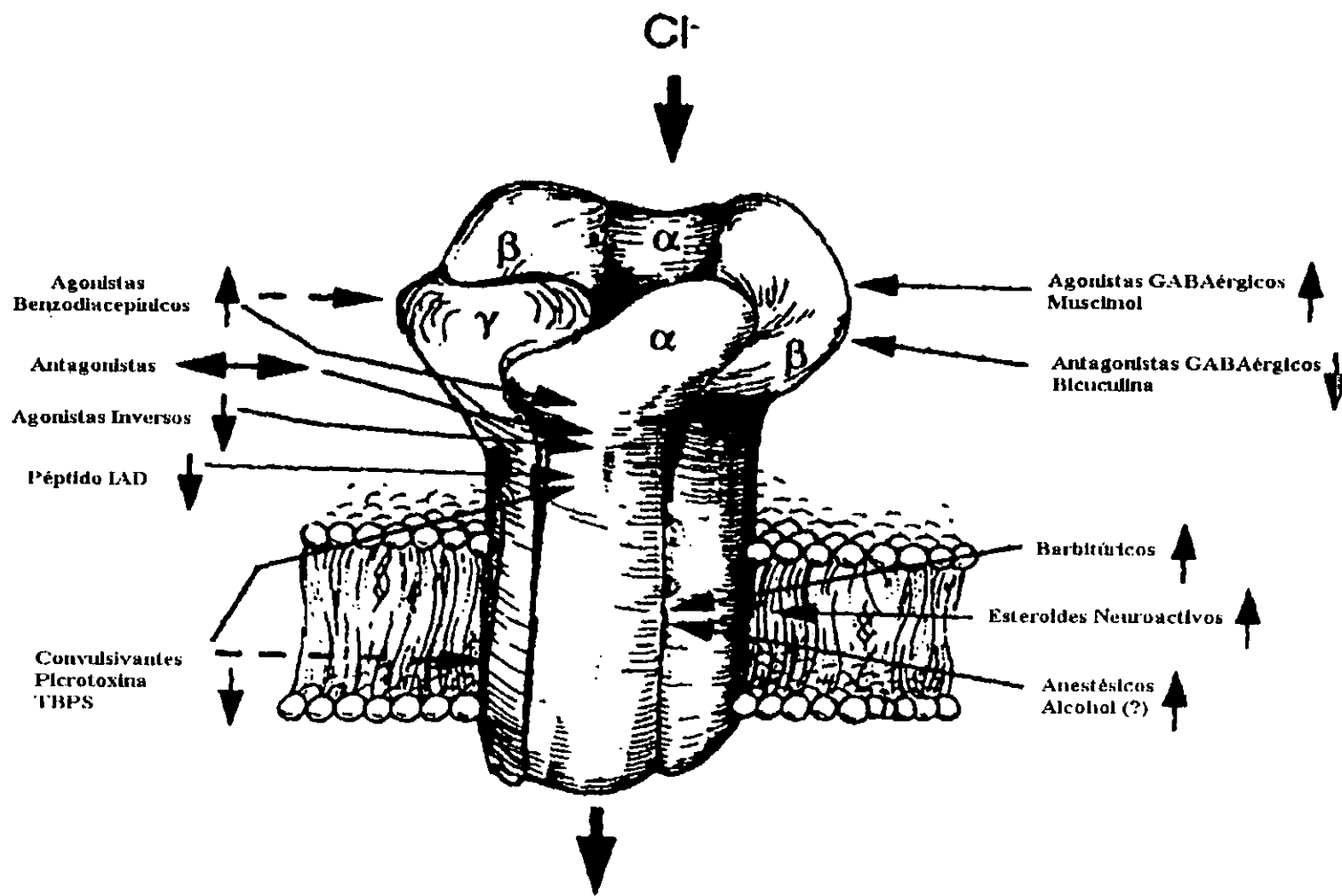
¹ ANOVA de una vía para rangos de Kruskal-Wallis: $\chi = 13.12$, $df = 3$; $p = 0.004$

² Comparación de EH vs. CS y EH vs. EU (U de Mann-Whitney): valores de $p = .01$ y $.04$; Comparación de EH vs. CH: $p = .20$

³ Comparación de EH vs. CS, EH vs. CH y EH vs. EU (Prueba Exacta de Fisher): Todos los valores de $p \leq .01$

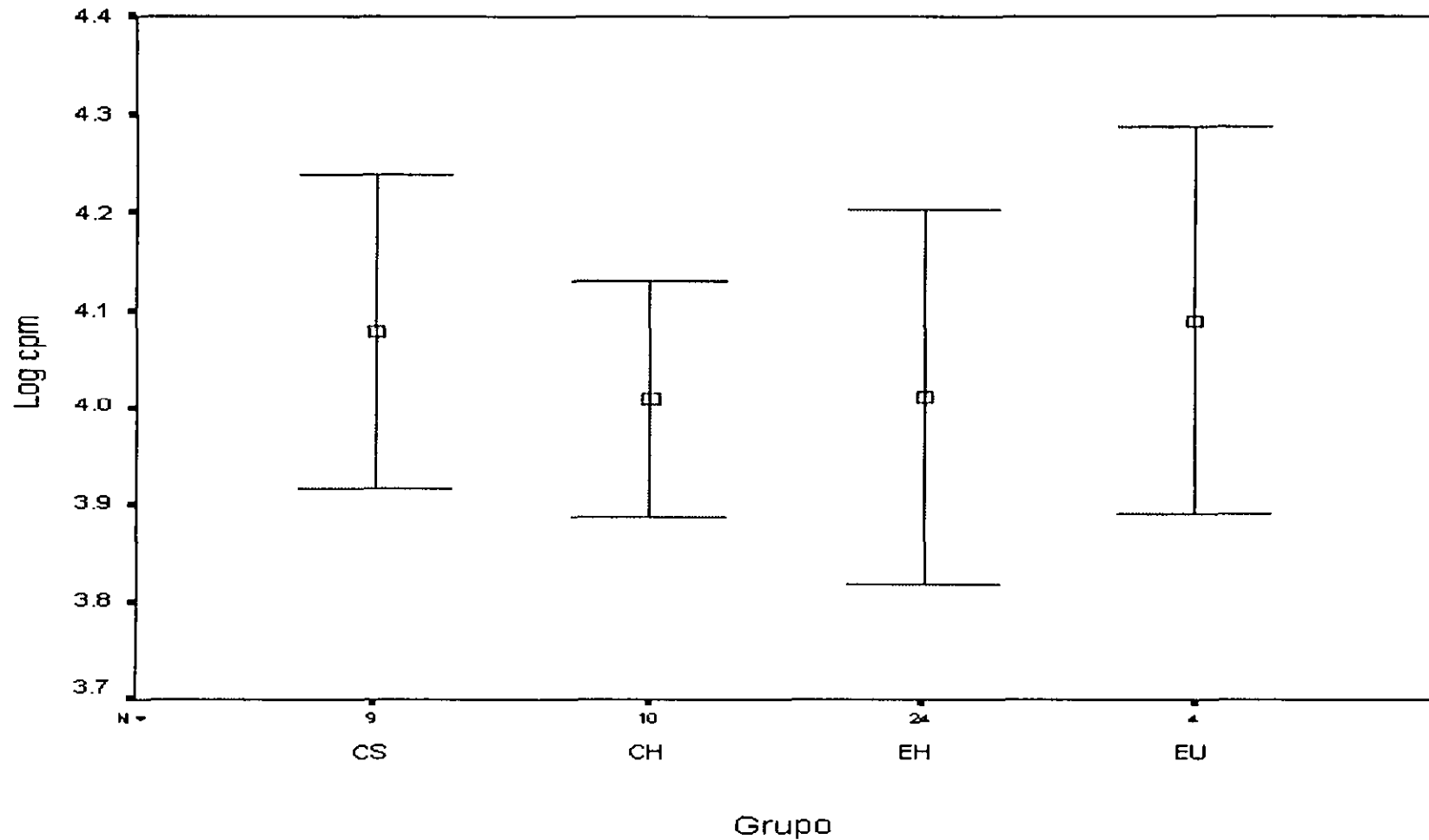
⁴ Correlación de Spearman de los puntajes de la Escala de Folstein y las concentraciones de los LRBZD: $r = -.53$, $p = 0.001$

Figura 1. Complejo Receptor GABA-Ionoforo de Cloro



ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA
BIBLIOTECA

Figura 3. Ensayo de Radiorreceptor con Sobrenadantes Séricos "Crudos"
(Media \pm DE)



CS=controles sanos, CH=cirrosis hepática, EH=encefalopatía hepática, EU= encefalopatía urémica

ANOVA de una vía: p=.11

Figura 4. Curva Estandar de Desplazamiento de ³H-flunitrazepam

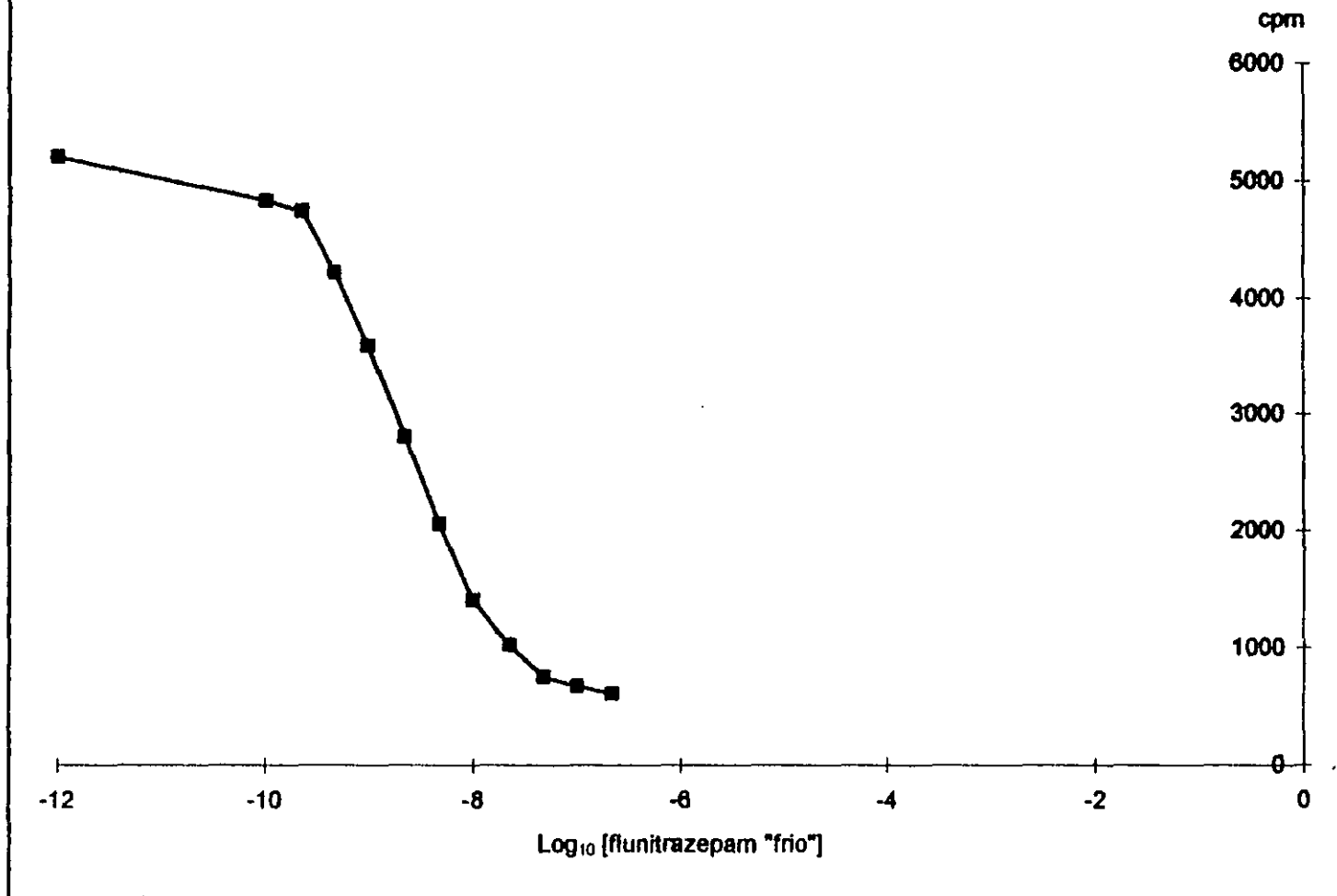
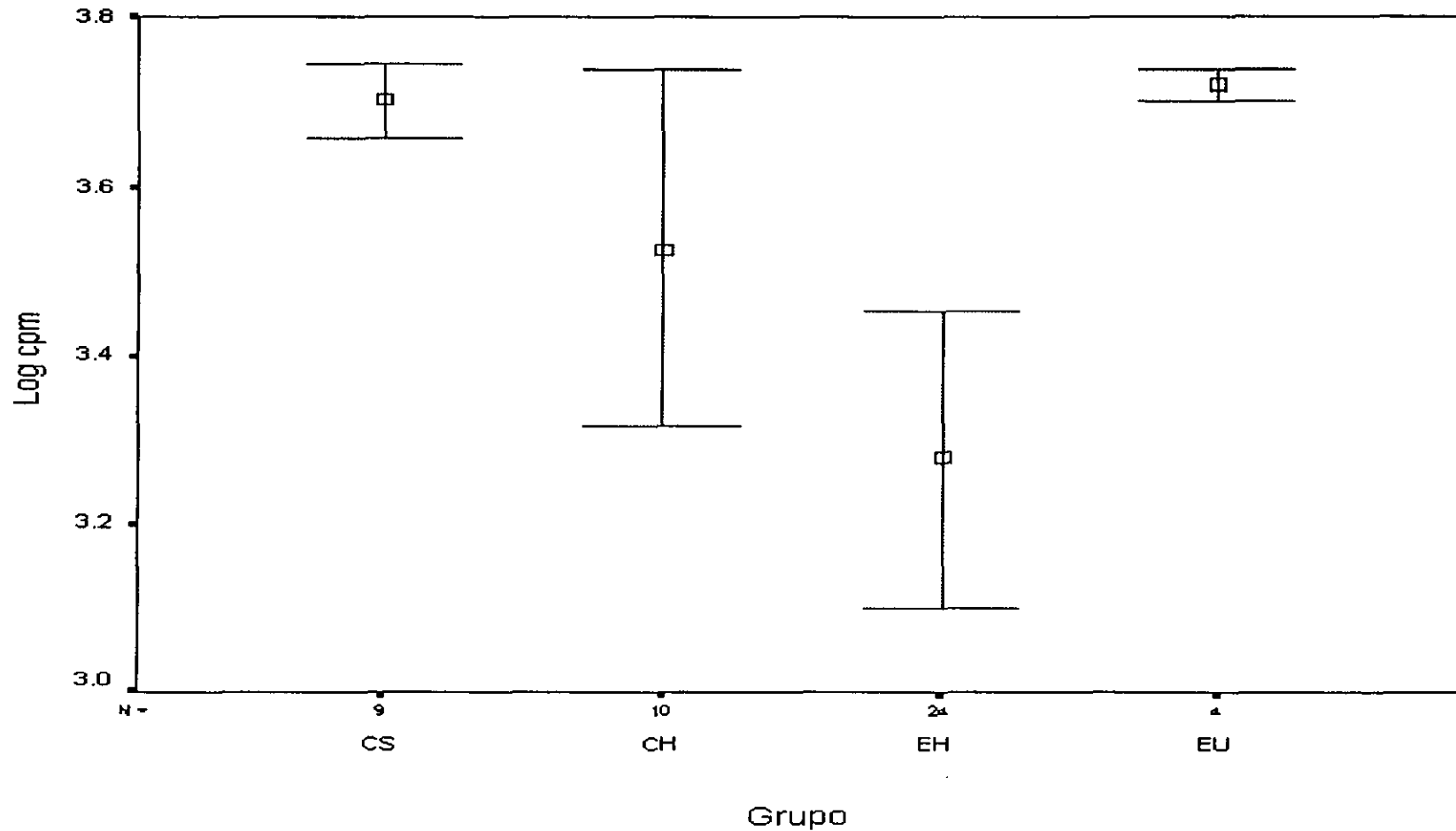


Figura 5. Ensayo de Radiorreceptor con Extractos Séricos Purificados
(Media \pm DE)



CS=controles sanos, CH=cirrosis hepática, EH=encefalopatia hepática, EU= encefalopatia urémica

ANOVA de una vía: $F = 4.34$, $df = 3,43$; $p = .009$

Figura 6. La Relación Hiperbólica de la Ley de Acción de Masas

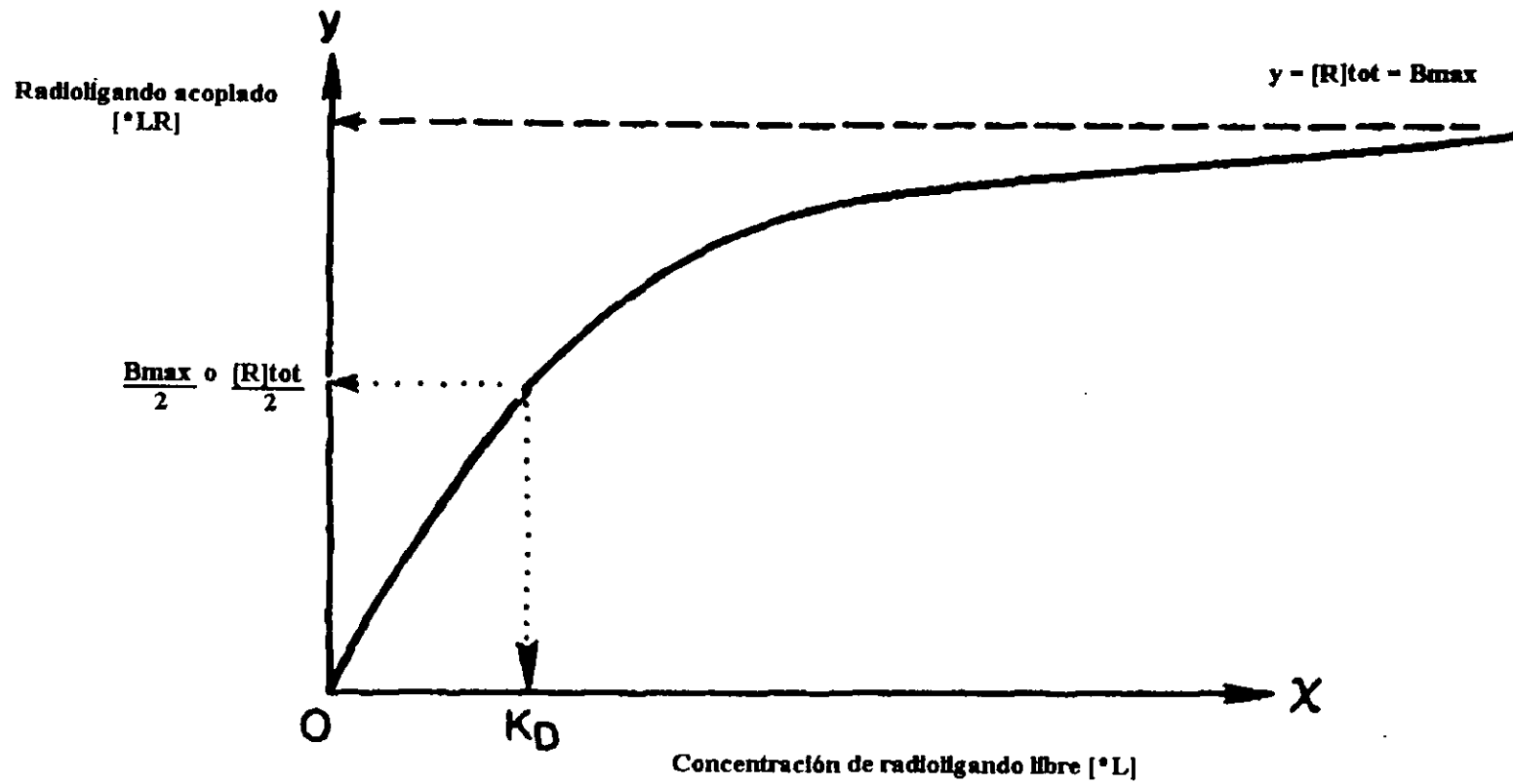
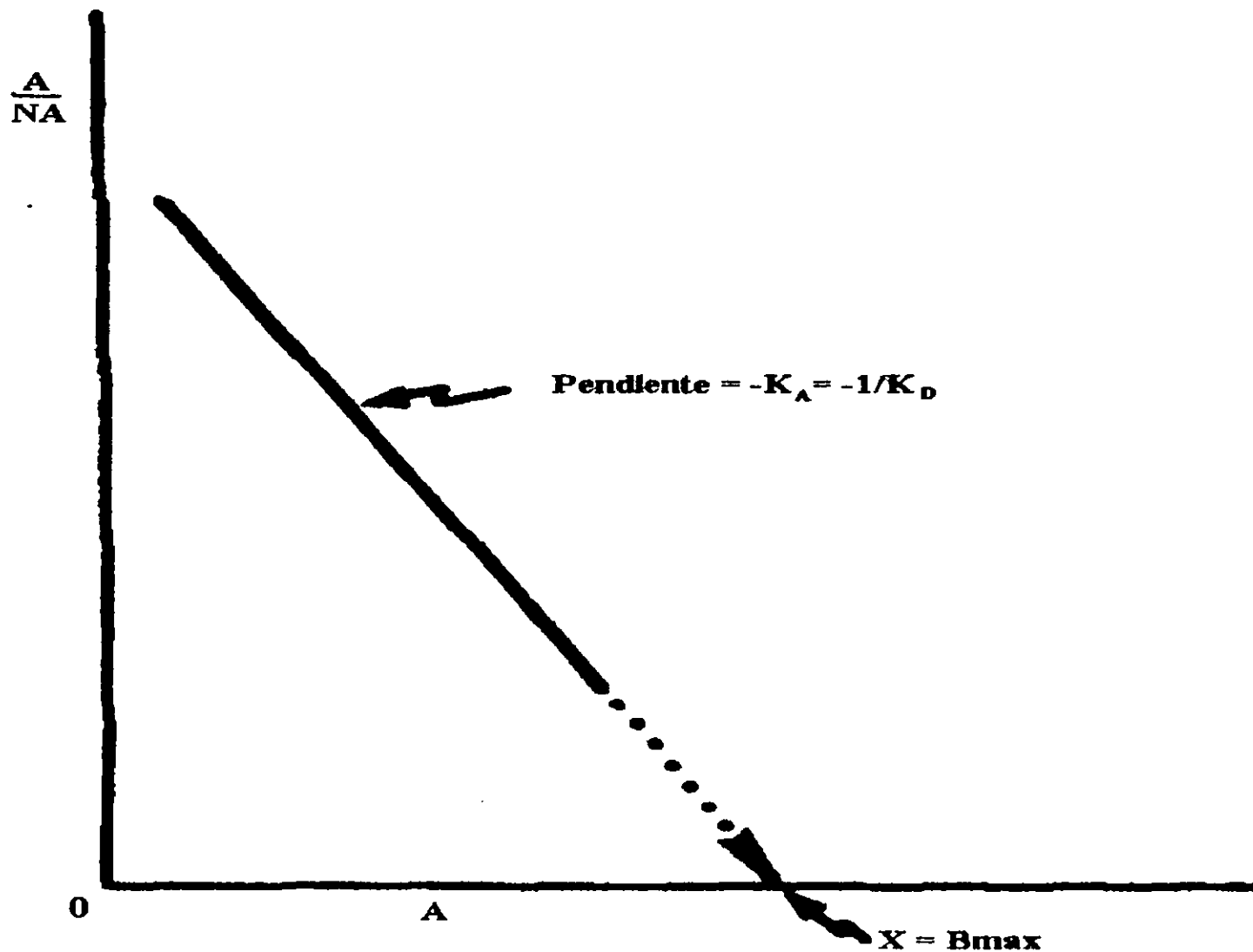


Figura 7. La Curva de Scatchard



A = radioligando acoplado a su receptor [*LR]
 NA = radioligando libre [*L]

Figura 8. La Curva de Hill

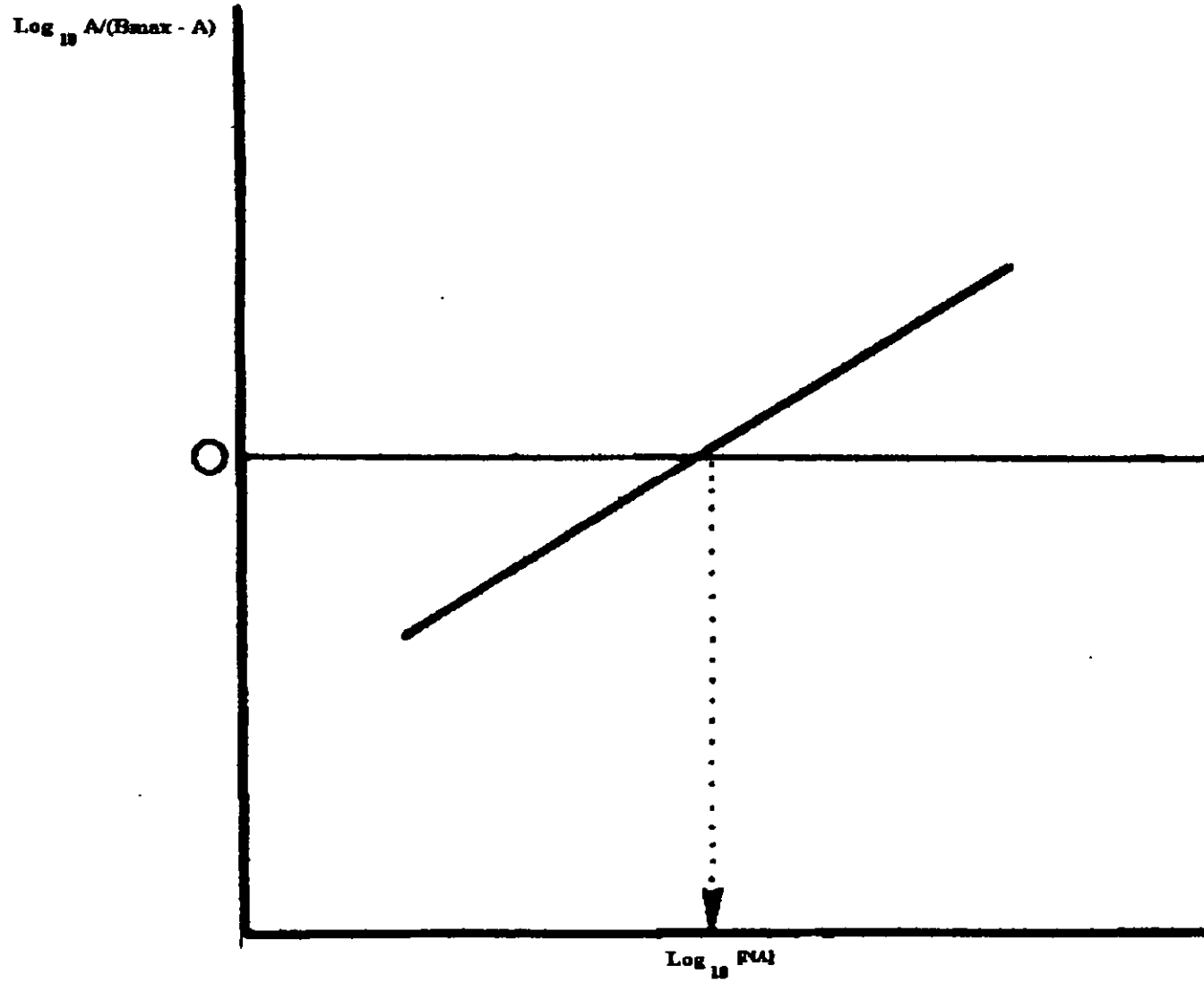
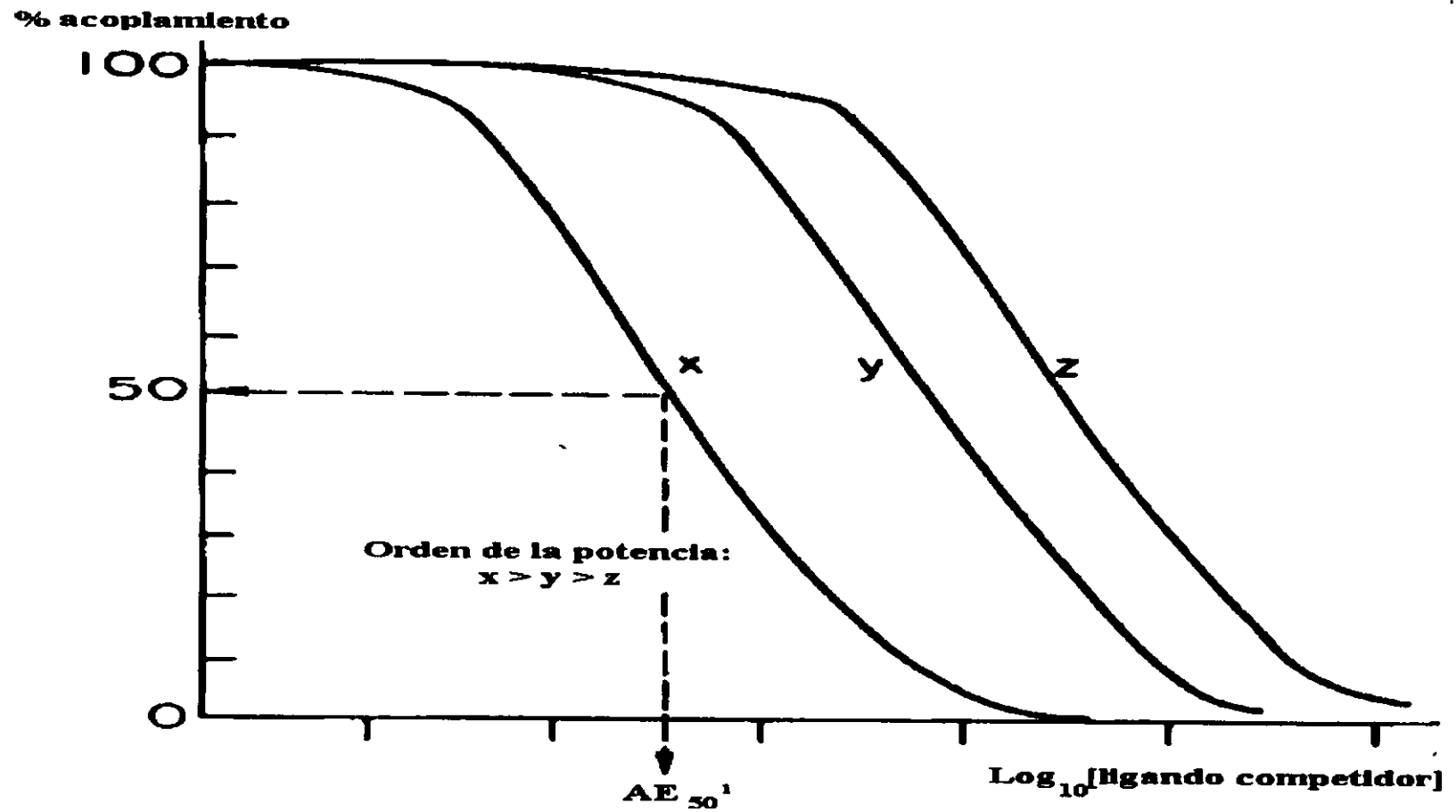


Figura 9. Curva de Acoplamiento Competitivo



¹AE₅₀ = acoplamiento específico 50

Plasma concentrations of endogenous benzodiazepine-receptor ligands in patients with hepatic encephalopathy: a comparative study

Carlos A. Hernández-Avila, MD; William J. Shoemaker, PhD; Hector A. Ortega-Soto, MD

Hernández-Avila — Neurobiology Laboratory, Department of Psychiatry, University of Connecticut Health Center, Farmington, Conn.; División de Investigaciones Clínicas del Instituto Mexicano de Psiquiatría; Departamento de Psiquiatría y Salud Mental de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, Distrito Federal, México; Shoemaker — Neurobiology Laboratory, Department of Psychiatry, University of Connecticut Health Center; Ortega-Soto — División de Investigaciones Clínicas del Instituto Mexicano de Psiquiatría; Departamento de Psiquiatría y Salud Mental de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México

Objective: Hepatic encephalopathy (HE) is a complex neuropsychiatric disorder secondary to acute or chronic liver failure. Although the exact causes of HE have not been clarified, enhanced central nervous system inhibition at the γ -aminobutyric acid (GABA)-benzodiazepine receptor complex, mediated by increased levels of endogenous benzodiazepine-receptor ligands (BZRL), has been proposed. Research exploring this hypothesis has yielded contradictory findings. This study evaluated the presence and levels of BZRL in plasma from patients with HE and 3 comparison groups. **Design:** Cross-sectional study. **Patients:** Twenty-four patients with HE, 10 patients with liver cirrhosis without encephalopathy (LC), 4 patients with uremic encephalopathy (UE), and 9 healthy subjects. **Interventions:** Radio-receptor assay of plasma samples from patients and controls. **Main outcome measures:** Plasma levels of BZRL. **Results:** The patients in the HE group had significantly higher plasma BZRL levels than the patients with UE and the healthy subjects, but not than those with LC, in whom these compounds were also detected in significant concentrations. When patients were classified according to the severity of HE, plasma levels of BZRL showed a modest correlation with stage of severity ($r = 0.37$). Interestingly, approximately one-third of the patients with HE did not have detectable levels of BZRL. **Conclusion:** Endogenous BZRL may play a role in the pathogenesis of HE, although neuropsychiatric symptoms in HE are difficult to explain in terms of these compounds alone.

Objectif : L'encéphalopathie hépatique est un trouble neuropsychiatrique complexe secondaire à une insuffisance hépatique aiguë ou chronique. Même si l'on n'a pas encore précisé les causes exactes de l'encéphalopathie hépatique, on a évoqué une inhibition accrue du système nerveux central au complexe acide γ -aminobutyrique (GABA)-récepteurs des benzodiazépines, causé par des taux accrus de ligands récepteurs endogènes des benzodiazépines. Des recherches sur cette hypothèse ont produit des résultats contradictoires. Dans le cadre de cette étude, on a évalué la présence et les taux de ligands récepteurs endogènes des benzodiazépines dans le plasma d'un patient atteint d'encéphalopathie hépatique et de 3 groupes témoins.

Correspondence to: Carlos A. Hernández-Avila, University of Connecticut Health Center, 263 Farmington Ave. MC2103, Farmington CT 06030; fax 860 679-1316; Hernand@psychiatry.UCHC.edu

Medical subject headings: benzodiazepines; GABA; hepatic encephalopathy; liver cirrhosis

J Psychiatry Neurosci 1998;23(4):217-22.

Submitted Sept. 29, 1997

Accepted Mar. 18, 1998

© 1998 Canadian Medical Association

Conception : Étude transversale. **Patients :** Vingt-quatre patients d'atteints d'encéphalopathie hépatique, 10 patients atteints de cirrhose du foie sans encéphalopathie, 4 patients atteints d'encéphalopathie urémique et 9 sujets en bonne santé. **Interventions :** Titrage de radiorécepteurs d'échantillons de plasma provenant de patients et de témoins. **Principales mesures de résultats :** Taux plasmatiques de ligands récepteurs endogènes des benzodiazépines. **Résultats :** Les patients atteints d'encéphalopathie hépatique présentaient des taux plasmatiques de ligands récepteurs endogènes des benzodiazépines beaucoup plus élevés que les patients atteints d'encéphalopathie urémique et les sujets en bonne santé, mais pas plus élevés que les sujets atteints de cirrhose du foie sans encéphalopathie chez lesquels on a aussi détecté des concentrations importantes de ces composés. Lorsqu'on a classé les patients selon la gravité de l'encéphalopathie hépatique, les taux plasmatiques de ligands récepteurs endogènes des benzodiazépines ont indiqué un lien modeste avec la gravité de l'encéphalopathie ($r = 0.37$). Le tiers des patients atteints d'encéphalopathie hépatique ne présentaient pas de niveau détectable de ligands récepteurs endogènes des benzodiazépines, ce qui est intéressant. **Conclusion :** Les ligands récepteurs endogènes des benzodiazépines peuvent jouer un rôle dans la pathogénèse de l'encéphalopathie hépatique, même si les symptômes neuropsychiatriques de l'encéphalopathie hépatique sont difficiles à expliquer en fonction de ces composés seulement.

Introduction

Hepatic encephalopathy (HE) is a complex neuropsychiatric disorder secondary to acute or chronic liver failure. In its early stages, it is characterized by irritability, sleep abnormalities, decreased attention, increased psychomotor agitation, confusion and clouding of sensorium; as the disease progresses, it leads to lethargy and subsequent coma. Although the exact pathogenesis of this condition has not been clarified, an increase in neuronal inhibitory activity by the γ -aminobutyric acid (GABA)ergic system has been associated with HE. Schafer et al¹ reported that induction of acute hepatic failure and HE in rabbits by administration of galactosamine was associated with abnormal visual evoked potentials. These results are similar to those observed in coma states induced by exogenous administration of high doses of barbiturates or benzodiazepines. Administration of the benzodiazepine antagonist flumazenil in rats with experimental HE and in humans with HE secondary to liver failure reversed some of the manifestations of the syndrome.²⁻⁴ These findings suggest that the benzodiazepine site on the GABA_A receptor complex may mediate some of the pathologic central nervous system (CNS) symptoms in HE. One group of investigators has hypothesized that, in HE, increased levels of an "endogenous benzodiazepine" or "endozepines" accumulate in the CNS secondary to liver failure.³ Interestingly, increased concentrations of *N*-desmethyldiazepam and diazepam have been isolated from brain extracts of rats with experimental HE,⁵ as well as from brain tissue, cerebrospinal fluid, and plasma extracted from patients with HE.^{7,8} Basile et al⁹ reported that plasma levels of diazepam, *N*-

desmethyldiazepam and total benzodiazepine-receptor ligands in 25 patients in different stages of HE significantly correlated with the severity of HE. Another study found increased brain uptake of the GABA-benzodiazepine-receptor ligand ¹¹C-flumazenil, measured by positron emission tomography, in 4 patients with HE.¹⁰ Yurdaydin et al¹¹ have proposed that the elevation of benzodiazepine-receptor ligands observed in rats with experimental HE is due in part to increased availability of benzodiazepine-like molecules, which may be synthesized by gut bacteria. However, further attempts to replicate these findings have yielded contradictory results. Zieve et al¹² reported that HE following experimental portacaval anastomosis was not reversed by the administration of a benzodiazepine-receptor antagonist. Pomier-Layrargues et al¹³ conducted a controlled clinical trial of flumazenil in the treatment of HE, which showed that, although a 40 % reduction in symptoms was observed after administration of the benzodiazepine antagonist, plasma levels of benzodiazepine-receptor ligands were not detected. On the other hand, although brains from rats with HE secondary to fulminant hepatic failure showed increased levels of benzodiazepine-receptor ligands, brains from rats with portacaval anastomosis did not show such an increase.⁷

Given the conflicting evidence regarding the involvement of endogenous benzodiazepine-receptor ligands in the pathophysiology of HE, we decided to conduct this cross-sectional study to evaluate the presence of benzodiazepine-receptor ligand (BZRL) activity in plasma from patients with HE, and to determine whether the severity of HE is correlated with plasma levels of BZRL.

Methods and subjects

Subjects

The clinical investigation protocol was approved by the Institutional Review Board of the National Institute of Nutrition and Medicine in Mexico City. Blood samples were obtained from 4 groups of patients: 24 patients with HE, 4 patients with uremic encephalopathy (UE), 10 patients with liver cirrhosis without encephalopathy (LC), and 9 healthy subjects. All patients or their relatives gave informed consent to participate in the protocol. Patients with HE and UE were recruited mainly from the emergency department, since these patients experienced acute mental status changes, while patients with LC without encephalopathy were recruited mainly during visits to the outpatient department for routine follow-up. Liver cirrhosis was documented by biopsy in all patients with liver disease. Diagnosis and severity of HE were determined jointly by the treating physician and one of the researchers (C.H.) using the following standard criteria: stage 1 — altered sleep pattern and personality changes; stage 2 — drowsy but oriented when awake; stage 3 — confused and agitated, with incoherent speech; stage 4 — deep coma with no response to verbal stimuli but possible response to painful stimuli. Blood samples of 3 to 5 mL were obtained from the patients at the same time that the clinical assessments were conducted. Patients were not included in the study if they had a history of seizure disorder, schizophrenia or dementia. Other exclusion criteria were use of alcohol or psychotropic drugs (including benzodiazepines) during the 2 weeks before study enrolment (as determined through careful review of clinical records, histories and drug charts).

Fifty percent of patients in the LC group were men, with a mean age of 56.7 (standard deviation [SD] 7.7) years. Fifty-five percent of those in the HE group were men, and the group had a mean age of 46.1 (SD 12.3) years. Most of these patients had a diagnosis of alcoholism (LC 70%; HE 54%) or viral hepatitis (LC 20%; HE 29%) as the main causes of liver damage as well as of moderate to severe portal hypertension (LC 80%; HE 92%). Fifty-four percent of the patients with HE had experienced bleeding in the upper gastrointestinal tract, which was the main trigger event of encephalopathy, and most of them (67%) had a history of HE episodes. Three of the 4 patients in the UE control group were men, and the group had a mean age of 46.0 (SD 19.8)

years, with diabetic nephropathy as the main cause of renal failure (50%), followed by hypertensive nephropathy (25%) and glomerulonephritis (25%). Forty-five percent of the healthy controls were men, and the mean age in the group was 42.8 (SD 11.4) years.

Extraction and purification of plasma samples

Plasma from each subject was obtained by centrifugation of whole blood at 3000 rpm for 15 minutes. Plasma samples were frozen and stored at -75°C . Subsequently, these were shipped on dry ice for analysis to the University of Connecticut Health Center Neurobiology Laboratory.

In order to minimize nonspecific protein interference with binding, 1-mL aliquots of plasma were acidified with an equal volume of perchloric acid (0.5 N) and then centrifuged for 15 minutes at 3000 rpm. The protein pellet was discarded and the supernatant was neutralized with 400 to 500 μL of sodium hydroxide (1N) until it attained a pH of 7.3 to 7.4. Subsequently, samples were passed through previously washed Sep-Pack C-18 cartridges (Waters, Milford, Ma.), as described by Olasmaa et al.⁷ Material was eluted from the Sep-Pack with acetonitrile/0.1% trichloroacetic acid and lyophilized overnight. The lyophilized sample was reconstituted in 50 μL of Tris-buffer solution for radio-receptor assay.

Radio-receptor assay

Cerebral cortex dissected from rat brain was homogenized in 30 volumes of 50 mmol/L Tris-hydrochloric acid buffer (pH 7.4) using a Tekmar homogenizer for 45 seconds at setting 6.5. The homogenate was then spun at $20\,000 \times g$ for 20 minutes at 4°C . The pellet was resuspended in 30 volumes of the same buffer and the above procedure repeated twice. Final pellets were resuspended in ice cold buffer to obtain a final protein concentration of 0.5 to 0.8 mg/mL.

Preliminary [^3H]flunitrazepam (^3H -FNZ) (specific activity 84.5 Ci/mmol; Dupont-NEN, Boston) binding was done according to the procedure of Faull and Vilhiger,¹⁴ with some modifications. A 12-point competition assay was conducted in triplicate by first adding to each tube 100 μL of cortex homogenate. Increasing concentrations of cold FNZ ($2.2\text{E}-10\text{M}$ to $4.7\text{E}-7\text{M}$) were added along with 1.0 nmol/L ^3H -FNZ. Incubations were done in 1.0-mL microtube strips (Skatron

Inc., Sterling, Va.) and all ligands were delivered in aliquots of 50 μ L. The final incubation volume was 250 μ L in each tube. Following additions of ligands to tissue, individual sets of 12 tubes were covered, shaken rapidly for 30 to 60 seconds and incubated at 0°C to 4°C for 1 hour. At the end of this incubation period, rapid filtration, washing and collection of membrane-bound ligand were performed using a semiautomatic Skatron cell harvester, as described by Devlin and Shoemaker.¹⁵ Radioactivity was measured using a Beckman LS 3801 Liquid Scintillation Counter at a counting efficiency of 45%. Counts per minute (cpm) were then plotted against the log of the cold FNZ concentration in order to obtain a standard ³H-FNZ displacement curve. Subsequently, 50- μ L aliquots of reconstituted serum from each subject were tested for their ability to inhibit 1.0 nmol/L ³H-FNZ binding to rat cortex membranes. The level of inhibition of ³H-FNZ binding produced by each serum was converted to an equivalent concentration of FNZ from the displacement curve and reported as FNZ-equivalents.

Analysis

Means and SDs are reported for clinical and demographic variables. Because of their abnormal distribution and skewness, plasma BZRL concentrations are reported in terms of median and range. Ranked Kruskal-Wallis one-way analysis of variance (ANOVA) was used to compare BZRL concentrations across diagnostic groups. A *p* level of 0.05 was considered significant. Subsequently, posthoc testing with the Mann-Whitney U test was conducted with Bonferroni-adjusted probability for the number of comparisons. Patients with HE were stratified into 4 groups according to the stage of HE, and Person's correlation matrix was calculated for increasing HE stages of severity and BZR ligand concentration. Finally, Fisher's exact test was used to compare the proportion of patients in each group with pharmacologically meaningful plasma levels of BZRL.

Results

Significant differences in BZRL plasma concentration determined by radio-receptor assay (Fig. 1) were observed across the 4 diagnostic groups ($\chi^2 = 13.12$; *p* = 0.004). The plasma levels of BZRL in the patients with HE (median 3.00, range 0.001 to 1000.00 nmol/L) were

significantly higher (Mann-Whitney U test, *p* = 0.004) than those in the healthy control subjects (median 0.001, range 0.001 to 0.63 nmol/L) and in the patients with UE (median 0.005, range 0.001 to 0.012 nmol/L; *p* = 0.04). However, comparison of BZRL plasma levels from the patients with HE with those from the patients with LC (median 0.36, range 0.004 to 200.00 nmol/L) did not show a significant difference (*p* = 0.20). In addition, the plasma BZRL levels in the patients from the LC group were significantly higher than those in the healthy control subjects (*p* = 0.01) and in the patients with UE (*p* = 0.01). On the other hand, as Figure 1 shows, plasma BZRL levels were only moderately correlated with HE stage of severity (*r* = 0.37, *p* = 0.03), with the lowest levels seen in stage 1 (median 4.0, range 2.0 to 251 nmol/L) and stage 2 (median 0.001, range 0.001 to 250 nmol/L), while the highest plasma BZRL levels were observed in patients with HE stage 3 (median 13.0, range 0.02 to 20.0 nmol/L) and stage 4 (median 5.5, range 2.0 to 1000.0 nmol/L). Interestingly, 29% of patients in the HE group had no or negligible plasma BZRL activity. Further, comparison of the proportion of patients who had pharmacologically meaningful plasma BZRL levels (greater than 2.0 nmol/L) among the groups showed that the HE group had a significantly larger proportion of patients (71%) with meaningful plasma BZRL levels than the healthy control group (Fisher's exact test, *p* = 0.01) and than the UE group (*p* = 0.01), in whom plasma BZRL activity was negligible. Moreover, the difference in the proportion of patients with pharmacologically meaningful plasma BZRL levels between the HE group and the LC (20%) group was also significant (*p* = 0.009).

Discussion

The patients in the HE group exhibited significantly higher plasma levels of BZRL than the patients in 2 out of the 3 control groups (healthy subjects and the UE group). Although we failed to find significant differences in plasma BZRL levels between the patients with HE and those in the LC group, we observed that a significantly larger proportion of patients in the HE group than in the LC group had pharmacologically meaningful levels of BZRL in their plasma. This finding suggests that plasma BZRL begin to accumulate in patients with LC without causing clinical cognitive impairment. The BZRL may then continue to accumulate, reaching their highest concentrations during HE

stages 3 and 4. Further support for this notion is provided by the observation that plasma BZRL levels correlate moderately with the 4 HE stages of severity.

The lack of statistical difference in plasma BZRL levels between the HE and LC groups in our study could be explained by the small sample size and lack of statistical power to detect such a difference. However, the fact that some patients in the LC group (20%) had pharmacologically meaningful plasma levels of BZRL without clinical signs of encephalopathy and that no BZRL were detected in approximately one-third of patients with HE suggests that neuropsychiatric symptoms in HE cannot be explained by the presence of these compounds alone. Olasmaa et al⁷ and Basile et al⁸ have reported that significant plasma BZRL levels were present in approximately 60% of patients with HE. Additionally, results from a controlled clinical trial of the efficacy of the benzodiazepine-receptor antagonist flumazenil in the treatment of HE showed a significant improvement in only 40% of patients and symptom reduction of no more than 50%.¹³ These findings suggest that factors other than the GABA-benzodiazepine complex receptor and endogenous benzodiazepine compounds may play a role in the

pathogenesis of HE, probably sensitizing the brain and potentiating the effects of endogenous BZRL.¹⁶ A plausible and more complex pathophysiologic mechanism for HE may involve an imbalance between the GABA-benzodiazepine inhibitory system and the glutaminergic excitatory system in the CNS, conditioned by hyperammonemia. It is known that phosphate-activated glutaminase is the rate-limiting step for glutamate synthesis and is strongly inhibited by ammonia. Accumulation of ammonia in the brain during hepatic insufficiency may result in a significant decrease in glutamate synthesis and release, with a consequent decrease of the CNS excitatory tone. GABA synthesis is less affected by alterations in glutaminase activity, so the accumulation of ammonia in addition to the BZRL build-up during hepatic insufficiency may lead to a net excess of inhibitory neurotransmission.¹⁷ In addition, genetic factors may also play a role. There is evidence that sensitivity of the GABA-benzodiazepine receptor complex to exogenous benzodiazepines is genetically controlled,¹⁸ suggesting that there are individual differences in brain sensitivity to endogenous BZRL and, consequently, to development of HE.

On the other hand, contrary to the endogenous

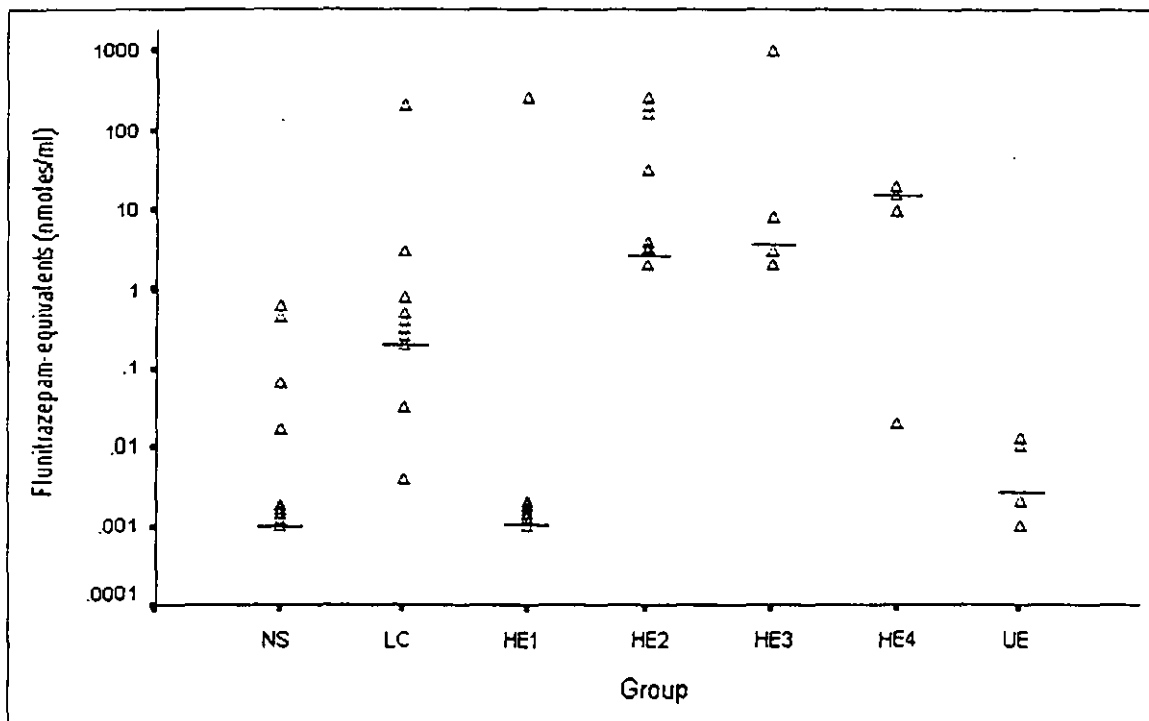


Fig. 1: Plasma levels of benzodiazepine receptor ligands, by diagnostic group and severity of hepatic encephalopathy. Solid lines represent median values for each group. Groups: NS = normal subjects, LC = patients with liver cirrhosis, HE = patients with hepatic encephalopathy, UE = patients with uremic encephalopathy.

BZRL hypothesis, some studies have reported that HE is not associated with an increase in BZRL levels.¹⁹ One possible reason for this discrepancy is differences in the methodology employed for extraction and purification of these ligands. Crude extraction without sample purification may explain negative findings, since there are many substances in plasma and brain tissue that can interfere with radio-receptor assay for BZRL.²⁰

The results of this study should be interpreted in light of several limitations. First, although the patients in our sample had no history of benzodiazepine administration during the 2 weeks before enrolment, undocumented benzodiazepine administration or abuse is a possibility. A second limitation is that we did not further identify these plasma BZRL, and for this reason we were not able to ascertain if these BZRL were halogenated 1,4-benzodiazepines of exogenous origin or compounds synthesized endogenously that accumulate to pathologic levels during liver disease. A third limitation is that most of the patients in our sample had chronic liver failure, making difficult to generalize our findings to other groups of patients with liver insufficiency. Nevertheless, similar findings have been reported in a sample of patients with fulminant hepatic failure secondary to acute acetaminophen overdose.⁸ Finally, observations from a longitudinal design rather than the cross-sectional design employed in this report, as well as the use of visual evoked potentials or neuropsychological testing as markers of diagnosis and severity, could provide more evidence to support an etiological relation between HE and plasma BZRL.

Acknowledgements

The authors wish to thank Dr. David Kershenovich at the National Institute of Nutrition and Medicine in Mexico City for his collaboration in patient recruitment, Dr. Alessandro Guidotti at the Psychiatric Institute at the University of Illinois Chicago for his suggestions regarding the radio-receptor assay, and Dr. W. Deckel at the University of Connecticut Health Center for his helpful comments and discussion.

References

- Schafer DF, Pappas SC, Brody LE. Visual evoked potentials in a rabbit model of hepatic encephalopathy. I. Sequential changes and comparisons with drug-induced comas. *Gastroenterology* 1984;86:540-5.
- Bansky G, Meier PJ, Ziegler WH. Reversal of hepatic coma by benzodiazepine antagonist (Ro 15-7788). *Lancet* 1985;1:1324.
- Basset MK, Mullen KD, Skolnik P, et al. Amelioration of hepatic encephalopathy by pharmacological antagonism of the GABA_A-benzodiazepine receptor complex in a rabbit model of fulminant hepatic failure. *Gastroenterology* 1987;93:1069-77.
- Ferenci P, Grimm G, Gangl A. Successful longtime treatment of chronic hepatic encephalopathy with a benzodiazepine antagonist. *Hepatology* 1987;7:1064.
- Olasmaa M, Rothstein JD, Goldman M. Endogenous benzodiazepines in hepatic encephalopathy. *Lancet* 1989;1:491-2.
- Basile AS, Lewis P, Taysir J. Brain concentrations of benzodiazepines are elevated in an animal model of hepatic encephalopathy. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:5263-7.
- Olasmaa M, Rothstein JD, Guidotti A, et al. Endogenous benzodiazepine receptor ligands in human and animal hepatic encephalopathy. *J Neurochem* 1990;55:2015-23.
- Basile AS, Huges RD, Harrison PM, et al. Elevated brain concentrations of 1,4-benzodiazepines in fulminant hepatic failure. *N Engl J Med* 1991;325:473-8.
- Basile AS, Harrison PM, Huges RD, et al. Relationship between plasma benzodiazepine receptor ligand concentrations and severity of hepatic encephalopathy. *Hepatology* 1993;19:112-21.
- Samson Y, Burneau J, Pappata S, et al. Cerebral uptake of benzodiazepine measured by positron emission tomography in hepatic encephalopathy. *N Engl J Med* 1987;316:414-5.
- Yurdaydin C, Walsh T, Engler HD, et al. Gut bacteria provide precursors of benzodiazepine receptor ligands in a rat model of hepatic encephalopathy. *Brain Res* 1995;679:42-8.
- Zieve L, Ferenci P, Rzepczynski D, et al. A benzodiazepine antagonist does not alter the course of hepatic encephalopathy or neural γ -aminobutyric acid (GABA) binding. *Metab Brain Dis* 1987;2:201-5.
- Pomier-Layrargues G, Giguere JF, Lavoie J, et al. Flumazenil in cirrhotic patients with hepatic coma: a randomized double blind placebo-controlled crossover trial. *Hepatology* 1994;19:32-7.
- Faulk RL, Villiger JW. Multiple benzodiazepine receptors in the human basal ganglia: a detailed pharmacological and anatomical study. *Neuroscience* 1988;24:433-51.
- Devlin T, Shoemaker WJ. Characterization of κ -opioid binding using dynorphin_{1-13}} and U69,593 in the rat brain. *J Pharm Exp Ther* 1990;253:749-69.
- Mullen KD, Basile AS. Benzodiazepine-receptor antagonists and hepatic encephalopathy: Where do we stand? *Gastroenterology* 1993;105:937-40.
- Rao VLR, Murthy CRK, Butterworth RF. Glutaminergic synaptic dysfunction in hyperammonemic syndromes. *Metab Brain Dis* 1992;7:1-20.
- Pritchett DB, Sontheimer H, Shivers B, et al. Importance of a novel GABA_A receptor subunit for benzodiazepine pharmacology. *Nature* 1989;338:582-5.
- Widler P, Fisch HU, Schooch P, et al. Increased benzodiazepine-like activity is neither necessary nor sufficient to explain acute hepatic encephalopathy in the thioacetamide-treated rat. *Hepatology* 1993;18:1459-64.
- Rothstein JD. Benzodiazepine-receptor ligands and hepatic encephalopathy: a causal relationship? *Hepatology* 1994;19:248-50.