

INVESTIGACIÓN

2009

ESTUDIO POR RESONANCIA MAGNÉTICA DE LA PRESENCIA DE EDEMA CEREBRAL DE BAJO GRADO, DE ATROFIA CEREBRAL Y DE ALTERACIONES EN TRACTOS NEURONALES EN PACIENTES CON CIRROSIS HEPÁTICA. POSIBLE UTILIDAD COMO INDICADORES DE ENCEFALOPATÍA HEPÁTICA MÍNIMA

FUNDACIÓN **MAPFRE**

www.fundacionmapfre.com

Investigadora Principal

Carmina Montoliu Félix

Lda. en Ciencias Biológicas.
Investigadora Sistema Nacional de Salud.
Fundación Investigación Hospital Clínico Universitario de Valencia

Equipo Investigador

Amparo Urios Lluch

Dra. en Ciencias Biológicas.
Investigadora. Hospital Clínico Universitario de Valencia

Desamparados Escudero García

Dra. en Medicina y Cirugía.
Médico especialista Hepatología.
Hospital Clínico Universitario de Valencia

Felicidad Rodríguez Almendros

Dra. en Medicina y Cirugía.
Médico especialista del Aparato Digestivo.
Hospital Clínico Universitario de Valencia

José Manuel Rodrigo Gómez

Dr. en Medicina y Cirugía.
Jefe del Servicio de Hepatología.
Hospital Clínico Universitario de Valencia

Juan Ángel del Olmo Puchalt

Ldo. en Medicina y Cirugía.
Médico especialista Hepatología.
Hospital Clínico Universitario de Valencia

Miguel Ángel Serra Desfilis

Dr. en Medicina y Cirugía.
Médico especialista Hepatología.
Hospital Clínico Universitario de Valencia

Índice

	Página
1. RESUMEN DEL PROYECTO ORIGINAL	4
2. OBJETIVOS PROPUESTOS	4
3. LABOR REALIZADA	
4. OBTENCIÓN DE IMÁGENES DE RESONANCIA MAGNÉTICA	4
4.1. Adquisición de imágenes de rm	4
4.2. Análisis de las imágenes: alteraciones cerebrales que se están analizando	5
4.2.1. Presencia y tipo (citotóxico ó vasogénico) de edema cerebral de bajo grado	5
4.2.2. Determinación de la presencia de alteraciones neuroanatómicas por rm. Determinación de lesiones en la materia gris. Presencia de atrofia cerebral (espesor cortical)	5
4.2.3. Determinación de lesiones en la materia blanca. Alteraciones en tractos neuronales	5
5. CORRELACIONES	5
6. RESULTADOS	
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	9

1. RESUMEN DEL PROYECTO ORIGINAL

Pacientes con cirrosis hepática pueden presentar encefalopatía hepática mínima (EHM), con alteraciones cognitivas y psicomotoras. La EHM disminuye la calidad de vida y aumenta el riesgo de padecer EH clínica y de muerte. Su tratamiento temprano mejoraría la calidad de vida y prolongaría la supervivencia. Por tanto es importante disponer de procedimientos sensibles para diagnosticar la EHM. Actualmente se utiliza la batería de tests psicométricos PHES, pero tiene inconvenientes en la clínica diaria. Son necesarios nuevos procedimientos para diagnosticar la EHM.

2. OBJETIVOS PROPUESTOS

Los objetivos de este proyecto consisten en:

- 1) Estudiar por resonancia magnética en pacientes cirróticos con ó sin encefalopatía hepática mínima y en controles sanos:
 - a) la presencia y tipo (citotóxico ó vasogénico) de edema cerebral de bajo grado.
 - b) las alteraciones en tractos neuronales.
 - c) la presencia de atrofia cerebral
- 2) Determinar la utilidad de la determinación dichos parámetros como procedimiento para el diagnóstico de la presencia de encefalopatía hepática mínima (EHM).

Los estudios se realizarán en 20 pacientes con cirrosis hepática y EHM, 20 pacientes con cirrosis hepática sin EHM y 20 controles sin enfermedad hepática.

3. LABOR REALIZADA

Se han completado los estudios de resonancia magnética en un equipo de 3 Teslas (Siemens Trio, 3.0 Tesla de cuerpo entero). Se han adquirido las imágenes para los estudios de alteraciones de los tractos neuronales y de la presencia de atrofia cerebral.

Previamente a la sesión de RM a cada individuo se le realizan los siguientes estudios:

1) **Realización de una batería de 5 tests psicométricos**, que evalúan diferentes tipos de alteraciones neurológicas (cognitivas, psicomotoras, atención). El conjunto de los resultados de esta batería de tests (Psychometric Hepatic Encephalopathy Score, PHES) se utiliza como procedimiento de referencia para detectar la presencia de encefalopatía hepática mínima (EHM). Los individuos cuyo "score" en esta batería es ≤ -4 o inferior tienen EHM, los que tienen mas de -4 no tienen EHM.

2) **Determinación de la frecuencia crítica de parpadeo**, utilizando el equipo conocido como Hepatonorm. Se ha propuesto como alternativa más sencilla y objetiva para detectar la EHM, pero aún no se ha reconocido como procedimiento de referencia.

3) Toma de sangre para la **realización de análisis bioquímicos** y clínicos del grado de enfermedad y sus complicaciones.

4) Toma de sangre para obtener suero y linfocitos para determinación de parámetros relacionados con **posibles indicadores periféricos de EHM**: inflamación (ILs), hiperamonemia, metabolismo del óxido nítrico (nitros + nitratos) y del GMP cíclico (cGMP, ANP...) y activación de la guanilato ciclasa soluble por óxido nítrico en linfocitos intactos.

Estos análisis se realizan tanto en controles sanos como en pacientes cirróticos.

Los resultados de los distintos análisis se correlacionarán posteriormente con los datos obtenidos en los estudios de RM.

En función de los resultados de los tests psicométricos se clasifican los pacientes cirróticos en dos grupos: sin EHM y con EHM y se seleccionan los individuos de cada grupo que se someterán a los estudios de RM.

Aproximadamente un 30% de los pacientes cirróticos presentan EHM. Por tanto, para conseguir un número suficiente de pacientes de este grupo se requiere analizar un número amplio de sujetos, lo cual lleva tiempo. Por esta razón las sesiones de RM se han programado con un intervalo entre las mismas suficiente para garantizar que se disponga de suficientes pacientes con EHM para el estudio.

4. OBTENCIÓN DE IMÁGENES DE RESONANCIA MAGNETICA

Se ha completado la adquisición de las imágenes de RM en los siguientes individuos:

- 30 controles sanos
- 31 pacientes cirróticos SIN EHM
- 31 pacientes cirróticos CON EHM

Las imágenes obtenidas de algunos de estos individuos no son útiles porque se han movido (varios casos), por lo que el número de individuos útiles por grupo es de 26 controles, 27 pacientes cirróticos SIN EHM y 26 pacientes cirróticos CON EHM. Este número de individuos es mayor del inicialmente previsto (20) porque los primeros análisis han mostrado que existe cierto grado de variabilidad entre individuos del mismo grupo que aconseja aumentar el tamaño de la muestra para poder realizar un análisis mas fiable estadísticamente de los resultados, en particular de las correlaciones con otros parámetros.

4.1. Adquisición de imágenes de RM

Para cada individuo se han tomado imágenes tridimensionales de alto contraste del cerebro pesadas en T1 (3DT1) usando una secuencia MPRAGE (Magnetization Prepared RAPid Gradient Echo). Además se tomaron a continuación imágenes trasversales de difusión DTI en 30 direcciones que permite cuantificar el movimiento traslacional del agua en tejidos biológicos. Para su posterior análisis, se dividen los mosaicos de cada sujeto en sus correspondientes imágenes individuales, resultando en 4340 imágenes por individuo.

4.2. Análisis de las imágenes: alteraciones cerebrales que se están analizando

A partir de las imágenes captadas se están realizando distintos tipos de análisis para identificar la presencia (y cuantificar el grado, en su caso) de diferentes tipos de posibles alteraciones cerebrales en los pacientes:

1. Presencia y tipo (citotóxico ó vasogénico) de edema cerebral de bajo grado
2. Presencia de atrofia cerebral (espesor cortical)
3. Alteraciones en tractos neuronales
4. Alteraciones en la intensidad de la imagen en T1, que puede ser debida a diferentes causas (acumulación de sustancias paramagnéticas como manganeso, cobre, etc.). Aunque la adquisición de las imágenes se ha completado, su análisis aun requerirá bastantes meses de trabajo.

4.2.1. Presencia y tipo (citotóxico ó vasogénico) de edema cerebral de bajo grado

Se determina a partir de las imágenes de DTI. En el edema vasogénico e intersticial la velocidad de las moléculas de agua está aumentada debido a alteraciones de la barrera hematoencefálica (vasogénico) o por aumento de la permeabilidad entre el líquido cefaloraquídeo y el tejido cerebral (intersticial).

Este estudio permitirá determinar si los pacientes cirróticos presentan edema vasogénico o citotóxico de bajo grado; en que áreas cerebrales y si lo presentan solo (o en mayor grado) los pacientes con EHM.

Se ha desarrollado una aplicación informática para trazar regiones de interés (ROIs) y determinar en las mismas los valores de "mean diffusivity", que nos permitirán identificar y cuantificar la presencia de edema vasogénico ó citotóxico en las áreas seleccionadas. Se ha iniciado el análisis de la "mean diffusivity" en hipotálamo, corteza motora, cerebelo medial y cerebelo lateral.

Una vez obtenidos los valores para todos los individuos, se realizarán los estudios de correlación mencionados mas adelante para evaluar si la determinación de la presencia de edema de bajo grado en algún área cerebral podría ser útil para diagnosticar la presencia de EHM o de alteraciones en alguna de las funciones neurológicas (atención, etc) evaluadas por cada uno de los tests psicométricos realizados.

4.2.2. Determinación de la presencia de alteraciones neuroanatómicas por RM. Determinación de lesiones en la materia gris. Presencia de atrofia cerebral (espesor cortical)

El espesor de la materia gris es un marcador de integridad cortical más fiable que la mera medida del volumen de una estructura cortical concreta, lo cual se explica por la escasa variabilidad de la estructura citoarquitectónica que compone la materia gris. A cada uno de los controles y pacientes con y sin EHM se les está realizando una segmentación de la materia blanca-materia gris mediante métodos basados en la deformación de la materia blanca.

Esto permite generar modelos de superficie cortical para cada cerebro individual, y calcular valores de espesor cortical para cada vértice de esta superficie. Con el fin de llevar el mapa de espesor cortical de cada caso a un sistema de coordenadas idénticas, cada mapa es remuestreado a una superficie anatómica estandarizada mediante la aplicación de algoritmos no lineales de registro esférico.

Después de este proceso, todos los mapas de espesor cortical mostrarán un número idéntico de vértices, y cada vértice tendrá las mismas coordenadas esféricas para cada paciente de un mismo grupo.

4.2.3. Determinación de lesiones en la materia blanca. Alteraciones en tractos neuronales

Recientes avances en el campo de la imagen cerebral han permitido determinar in vivo alteraciones de la microestructura de la materia blanca por medio de la técnica denominada imagen por tensor de difusión. Esta técnica determina la dirección de la difusión de las moléculas de agua en diversos tejidos, que coincide en el caso de tejidos fibrosos, como es la materia blanca, con la orientación de las fibras nerviosas. Esta propiedad permite asignar una dirección a cada vóxel de la imagen, facilitando así la reconstrucción de los haces de fibras nerviosas que conectan diversas regiones cerebrales. La integridad de los haces de fibras nerviosas se puede cuantificar indirectamente a través de la fracción de anisotropía. De esta forma, haces de fibras nerviosas con un elevado nivel de organización mostrarán valores altos de anisotropía y un bajo nivel de difusión, mientras que lesiones axonales que desorganicen la materia blanca contribuirán a disminuir los valores de anisotropía y a incrementar los niveles de difusión.

Una vez obtenidas las imágenes de difusión (DTI) de controles y pacientes con y sin encefalopatía hepática nos encontramos en el proceso de eliminación de artefactos para su posterior reconstrucción. El proceso de reconstrucción de las imágenes DTI demanda de una importante capacidad computacional y de la aplicación de sofisticados programas de análisis de la imagen. Posteriormente a la reconstrucción de los diferentes haces de fibras nerviosas calcularemos la fracción de anisotropía (FA) en regiones de interés. Se conoce que determinados cambios o lesiones afectan a la estructura y composición de la microestructura de la materia blanca, ya sea por su destrucción o por la reorientación de las células que las componen. Estos cambios se traducen en una reducción de la anisotropía en la imagen. Como paso final, estimaremos los histogramas de estas magnitudes con el fin de contrastar imágenes procedentes de los diferentes grupos de casos incluidos en el estudio.

5. CORRELACIONES

Se analizará si la presencia de EHM ó el deterioro en alguna de las funciones neurológicas (Atención, etc.) eva-

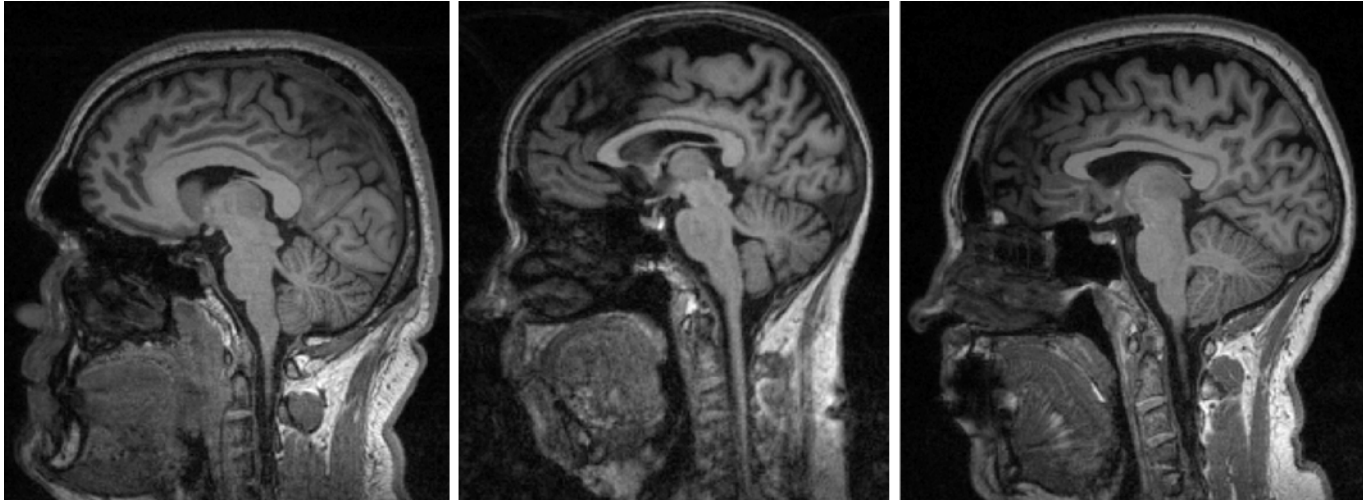


Figura 1. Imágenes representativas de la intensidad de T1.

luadas por cada uno de los tests psicométricos realizados, se correlacionan con:

- la presencia y grado de edema en algún área cerebral
- Presencia de atrofia cerebral (alteraciones en el espesor cortical)
- Alteraciones en tractos neuronales.

6. RESULTADOS

Se han adquirido las imágenes de resonancia magnética en un equipo de 3 Teslas (Siemens Trio, 3.0 Tesla de cuerpo entero) y se han analizado las imágenes para determinar la hiperintensidad en T1 en diferentes áreas cerebrales.

Previamente a la sesión de RM a cada individuo se le realizan los siguientes estudios:

1) **Realización de una batería de 5 tests psicométricos**, que evalúan diferentes tipos de alteraciones neurológicas (cognitivas, psicomotoras, atención). El conjunto de los resultados de esta batería de tests (Psychometric Hepatic Encephalopathy Score, PHES) se utiliza como procedimiento de referencia para detectar la presencia de encefalopatía hepática mínima (EHM). Los individuos cuyo "score" en esta batería es ≤ -4 o inferior tienen EHM, los que tienen más de -4 no tienen EHM.

2) **Determinación de la frecuencia crítica de parpadeo**, utilizando el equipo conocido como Hepatonorm. Se ha propuesto como alternativa más sencilla y objetiva para detectar la EHM, pero aún no se ha reconocido como procedimiento de referencia.

En función de los resultados de los tests psicométricos se clasifican los pacientes cirróticos en dos grupos: sin EHM y con EHM y se seleccionan los individuos de cada grupo que se someterán a los estudios de RM.

Aproximadamente un 30% de los pacientes cirróticos presentan EHM. Por tanto, para conseguir un número su-

ficiente de pacientes de este grupo se requiere analizar un número amplio de sujetos.

Se han adquirido imágenes de RM en los siguientes individuos: 30 controles sanos; 31 pacientes cirróticos SIN EHM; 31 pacientes cirróticos CON EHM.

Las imágenes obtenidas de algunos de estos individuos no son útiles porque se han movido (varios casos), por lo que el número de individuos útiles por grupo es de 26 controles, 27 pacientes cirróticos SIN EHM y 26 pacientes cirróticos CON EHM. Este número de individuos es mayor del inicialmente previsto (20) porque los primeros análisis han mostrado que existe cierto grado de variabilidad entre individuos del mismo grupo que aconseja aumentar el tamaño de la muestra para poder realizar un análisis más fiable estadísticamente de los resultados, en particular de las correlaciones con otros parámetros.

Para cada individuo se han tomado imágenes tridimensionales de alto contraste del cerebro pesadas en T1 (3DT1) usando una secuencia MPRAGE (Magnetización Prepared Rapid Gradient Echo). Además se tomaron a continuación imágenes transversales de difusión DTI en 30 direcciones que permite cuantificar el movimiento traslacional del agua en tejidos biológicos. Para su posterior análisis, se dividen los mosaicos de cada sujeto en sus correspondientes imágenes individuales, resultando en 4340 imágenes por individuo.

A partir de las imágenes captadas se han analizado las alteraciones en la intensidad de la imagen en T1, que puede ser debida a diferentes causas (acumulación de sustancias paramagnéticas como manganeso, cobre, etc).

Imágenes representativas de las obtenidas en controles, pacientes sin EHM y pacientes con EHM se muestran en la Figura 1.

Se cuantificó la intensidad de T1 en diferentes áreas cerebrales. La Figura 2 muestra los resultados obtenidos en el hipocampo dorsal, hipocampo ventral, y la sustancia blanca de los lóbulos frontal y occipital. En ninguna de estas áreas se altera la intensidad de T1 en pacientes ci-

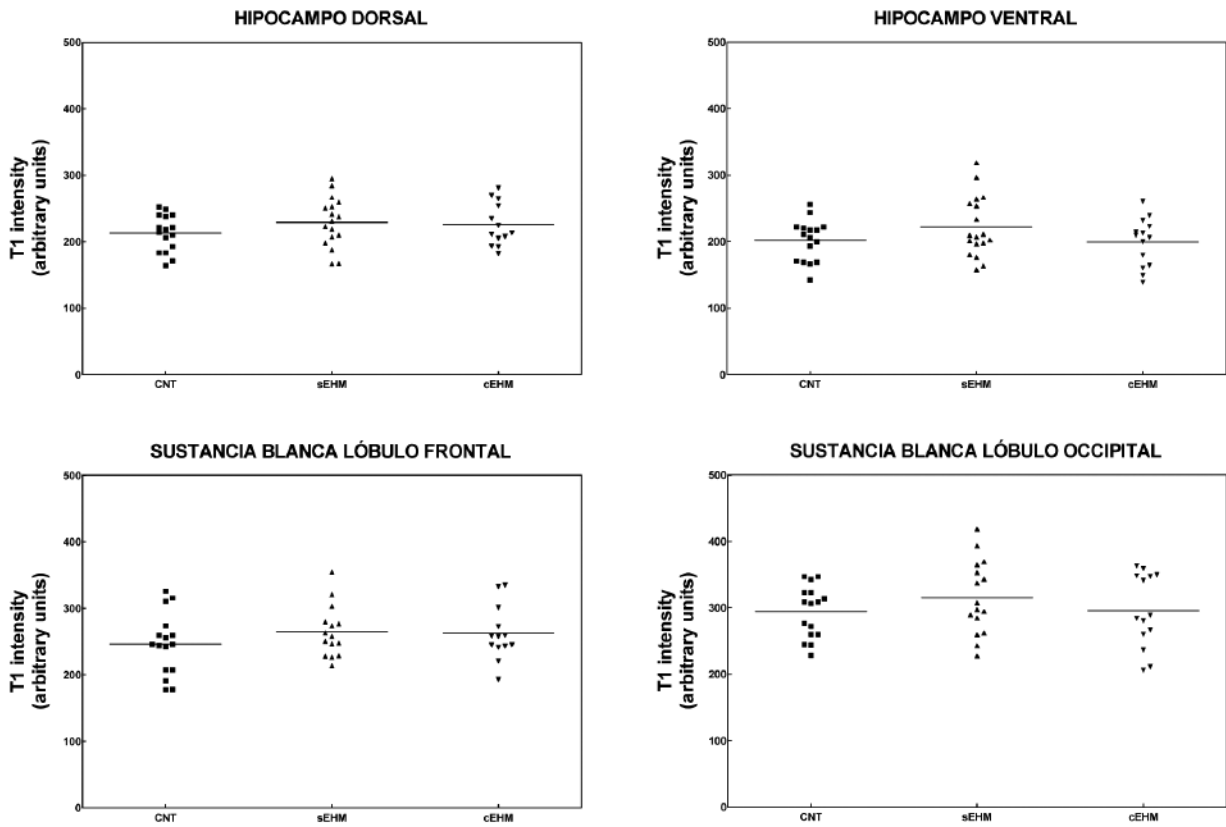


Figura 2. Intensidad de T1 en hipocampo dorsal, hipocampo ventral y la sustancia blanca de los lóbulos frontal y occipital.

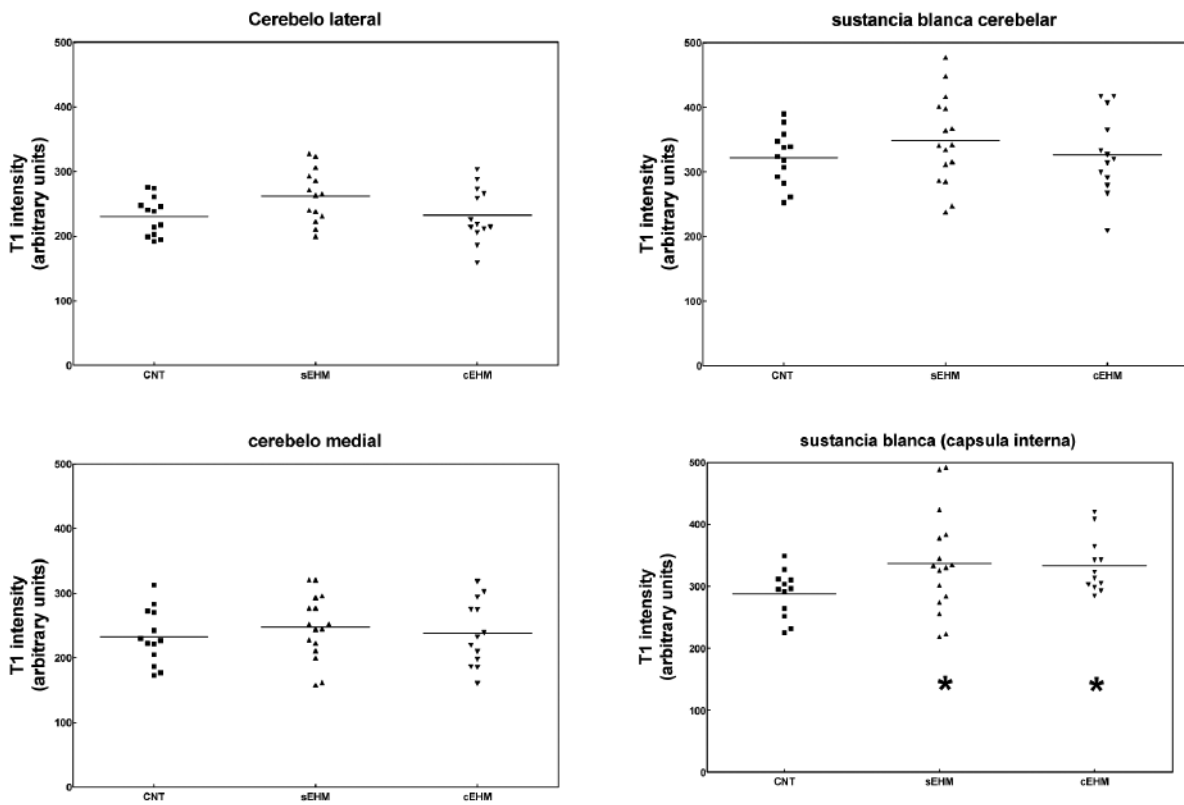


Figura 3. Intensidad de T1 en cerebelo medial y lateral y en sustancia blanca del cerebelo y de la cápsula interna.

róticos sin o con EHM comparada con la de los controles sanos.

La Figura 3 muestra los resultados obtenidos en el cerebelo lateral, cerebelo medial, sustancia blanca del cerebelo y de la cápsula interna. No se observan alteraciones en la intensidad de T1 en ninguna sub-área del cerebelo en pacientes cirróticos sin o con EHM comparada con la de los controles sanos. Sin embargo, se observa un aumento significativo ($p < 0.05$) en la intensidad de T1 en la cápsula interna tanto de pacientes sin EHM como en los que padecen EHM. La intensidad de T1 en la cápsula in-

terna no es diferente en pacientes sin y con EHM por lo que no se puede utilizar como diagnóstico de la presencia de EHM.

La Figura 4 muestra la intensidad de T1 en el tálamo lateral y medial, el caudado y el putamen. No se observan alteraciones en la intensidad de T1 en el tálamo en pacientes cirróticos sin o con EHM comparada con la de los controles sanos. La intensidad de T1 en el caudado y el putamen de los pacientes sin EHM no es diferente de la de los controles. Sin embargo, se observa un aumento en la intensidad de T1 en el caudado ($p=0.05$) y el putamen

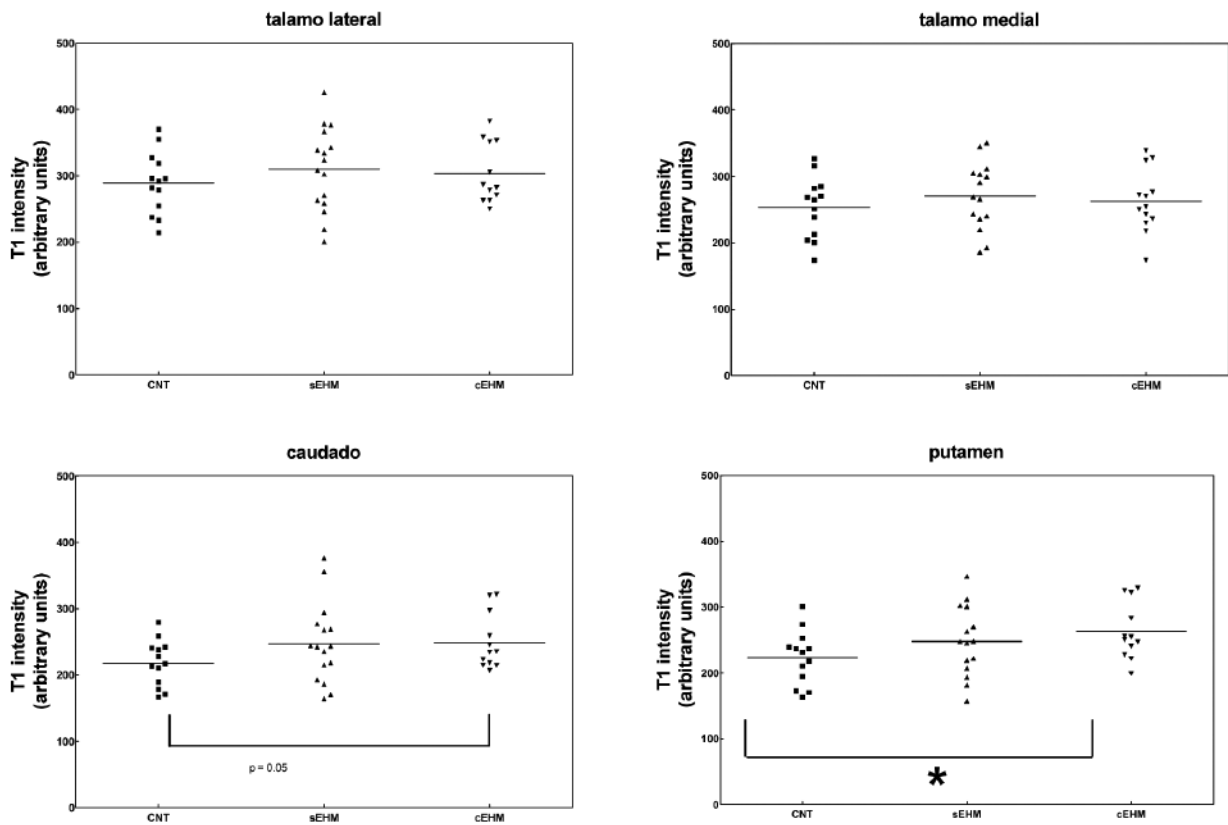


Figura 4. Intensidad de T1 en tálamo medial y lateral, caudal y putamen.

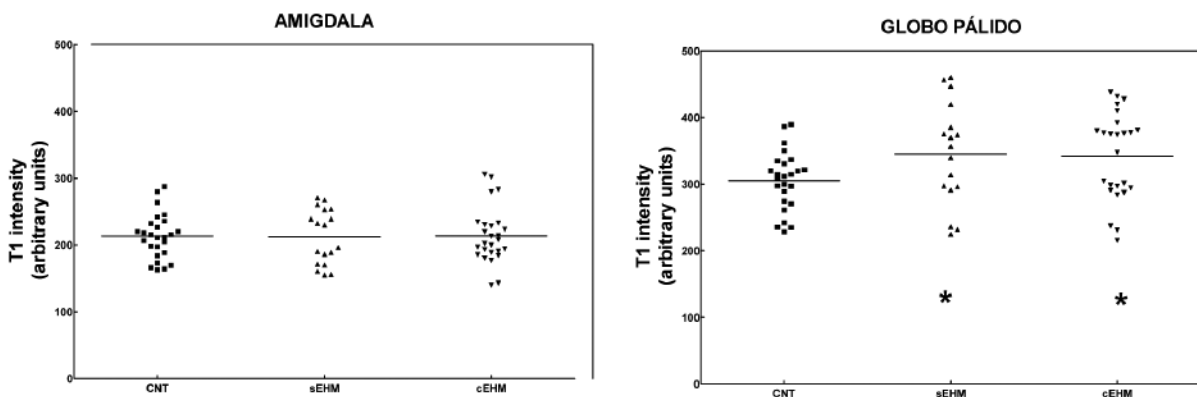


Figura 5. Intensidad de T1 en amígdala y globo pálido.

($p < 0.05$) de los pacientes con EHM comparada con la de los controles. La intensidad de T1 en caudado y, especialmente, en el putamen podría ser útil en el diagnóstico de la presencia de EHM.

La Figura 5 muestra los resultados obtenidos en la amígdala y el globo pálido. No se observan alteraciones en la intensidad de T1 en la amígdala en pacientes cirróticos sin o con EHM comparada con la de los controles sanos. Sin embargo, se observa un aumento significativo ($p < 0.05$) en la intensidad de T1 en el globo pálido tanto de pacientes sin EHM como en los que padecen EHM. La intensidad de T1 en el globo pálido no es diferente en pacientes sin y con EHM por lo que no se puede utilizar como diagnóstico de la presencia de EHM.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Montoliu, C., Piedrafita, B., Serra, M.A., del Olmo, J.A., Ferrandez, A., Rodrigo, J.M. and Felipo, V. (2007) Activation of soluble guanylate cyclase by nitric oxide in lymphocytes correlates with minimal hepatic encephalopathy in cirrhotic patients. *J Mol Med*. 85(3): 233-241.
- Romero-Gómez, M., Córdoba, J., Jover, R., del Olmo, JA, Ramirez, M., Rey, R., de Madaria, E., Montoliu, C., Nuñez, D., Flavia, M., Compañy, L. Rodrigo, JM. and Felipo, V. (2007) Value of the Critical Flicker Frequency in patients with Minimal Hepatic Encephalopathy. *Hepatology* 45(4): 879-885.
- Montoliu, C., Piedrafita, B., Serra, M.A., del Olmo, JA, Urios, A., Rodrigo, J.M. and Felipo, V. (2008) IL-6 and IL-18 in blood may discriminate cirrhotic patients with and without minimal hepatic encephalopathy. *J Clin Gastroenterol* (en prensa).
- Häussinger D, Kircheis G, Fischer R, et al. HE in chronic liver disease: a clinical manifestation of astrocyte swelling and low-grade cerebral edema? *J Hepatol*. 2000; 32: 1035-1038.
- Häussinger D. Low grade cerebral edema and the pathogenesis of HE in cirrhosis. *Hepatology*. 2006; 43: 1187-1190.
- Schaefer PW, Grant PE, Gonzalez RG Diffusion-weighted MR imaging of the brain. *Radiology* 2000; 217: 331-45.
- McManus ML, Churchwell KB, Strange K Regulation of cell volume in health and disease. *N Engl J Med* 1995; 333: 1260-1266.
- Lodi R, Tonon C, Stracciari A, et al. Diffusion MRI shows increased water apparent diffusion coefficient in the brains of cirrhotics. *Neurology*. 2004; 62: 762-766.
- Miese F, Kircheis G, Wittsack HJ, et al. 1H-MR spectroscopy, magnetization transfer, and diffusion-weighted imaging in alcoholic and nonalcoholic patients with cirrhosis with HE. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2006; 27: 1019-1026.
- Weissenborn K, Kolbe H. The basal ganglia and portal-systemic encephalopathy. *Metab Brain Dis*. 1998; 13: 261-72.
- Timmermann L, Gross J, Butz, M, et al. Mini-asterix in hepatic encephalopathy induced by pathologic thalamo-motor-cortical coupling. *Neurology* 2003; 61: 689-92.
- Timmermann L, Butz M, Gross J, Kircheis G, Häussinger D, Schnitzler A. Neural synchronization in hepatic encephalopathy. *Metab Brain Dis*. 2005; 20: 337-346.
- Cauli O, Mili N, Llansola M, Felipo V. Motor activity is modulated via different neuronal circuits in rats with chronic liver failure than in normal rats. *Eur J Neurosci* 2007; 25: 2112-2122.
- Cauli, O, Mili, N., Rodrigo, R. and Felipo, V. Hyperammonemia alters the mechanisms by which metabotropic glutamate receptors in nucleus accumbens modulate motor function. *J. Neurochem*. 2007; 103(1): 38-46.
- Cauli O, Llansola M, Erceg S, Felipo V. Hypolocomotion in rats with chronic liver failure is due to increased glutamate and activation of metabotropic glutamate receptors in substantia nigra. *J Hepatol*. 2006; 45: 654-661.
- Lerch JP, Pruessner JC, Zijdenbos A, Hampel H, Teipel SJ, Evans AC. Focal decline of cortical thickness in Alzheimer's disease identified by computational neuroanatomy. *Cereb Cortex*. 2005; 15(7): 995-1001.
- Singh V, Chertkow H, Lerch JP, Evans AC, Dorr AE, Kabani NJ. Spatial patterns of cortical thinning in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Brain*. 2006; 129(Pt 11): 2885-93.
- Kril JJ, Butterworth RF. Diencephalic and cerebellar pathology in alcoholic and nonalcoholic patients with end-stage liver disease. *Hepatology*. 1997; 26(4): 837-41.

Conflicto de intereses

Los autores hemos recibido ayuda económica de FUNDACIÓN MAPFRE para la realización de este proyecto. No hemos firmado ningún acuerdo por el que vayamos a recibir beneficios u honorarios por parte de alguna entidad comercial o de FUNDACIÓN MAPFRE.