

PUNTO DE VISTA

Modelos experimentales de encefalopatía hepática

Daniel Díaz-Gómez, María Jover, José Antonio del Campo, Antonio Galindo y Manuel Romero-Gómez

UGC de Enfermedades Digestivas y CIBERehd. Hospital Universitario de Valme. Universidad de Sevilla

Díaz-Gómez D, Jover M, Del Campo JA, Galindo A, Romero-Gómez M. Modelos experimentales de encefalopatía hepática. *Rev Esp Enferm Dig* 2011; 103: 536-541.

INTRODUCCIÓN

Aunque existen muchos modelos de experimentación con animales, aún no se ha descrito el modelo ideal para la hepatopatía crónica con encefalopatía hepática. Distintos problemas asociados a los modelos han llevado a los investigadores a desarrollar sus propios modelos experimentales, a veces únicos, lo que dificulta la comparación entre los resultados de los estudios realizados (1). En 2002 se publicó un consenso sobre la definición, la nomenclatura, el diagnóstico y la cuantificación de la encefalopatía hepática (EH) (2) en el que se proponían tres tipos de EH: tipo A, asociado a insuficiencia hepática aguda; tipo B, asociado a la presencia de comunicación portosistémica (“bypass”) sin hepatopatía intrínseca, y tipo C, asociado a cirrosis hepática. La EH de tipo C se clasifica a su vez según la forma de presentación en EH espontánea o episódica, en relación con factores precipitantes, EH persistente subdividida en leve (EH de grado I), grave (EH II-IV) o dependiente del tratamiento (aparición precoz tras la retirada del tratamiento) y finalmente EH mínima, como primera manifestación de la EH. La EH de tipo C es la forma más habitual y, desde el punto de vista clínico, la EH episódica por

descompensación de una cirrosis hepática es la más típica e importante.

El modelo ideal de EH debería reproducir la mayoría de los rasgos clínicos de este síndrome en el ser humano: se produce principalmente en pacientes con hepatopatía crónica, lo precipitan factores conocidos, debe ser reversible al corregir los factores precipitantes y debe mejorar con rifaximina o fármacos reductores del amoniaco, estando íntimamente asociado a la alteración del metabolismo del nitrógeno y presentando un amplio espectro de intensidades. Como la mayoría de los pacientes con EH tienen también hepatopatía crónica, derivaciones portosistémicas, hiperamonemia e inflamación sistémica, sería muy de desear que los modelos animales incluyeran estos hechos (Fig. 1).

CIRROSIS INDUCIDA EN RATAS CON TETRACLORURO DE CARBONO

Este modelo es razonablemente fácil de reproducir, aunque una cifra importante de animales muere durante el tratamiento con CCl₄, especialmente si se mantiene hasta la aparición de la ascitis. Múltiples grupos han resalado que, generalmente, se suelen detectar pocos cambios de comportamiento a pesar de alcanzarse hepatopatías muy avanzadas y descompensadas. Aunque el modelo de cirrosis bien compensada solo puede servir para investigar los efectos de la hiperamonemia (HA) (3), que normalmente es moderada, se ha observado que no existe ninguna reducción grave de la actividad enzimática en el ciclo de la urea (4), lo que se encuentra habitualmente en los pacientes con cirrosis. Por este motivo, Snodgrass (4) ha afirmado que el modelo es inadecuado para estudiar las enfermedades crónicas del hígado. Sería interesante reproducir una fase avanzada de cirrosis, pero la aparición de ascitis marcada complica la interpretación de los resultados en relación con la conducta de los animales. Por tanto, el modelo del CCl₄ ya no se utiliza para investigar la EH.

Recibido: 07-07-11.
Aceptado: 08-07-11.

Correspondencia: Manuel Romero Gómez. Unidad de Gestión Clínica de Enfermedades Digestivas y CIBERehd. Hospital Universitario de Valme. Universidad de Sevilla. Avda. de Bellavista, s/n. 41014 Sevilla.
e-mail: mromerogomez@us.es

LIGADURA DEL CONDUCTO BILIAR

La obstrucción del conducto biliar principal induce una cirrosis biliar secundaria parecida a la del ser humano; en los animales se produce secundariamente insuficiencia hepática con aparición de ictericia, hipertensión portal (5), derivación portosistémica (6), translocación bacteriana y disfunción inmunitaria (7). Las ratas con ligadura del conducto biliar no presentan encefalopatía aunque los niveles de amoniaco puedan elevarse (8); sin embargo, estos animales muestran pérdida de la actividad motora espontánea (9) y déficit de memoria (10). Se han realizado varios intentos para hallar un modelo que emplee la ligadura biliar –que es fácil de realizar– y pueda dar lugar a episodios claros de encefalopatía hepática. En este sentido se ha descrito un modelo en el que aparecía encefalopatía tras la anastomosis portocava en ratas cirróticas por ligadura del conducto biliar, aunque este modelo no resultó ampliamente distribuido probablemente por la elevada mortalidad de la derivación quirúrgica en los animales cirróticos (11). Recientemente se ha propuesto un modelo que combina la ligadura del conducto biliar con la alimentación rica en amoniaco, que se ha observado que aumenta las concentraciones de amoniaco en la sangre y el cerebro (8), pero aún no se han observado en estos animales alteraciones conductuales que indiquen la presencia de encefalopatía. La obstrucción del conducto biliar impide probar fármacos que se excretan en la bilis. No obstante, el modelo de la LCB es fácil de realizar y nos permite estudiar el metabolismo del amoniaco en combinación con un entorno inflamatorio. En los estudios preliminares se ha observado que la reducción del amoniaco con fenilacetato de L-ornitina (OP) es eficaz en el modelo de la LCB. La administración de OP aumenta la conversión del glutamato en glutamina estimulando la actividad de la glutamina-sintetasa en el músculo con la consiguiente excreción de fenilacetilglutamina en la orina, reacción en la que se elimina una molécula de amoniaco. Además, el OP normalizó la actividad de la glutaminasa en el tubo digestivo, indicando que el OP limita eficazmente la producción de amoniaco *in vivo* en un modelo de LCB (9). Estos resultados indican que el desarrollo de maneras de actuar sobre estas enzimas para impedir la liberación de amoniaco y prevenir la EH es una estrategia terapéutica válida en el modelo de la LCB.

DERIVACIONES PORTOCAVA EN LA RATA

Se han realizado muchos estudios en ratas con derivación portocava (DPC) que han revelado algunos datos clave sobre la hiperamonemia en las enfermedades hepáticas (12) (Fig. 2). Inicialmente surgieron dudas sobre la suficiencia del modelo para reproducir síntomas que pudieran ser equivalentes a los de la EH humana, pero según Bengsston y colaboradores (13-15), además de otros autores (16,17), en el modelo sí se han observado alteraciones de conducta, especialmente en las áreas de la actividad espontánea en

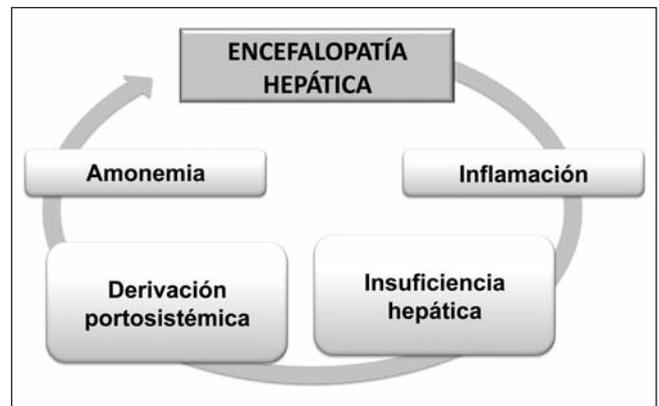


Fig. 1. Fisiopatología de la encefalopatía hepática.

respuesta a entornos nuevos y la actividad exploratoria. Es más, se ha observado que estas alteraciones son reversibles si se aplica al animal un tratamiento eficaz de la EH y, como se dijo anteriormente, el modelo puede ser importante para estudiar la EH. En concreto, Conjeevaram y cols. (18) han demostrado que, añadiendo neomicina al agua para beber de las ratas con DPC, la actividad motora se reduce después de exponerlas a un entorno nuevo y oscuro, mientras que Coy y cols. también lograron esto usando técnicas más sofisticadas y midiendo las perturbaciones de la actividad motora circadiana (19). Este grupo también demostró que las ratas operadas mostraban la misma mejoría cuando se les administraba una dieta baja en proteínas. Sin embargo, debe recordarse que el mero hecho de someter a las ratas a una DPC no puede garantizar la aparición de alteraciones conductuales. Otros aspectos, como la técnica quirúrgica usada o el tamaño del estoma de la anastomosis microvascular pueden influir significativamente en el gradiente de presión de la derivación; también la dieta administrada, el tiempo desde la intervención hasta la realización del estudio en las ratas e incluso la edad y el peso de los animales pueden afectar a la capacidad de los investigadores para detectar cambios significativos (20,21). Además, debe observarse que puede producirse una neovascularización hepática espontánea que desarrolle derivaciones hepatopedales, que se asocian a recuperación del peso, disminución de la HAM y EH subclínica en estos animales.

Lee y Fisher (22) en 1961 y Bismuth en 1962 (23) describieron una técnica de anastomosis portocava directa, fiable y reproducible mediante microsutura vascular, que aún sigue en vigor gracias a sus buenos resultados y reproducibilidad por distintos grupos de investigadores. Sin embargo, debido a la dificultad técnica que conlleva, se han hecho varios intentos de simplificarla. Funovics (24) en 1974 describió una técnica de anastomosis mediada por el uso de un tubo de teflón con el propósito de evitar la sutura directa, y Jerkins (21) en 1988 describió otra en la que la unión de las venas porta y cava se realiza con pegamento de cianoacrilato con la intención de facilitar la manipulación del vaso microquirúrgico y, por tanto, la técnica en sí. Sin embargo, otros estu-

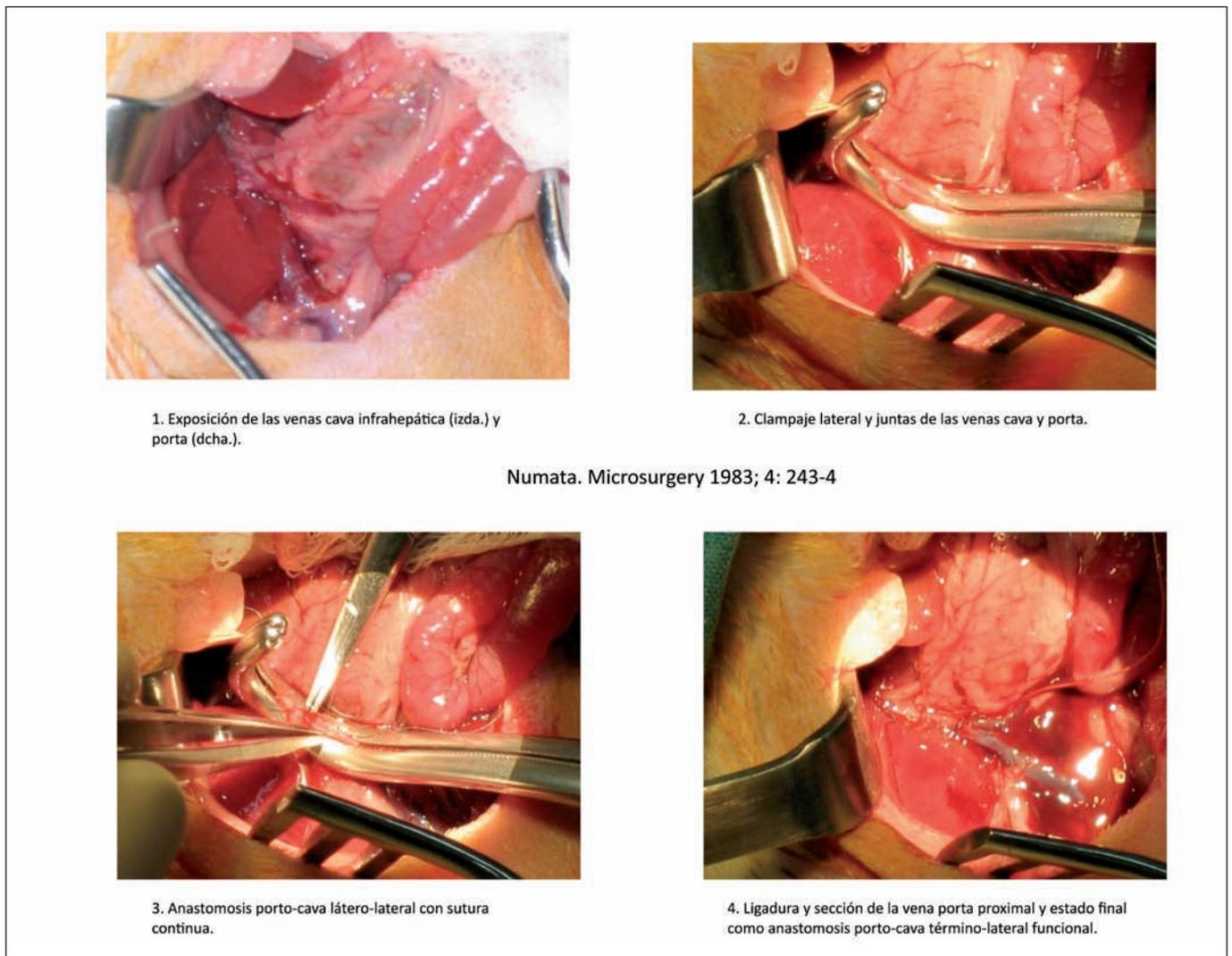


Fig. 2. Cuatro pasos de la derivación porto-cava en la rata.

dios que compararon estos tipos de derivación alternativos descritos por Bismuth y Lee concluyeron que el gradiente de presión entre los sistemas portal y de la cava era menor después de las derivaciones quirúrgicas. Esto indicaría que la anastomosis microquirúrgica tiene un índice de viabilidad a largo plazo superior al de las derivaciones alternativas, que presentan gradientes mayores por su mayor tendencia a estar en el periodo postoperatorio. Esto explicaría la variabilidad de los resultados descritos previamente al usar estas técnicas quirúrgicas alternativas (20).

Numata publicó en 1983 una modificación de la técnica que la simplifica en gran medida y hace que resulte más fácil y reproducible minimizar el tiempo operatorio, una cuestión esencial para la viabilidad del animal tras la intervención (25). Esta técnica se basa en una anastomosis microquirúrgica latero-lateral entre las venas porta y cava de la rata, permitiendo un mayor calibre de la derivación frente a las derivaciones latero-terminales de Lee, Fisher

y Bismuth, y con una tasa teórica menor de estenosis a largo plazo. Es más, esta técnica puede usarse para realizar anastomosis latero-laterales, si la derivación se deja como se ha descrito, o término-laterales, si se liga y corta la parte proximal de la vena porta inmediatamente después de la anastomosis, permitiendo su aplicación a estudios experimentales con distintos propósitos (Fig. 3).

Como en las ratas no pueden emplearse ni pruebas psicométricas ni el diagnóstico clínico de la EH, necesitamos usar métodos alternativos. Varios autores han descrito la evaluación de algunos reflejos y respuestas a estímulos (26), difíciles de interpretar, y medidas informatizadas de la actividad (13,14) o los ritmos circadianos (19) que representan un paso hacia delante en este sentido. Según Mullen (27), las ratas sometidas a DPC presentan respuestas inciertas de actividad motora espontánea, incluso si se realiza una derivación suficiente; se precisa una gran cifra de animales para demostrar alteraciones conductuales significa-

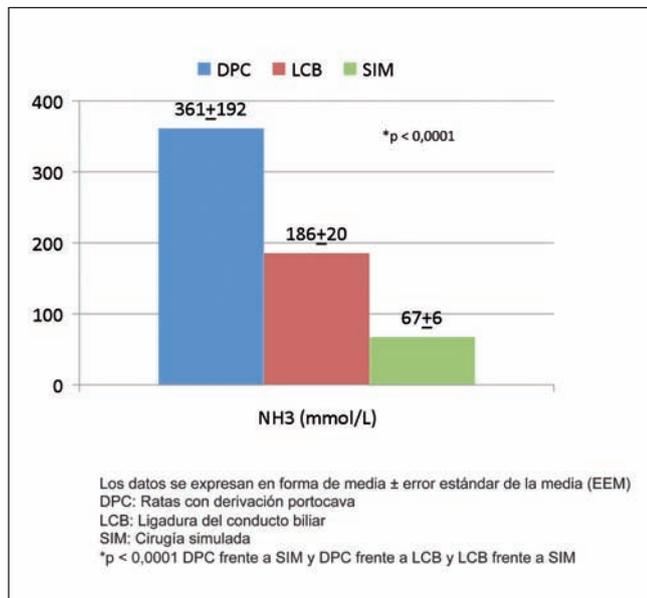


Fig. 3. Niveles plasmáticos de amoníaco en ratas con cirugía simulada, derivación portocava y ligadura del conducto biliar.

tivas en los animales operados frente a los controles, a pesar del uso de métodos de medición más sofisticados. También se han postulado distintos sistemas de medir potenciales evocados (28) y el análisis de los patrones encefalográficos (29), con validación escasa de los datos en los modelos animales de la EH.

Otro aspecto crucial es la técnica de la derivación. Un estoma suturado amplio con escasa oclusión vascular y por un cirujano experto es la base de la larga duración del cortocircuito portosistémico y será capaz de reproducir adecuadamente los efectos de la EH comparado con las técnicas en que la derivación está mediada por un “botón” o realizada con cianoacrilato, lo que se asocia a la reversibilidad de los efectos (27). La complejidad de los estudios para evaluar la encefalopatía en las ratas en términos de sus alteraciones conductuales y la falta de normalización no han llevado a limitar la validación del modelo a la pérdida de peso y al estudio de las alteraciones bioquímicas que tienen lugar en el síndrome de encefalopatía hepática.

Recientemente se ha publicado un artículo de revisión en relación con los modelos animales para estudiar la EH (30) que estipula que la DPC en la rata sería un buen modelo para la EH de tipo B, donde existe una derivación portosistémica sin insuficiencia hepática. Sin embargo, como hace notar Gandhi (31), “la DPC es un modelo de atrofia hepática que cuenta con más de 100 años”, haciendo referencia al trabajo de Hahn en el siglo diecinueve (32) y caracterizada en gran detalle en los estudios de Bismuth (33) durante la década de 1960 del siglo pasado. En sus primeros trabajos se describe: “el aspecto del hígado en la laparotomía realizada unos días después a las ratas previamente sometidas a DPC es pálido y, después de sacrificar al animal y pesarlo, se observa una marcada reducción de su tamaño”.

Tabla I. Diez pasos de la derivación portocava

1. Usar anestesia inhalada
2. Disección amplia de las venas porta y cava
3. Evitar lesiones vasculares
4. Corregir el clampaje lateral de ambas venas
5. Tiempo de clampaje inferior a 15 minutos
6. Los estomas deben ser de al menos 5 mm
7. Sutura trenzada del 7/0 con agujas cilíndricas
8. Hemostasis después de retirar el clampaje mediante compresión suave
9. Ligadura y sección de la vena porta
10. Aislamiento de los animales en jaulas separadas para evitar lesiones

Esta disminución del tamaño hepático no es paralela a la reducción del peso de la rata, pues el cociente peso hepático/peso animal también es menor (34). En el hígado, bajo el microscopio, se observa una atrofia secundaria que no se acompaña de cambios de composición en términos de componentes celulares básicos (agua, lípidos, carbohidratos y proteínas), ni alteraciones de la arquitectura hepática. Parece relacionarse con la atrofia hepatocitaria, que comienza muy poco después de la cirugía y puede durar varios meses durante el periodo postoperatorio (35). Según los estudios de función hepatocitaria, se han observado varios cambios en estas ratas, como un descenso de la producción de sales biliares (alrededor del 40%), una menor conjugación de la bilirrubina, una alteración del metabolismo de la eliminación biliar de determinados tintes, como el verde de indocianina –usado a menudo como método diagnóstico para evaluar la reserva funcional hepática antes de la hepatectomía en los pacientes cirróticos (36)–, y alteraciones de la agregación plaquetaria y del metabolismo hepático de los fármacos (37).

En la génesis de este fenómeno pueden intervenir factores hemodinámicos y hormonales. La DPC reduce el flujo de sangre a través del hígado a pesar de haber un aumento importante, aunque no suficiente, a través de la arteria hepática. Los argumentos principales a favor de esta hipótesis derivan de observaciones experimentales de que la atrofia se corrige casi del todo tras una transposición portocava o modificación de la vena porta (38). Es más, puede aducirse la responsabilidad sobre el fenómeno de la pérdida de sustancias que pasan por el hígado con efecto hepatotrópico, principalmente de origen pancreático y que afectan a la regeneración hepática. Entre ellas, la insulina y el glucagón han sido las más estudiadas (39). Bircher admite que “los aspectos principales de este modelo son la derivación portosistémica y la pérdida de parénquima funcional hepático (40), lo que implica que el modelo podría considerarse adecuado para representar las alteraciones de la EH de tipo C” (que se asocia a CH).

Las lesiones neuroanatómicas que aparecen en la encefalopatía de origen hepático son parecidas a las de los

pacientes con hiperamonemia grave a causa de defectos enzimáticos genéticos en el ciclo de la urea. Estos hallazgos fueron descritos inicialmente por Von Hosslin y Alzheimer en 1912 (41), y en el caso de las hepatopatías, estas lesiones son habitualmente reversibles después de corregir los niveles elevados de amoniaco. Estas células presentan un núcleo agrandado muy pálido, a veces deforme, con un nucléolo prominente y un patrón marginal de cromatina, rodeado por una capa fina de citoplasma y se llaman células de Alzheimer de tipo II (42). No es raro encontrar degeneración espongiiforme de las capas profundas de la corteza cerebral y los ganglios basales en estos pacientes (43). No existen estudios de los distintos modelos experimentales de la EH en que se describan plenamente las alteraciones neuroanatómicas (44), aunque algunos autores han demostrado la presencia de típicas células de Alzheimer de tipo II tras realizar la DPC en las ratas, alteraciones que se consideran las más características de la EH (45-48).

Pilbeam y cols. publicaron en 1983 (44) un estudio sobre cerebros de ratas sometidas a DPC y sacrificadas en distintos momentos tras la cirugía que puso en cuestión la presencia de astrocitos de Alzheimer de tipo II en los animales operados. Estudiaron los cerebros de sólo 8 ratas (2 animales con 2, 4, 16 y 30 semanas tras la cirugía). Hallaron que no había diferencias significativas entre los niveles plasmáticos de amoniaco de los animales operados y los de control (en ninguno era el amoniaco medio en plasma ni siquiera el doble que el del grupo de control). En un estudio de nuestro grupo con 24 ratas, 8 con DPC y 16 en dos grupos de control de 8 cada uno (control y simulación), los valores de amoniaco en plasma de las ratas operadas eran 4 a 5 veces más altos que en los animales de control (49). Como los detalles de la técnica quirúrgica, como la amplitud del estoma entre las venas porta y cava, suelen tener importancia a la hora de reproducir la hiperamonemia en el hígado (20,21), pensamos que quizá hubiera problemas en la técnica quirúrgica del estudio citado que llevaran a producir niveles bajos de amoniaco en las ratas, siendo este el responsable de la histología cerebral anómala.

DERIVACIÓN PORTOCAVA CON OTRAS MANIPULACIONES

La idea de reproducir los síntomas de la encefalopatía grave en las ratas (y a veces en perros) ha dado origen al diseño de distintas manipulaciones en los animales operados. Una maniobra potencialmente útil es la administración de resinas de amonio a las ratas con DPC, que aparentemente causan una encefalopatía reversible. El amonio administrado por otros medios (por ejemplo, i.v.) produce claramente un coma, aunque aún desconocemos lo que esto significa en el ser humano. Posiblemente, este coma se asocia a la inducción de edema cerebral, aunque no haya datos claros sobre este particular. Además, no hay datos que demuestren la reversibilidad del coma. Las ratas normales alimentadas con acetato de amonio desarrollan hiperamo-

nemia en grado parecido al de las ratas con DPC pero son resistentes a la administración puntual de amoniaco adicional, lo contrario de lo que ocurre con las ratas sometidas a DPC, como se explicó anteriormente (50).

La superposición de una hepatitis tóxica aguda por dime-til-nitrosamida en perros con DPC se ha visto que induce una EH grave (51). Otras formas de inducir la EH en animales con DPC son la extracción de sangre o la toma de grandes cantidades de proteína en la dieta, que resulta eficaz en los perros pero no en las ratas. La hepatectomía parcial también se ha usado en algunos casos en ratas con DPC, o la DPC en ratas con cirrosis inducida por tetracloruro de carbono, pero no se comunicaron las alteraciones conductuales.

Recientemente se han publicado diferentes trabajos en los que se empleó la ligadura biliar completa en ratas con DPC previa, induciendo una colestasis aguda o subaguda (11). Este modelo no se ha tipificado del todo y tiene la dificultad añadida de que provoca una gran pérdida de peso, probablemente causada por anorexia o malabsorción.

En resumen, sigue sin encontrarse el modelo animal ideal para la EH. La rata con derivación portocava sigue siendo el método de referencia para la EH en animales. Otros modelos más fáciles de ejecutar, como la ligadura del conducto biliar, podrían servir como complementarios. La utilidad de los métodos añadidos precisa ulteriores estudios. La derivación portocava en ratas con cirrosis inducida por CCL₄ podría ser interesante pero resulta extremadamente difícil y la mortalidad es mayor. La dieta con exceso de amoniaco o la insuficiencia hepática inducida con tiacetamida también podría tenerse en cuenta al desarrollar modelos combinados. La derivación portocava es un buen modelo de la encefalopatía hepática mínima y podría servir para el desarrollo de nuevos medicamentos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Mullen KD, McCullough AJ. Problems with animal models of chronic liver disease: suggestions for improvement in standardization. *Hepatology* 1989;9(3):500-3.
2. Ferenci P, Lockwood A, Mullen K, Tarter R, Weissenborn K, Blei AT. Hepatic encephalopathy -definition, nomenclature, diagnosis, and quantification: final report of the working party at the 11th World Congresses of Gastroenterology, Vienna, 1998. *Hepatology* 2002;35 (3):716-21.
3. Bengtsson F, Bugge M, Vagianos C, Jeppsson B, Nobin A. Brain serotonin metabolism and behavior in rats with carbon tetrachloride-induced liver cirrhosis. *Res Exp Med (Berl)* 1987;187(6):429-38.
4. Snodgrass PJ. Urea cycle enzyme activities are normal and inducible by a high-protein diet in CCl₄ cirrhosis of rats. *Hepatology* 1989;9 (3):373-9.
5. Kountouras J, Billing BH, Scheuer PJ. Prolonged bile duct obstruction: a new experimental model for cirrhosis in the rat. *Br J Exp Pathol* 1984;65 (3):305-11.
6. Dunn CW, Horton JW, Megison SM, Vuitch MF. Contribution of portal systemic shunt to Kupffer cell dysfunction in obstructive jaundice. *J Surg Res* 1991;50(3):234-9.
7. Greve JW, Gouma DJ, Soeters PB, Buurman WA. Suppression of cellular immunity in obstructive jaundice is caused by endotoxins: a study with germ-free rats. *Gastroenterology* 1990;98(2):478-85.
8. Rodrigo R, Jover R, Candela A, Compan A, Saez-Valero J, Erceg S, et al. Bile duct ligation plus hyperammonemia in rats reproduces the

- alterations in the modulation of soluble guanylate cyclase by nitric oxide in brain of cirrhotic patients. *Neuroscience* 2005;130(2):435-43.
9. Huang LT, Hsieh CS, Chou MH, Chuang JH, Liou CW, Tiao MM, et al. Obstructive jaundice in rats: cause of spatial memory deficits with recovery after biliary decompression. *World J Surg* 2004;28(3):283-7.
 10. Jover-Cobos M, Noiret L, Habtesion A, Balasubramaniyan V, Sharifi Y, Romero-Gómez M, et al. The mechanism behind synergistic action of L-Ornithine and Phenylacetate to reduce ammonia in Cirrhotic rats. *Hepatology* 2010;52(Supl.):893A.
 11. Maddison JE, Dodd PR, Morrison M, Johnston GA, Farrell GC. Plasma GABA, GABA-like activity and the brain GABA-benzodiazepine receptor complex in rats with chronic hepatic encephalopathy. *Hepatology* 1987;7(4):621-8.
 12. Cooper AJ, Lai JC. Cerebral ammonia metabolism in normal and hyperammonemic rats. *Neurochem Pathol* 1987;6(1-2):67-95.
 13. Bengtsson F, Nobin A, Falck B, Gage FH, Jeppsson B. Portacaval shunt in the rat: selective alterations in behavior and brain serotonin. *Pharmacol Biochem Behav* 1986;24(6):1611-6.
 14. Bengtsson F, Nobin A, Falck B, Gage FH, Jeppsson B. Effect of oral branched chain amino acids on behavior and brain serotonin metabolism in portacaval shunted rats. *World J Surg* 1988;12(2):246-54.
 15. Bengtsson F, Bugge M, Brun A, Falck B, Henriksson KG, Nobin A. The impact of time after portacaval shunt in the rat on behavior, brain serotonin, and brain and muscle histology. *J Neurol Sci* 1988;83(1):109-22.
 16. Tricklebank MD, Smart JL, Bloxam DL, Curzon G. Effects of chronic experimental liver dysfunction and L-tryptophan on behaviour in the rat. *Pharmacol Biochem Behav* 1978;9(2):181-9.
 17. Herz R, Sautter V, Robert F, Bircher J. The Eck fistula rat: definition of an experimental model. *Eur J Clin Invest* 1972;2(6):390-7.
 18. Conjeevaram HS, Nagle A, Katz A, Kaminsky-Russ K, McCullough AJ, Mullen KD. Reversal of behavioral changes in rats subjected to portacaval shunt with oral neomycin therapy. *Hepatology* 1994;19(5):1245-50.
 19. Coy DL, Mehta R, Zee P, Salchli F, Turek FW, Blei AT. Portal-systemic shunting and the disruption of circadian locomotor activity in the rat. *Gastroenterology* 1992;103(1):222-8.
 20. Coy DL, Srivastava A, Gottstein J, Butterworth RF, Blei AT. Postoperative course after portacaval anastomosis in rats is determined by the portacaval pressure gradient. *Am J Physiol* 1991;261(6 Pt 1):G1072-G1078.
 21. Jerkins AA, Steele RD. Diet composition and surgical technique influence the postoperative recovery of portacaval shunted rats. *Hepatology* 1988;8(4):855-60.
 22. Lee SH, Fisher B. Portacaval shunt in the rat. *Surgery* 1961;50:668-72.
 23. Bismuth H, Benhamou JP, Lataste J. Experimental portacaval anastomosis in the normal rat. *Technic and preliminary results. Presse Med* 1963;71:1859-61.
 24. Funovics JM, Cummings MG, Shuman L, James JH, Fischer JE. An improved nonsuture method for portacaval anastomosis in the rat. *Surgery* 1975;77(5):661-4.
 25. Numata M. A modified technique to make a portacaval shunt in rats. *Microsurgery* 1983;4(4):243-4.
 26. Rigotti P, Jonung T, James JH, Edwards LL, Peters JC, Fischer JE. Infusion of branched-chain amino acids and ammonium salts in rats with portacaval shunts. *Arch Surg* 1985;120(11):1290-5.
 27. Mullen KD, Birgisson S, Gacad RC, Conjeevaram H. Animals models of hepatic encephalopathy and hyperammonemia. In: Felipo V, Grisolia S, editors. *Hepatic encephalopathy, hyperammonemia and ammonia toxicity*. New York: Plenum Press; 1994. p. 1-10.
 28. 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. *J Hepatol* 1987;4(1):118-26.
 29. Bosman DK, van den Buijs CA, de Haan JG, Maas MA, Chamuleau RA. The effects of benzodiazepine-receptor antagonists and partial inverse agonists on acute hepatic encephalopathy in the rat. *Gastroenterology* 1991;101(3):772-81.
 30. Jover R, Madaria E, Felipo V, Rodrigo R, Candela A, Compan A. Animal models in the study of episodic hepatic encephalopathy in cirrhosis. *Metab Brain Dis* 2005;20(4):399-408.
 31. Gandhi CR, Murase N, Subbotin VM, Uemura T, Nalesnik M, Demetris AJ, et al. Portacaval shunt causes apoptosis and liver atrophy in rats despite increases in endogenous levels of major hepatic growth factors. *J Hepatol* 2002;37(3):340-8.
 32. Hahn M, Massen O, Nenecki M, Pavlov J. Die Eck sche fistel zwischen der unteren Hohlvene und der Pfortader und ihre Folgen fur den Organismus. *Arch Exp Pathol Pharm* 1893;32:161-210.
 33. Oudea P, Bismuth H. Experimental portacaval anastomosis in normal rats. Study of hepatic lesions by means of electron microscope. *Pathol Biol (Paris)* 1965;13:288-96.
 34. Terlunen E, Altenahr E, Becker K, Ossenberg FW. Liver atrophy following portacaval shunt in normal rats - a morphometric study-. *Res Exp Med (Berl)* 1977;170(2):133-42.
 35. Bioulac P, Dubuisson L, Saric J, Despuyos L, Bedin C, Magne F, et al. Chronic biliary drainage corrects liver atrophy induced by portacaval shunt in the rat. *Gastroenterology* 1981;80(5 pt 1):1023-30.
 36. Miyagawa S, Makuuchi M, Kawasaki S, Kakazu T. Criteria for safe hepatic resection. *Am J Surg* 1995;69(6):589-94.
 37. Castaing D, Bismuth H. Portacaval anastomosis in the rat: 20 years of experimental models. *Gastroenterol Clin Biol* 1984;8(5):469-79.
 38. Castaing D, Beaubernard C, Ariogul O, Gigou M, Franco D, Bismuth H. Liver atrophy and encephalopathy after portacaval shunt in the rat. *Eur Surg Res* 1982;14(3):192-202.
 39. Starzl TE, Francavilla A, Halgrimson CG, Francavilla FR, Porter KA, Brown TH, et al. The origin, hormonal nature, and action of hepatotrophic substances in portal venous blood. *Surg Gynecol Obstet* 1973;137(2):179-99.
 40. Bircher J. The rat with portacaval shunt: an animal model with chronic hepatic failure. *Pharmacol Ther [B]* 1979;5(1-3):219-22.
 41. Von Hosselin C, Alzheimer A. Ein Beitrag zur klinik und pathologischen anatomie der Westphal- Strumpellschem pseudosklerose. *Z Neurol Psychiat* 1912;8:183-209.
 42. Butterworth RF, Giguere JF, Michaud J, Lavoie J, Layrargues GP. Ammonia: key factor in the pathogenesis of hepatic encephalopathy. *Neurochem Pathol* 1987;6(1-2):1-12.
 43. Adams RD, Foley JM. The neurological disorder associated with liver disease. *Res Publ Assoc Nerv Ment Dis* 1953;32:198.
 44. Pilbeam CM, Anderson RM, Bhathal PS. The brain in experimental portal-systemic encephalopathy. I. Morphological changes in three animal models. *J Pathol* 1983;140(4):331-45.
 45. Cavanagh JB, Kyu MH. Colchicine-like effect on astrocytes after portacaval shunt in rats. *Lancet* 1969;2(7621):620-2.
 46. Cavanagh JB, Kyu MH. On the mechanism of type I Alzheimer abnormality in the nuclei of astrocytes. An essay in quantitative histology. *J Neurol Sci* 1971;12(3):241-61.
 47. Cavanagh JB, Lewis PD, Blakemore WF, Kyu MH. Changes in the cerebellar cortex in rats after portocaval anastomosis. *J Neurol Sci* 1972;15(1):13-26.
 48. Kyu MH, Cavanagh JB. Some effects of porto-caval anastomosis in the male rat. *Br J Exp Pathol* 1970;51(2):217-27.
 49. Romero-Gomez M, Jover M, Diaz-Gomez D, de Teran LC, Rodrigo R, Camacho I, et al. Phosphate-activated glutaminase activity is enhanced in brain, intestine and kidneys of rats following portacaval anastomosis. *World J Gastroenterol* 2006;12(15):2406-2411.
 50. Azorin I, Minana MD, Felipo V, Grisolia S. A simple animal model of hyperammonemia. *Hepatology* 1989;10(3):311-4.
 51. Zeneroli ML, Baraldi M, Ventura E, Vezzelli C, Tofanetti O, Germini M, et al. Alterations of GABA-A and dopamine D-2 brain receptors in dogs with portal-systemic encephalopathy. *Life Sci* 1991;48(1):37-50.