

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA
AGRONÒMICA I DEL MEDI NATURAL

Progresión de la neuroinflamación en hiperamonemia y Encefalopatía hepática



PRINCIPE FELIPE
CENTRO DE INVESTIGACION



Trabajo final de grado en Biotecnología

ALUMNO: Antón Prieto, Paula
TUTORES: Dra. Marta Llansola y Tiziano Balzano
TUTOR ACADÉMICO: José Salvador Vicente Antón
CURSO ACADÉMICO: 2015/2016
Valencia, Mayo 2016



ALUMNO: Antón Prieto, Paula.

TUTORES: Dra. Marta Llansola y Tiziano Balzano

TUTOR ACADÉMICO: Vicente Antón, José Salvador.

LOCALIDAD Y FECHA: Valencia, Mayo 2016.

TÍTULO: Progresión de la neuroinflamación en hiperamonemia y Encefalopatía hepática.

RESUMEN

La encefalopatía hepática (EH) es un síndrome neuropsiquiátrico caracterizado por una serie de alteraciones neurológicas como consecuencia de una detoxificación inadecuada en el hígado. Una de las sustancias que no se detoxifica en los pacientes cirróticos es el amonio. La hipótesis más aceptada sobre las bases moleculares de la EH apunta a la sinergia entre hiperamonemia y neuroinflamación. La hiperamonemia por sí sola induce neuroinflamación. Estudios recientes demuestran que la neuroinflamación está implicada en las alteraciones motoras y cognitivas en EH. En este trabajo hemos utilizado un modelo animal de hiperamonemia crónica sin fallo hepático, que consiste en alimentar las ratas con una dieta rica en amonio, añadiendo acetato amónico al 30% p/p a su comida normal. El objetivo fue caracterizar la progresión de la neuroinflamación en el tiempo (3 días, 2, 4 y 8 semanas de hiperamonemia) en ratas hiperamonémicas, así como el papel de la inflamación periférica y de su progresión con el tiempo de hiperamonemia. Para ello se ha analizado la activación de microglía y astrocitos (células del sistema inmune en el cerebro) y la expresión de algunas citocinas en hipocampo y cerebelo, mediante inmunohistoquímica. También se han analizado los niveles de algunas citocinas en plasma a diferentes tiempos (1, 2, 3-4, 5-6 y 8 semanas de hiperamonemia). Tanto en cerebelo como en hipocampo hay activación de microglía y astrocitos y está aumentada la expresión de las interleucinas (IL) pro-inflamatorias IL-1 β y TNF- α , a partir de las 2 semanas de hiperamonemia. Sin embargo, el patrón temporal en cada área cerebral es diferente. En cerebelo, solo 3 días después de empezar la dieta se produce activación de astrocitos. A las 8 semanas de hiperamonemia, los marcadores de neuroinflamación ya no son diferentes que en las ratas control, excepto porque está aumentada la expresión de IL-1 β . La hiperamonemia crónica produce alteraciones de los niveles plasmáticos de ILs, tanto inflamatorias como anti-inflamatorias, y estos cambios evolucionan con el tiempo de hiperamonemia. En conclusión, la neuroinflamación progresa con el tiempo de hiperamonemia crónica, de manera diferente en cerebelo e hipocampo y la progresión de la inflamación periférica debe contribuir a la progresión de la neuroinflamación.

PALABRAS CLAVE: Encefalopatía hepática, hiperamonemia, neuroinflamación, glía activada, interleucinas, cerebelo e hipocampo.

STUDENT: Antón Prieto, Paula

TUTOR: Dra. Marta Llansola y Tiziano Balzano

PROFESSORS: Vicente Antón, José Salvador

DATE: Valencia, May 2016.

TITLE: Progression of neuroinflammation in hyperammonemia and Hepatic encephalopathy.

ABSTRACT

Hepatic encephalopathy (HE) is a neuropsychiatric syndrome characterized by a number of neurological disorders resulting from inadequate detoxification in the liver. One of the substances that are not detoxified in cirrhotic patients is ammonium. The most widely accepted hypothesis on the molecular basis of HE points to the synergy between hyperammonemia and neuroinflammation. Hyperammonemia induces *per se* neuroinflammation. Recent studies show that neuroinflammation is involved in motor and cognitive disturbances in HE. In this work we have used an animal model of chronic hyperammonemia without liver failure, which consists of feeding rats with a diet rich in ammonia, by adding 30% w/w ammonium acetate to normal food. The objective was to characterize the progression of neuroinflammation along time of hyperammonemia (3 days, 2, 4 and 8 weeks) in hyperammonemic rats, and the role of peripheral inflammation and their progression over time of hyperammonemia. To do this we analyzed, by immunohistochemistry, the activation microglia and astrocytes (immune cells in the brain) and the expression of some cytokines in cerebellum and hippocampus. We have also analyzed the levels of some cytokines in plasma at different times (1, 2, 3-4, 5-6 and 8 weeks of hyperammonemia). Both in the cerebellum and hippocampus there is microglia and astrocytes activation and the level of pro-inflammatory interleukins (IL) IL-1 β and TNF- α are increased from 2 weeks of hyperammonemia. However, the time pattern in each brain area is different. In cerebellum, only 3 days after hyperammonemia astrocyte activation occurs. At 8 weeks of hyperammonemia, inflammatory markers are no longer different than in control rats except increased expression of IL-1 β . Chronic hyperammonemia alters plasma levels of both inflammatory and anti-inflammatory ILs and these changes evolve over time of hyperammonemia. In conclusion, neuroinflammation progresses over time of chronic hyperammonemia differently in cerebellum and hippocampus and progression of peripheral inflammation should contribute to the progression of neuroinflammation.

KEY WORDS: Hepatic encephalopathy, hyperammonemia, neuroinflammation, glial activation, interleukins, cerebellum and hippocampus.

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría agradecer este trabajo, sobretodo, a las dos personas que han estado conmigo en el laboratorio durante este tiempo, a Marta y a Tiziano, porque no solo ha sido un trabajo mío, sino también de su esfuerzo.

No me olvido ni mucho menos de mis padres, a quien les debo todo lo que he conseguido hasta ahora y gracias a ello estoy ahora donde estoy, a punto de comenzar mi carrera profesional.

Además, a todo el personal del laboratorio, que de una manera u otra, habéis contribuido a que las horas de cuantificación fueran un poco más llevaderas y me habéis dado la oportunidad de trabajar con vosotros.

INDICE

| | |
|---|-----------|
| 1. INTRODUCCIÓN..... | 1 |
| 1.1. Encefalopatía hepática | 1 |
| 1.2. Principales factores que contribuyen a la EH..... | 2 |
| 1.3. Neuroinflamación | 4 |
| 1.3.1. Células gliales en neuroinflamación | 5 |
| 1.3.1.1. Microglía..... | 5 |
| 1.3.1.2. Astrocitos..... | 7 |
| 1.4. Estado actual y terapias emergentes | 8 |
| 2. OBJETIVOS | 9 |
| 3. MATERIALES Y MÉTODOS..... | 10 |
| 3.1. Animales..... | 10 |
| 3.1.1. Modelo animal de hiperamonemia sin fallo hepático | 10 |
| 3.1.2. Curso temporal del experimento | 10 |
| 3.2. Análisis de inflamación periférica y neuroinflamación..... | 11 |
| 3.2.1. Obtención de plasma..... | 11 |
| 3.2.2. Determinación de amonio en sangre..... | 11 |
| 3.2.3. Western Blot..... | 11 |
| 3.2.4. Inmunohistoquímica | 12 |
| 3.3. Cuantificación | 13 |
| 3.4. Análisis estadístico..... | 14 |
| 4. RESULTADOS | 15 |
| 4.1. Hipocampo..... | 15 |
| 4.1.1. La microglía está activada en el hipocampo de ratas con hiperamonemia crónica a las 2 y 4 semanas..... | 15 |
| 4.1.2. El contenido de GFAP en el hipocampo está aumentado en hiperamonemia crónica tras 4 semanas..... | 16 |
| 4.1.3. La expresión de TNF- α aumenta en el hipocampo a las 2 semanas de hiperamonemia..... | 18 |
| 4.1.4. La expresión de IL-1 β aumenta en el hipocampo de las ratas con hiperamonemia crónica a 8 semanas..... | 20 |

| | |
|---|-----------|
| 4.2. Cerebelo | 22 |
| 4.2.1. La microglía está activada en el cerebelo de ratas a las 2 semanas de hiperamonemia | 22 |
| 4.2.2. El contenido de GFAP en el cerebelo está aumentado en hiperamonemia crónica..... | 23 |
| 4.2.3. El contenido de TNF- α en el cerebelo está aumentado a las 4 semanas de hiperamonemia..... | 24 |
| 4.2.4. El contenido de IL-1 β en el cerebelo aumenta ligeramente en hiperamonemia crónica a 4 y 8 semanas..... | 26 |
| 4.3. Inflamación periférica | 27 |
| 4.3.1. Los niveles de IL-6 en plasma varían con el tiempo de hiperamonemia en ratas con hiperamonemia crónica..... | 27 |
| 4.3.2. Los niveles de IL-10 en plasma están disminuidos en ratas con hiperamonemia crónica..... | 28 |
| 4.3.3. Los niveles de IL-4 en plasma están disminuidos en ratas con hiperamonemia crónica a 1-2 semanas de hiperamonemia..... | 28 |
| 5. DISCUSIÓN DE RESULTADOS | 29 |
| 5.1. Activación de microglía y astrocitos..... | 29 |
| 5.2. Expresión de citocinas..... | 31 |
| 5.3. Papel de la inflamación periférica..... | 34 |
| 6. CONCLUSIONES..... | 36 |
| 7. BIBLIOGRAFÍA..... | 37 |

INDICE DE TABLAS

| | |
|---|----|
| Tabla 1. Marcadores fenotípicos de los estados de activación de la microglía..... | 7 |
| Tabla 2. Anticuerpos primarios y secundarios utilizados con su correspondiente dilución | 12 |

INDICE DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Hiperamonemia y neuroinflamación actúan sinérgicamente para inducir alteraciones neurológicas en fallo hepático crónico..... | 4 |
| Figura 2. Imagen obtenida del programa ImageJ | 14 |
| Figura 3. Expresión de Iba1 en hipocampo..... | 16 |
| Figura 4. Expresión de GFAP en hipocampo..... | 17 |
| Figura 5. Expresión de TNF- α en CA1..... | 19 |
| Figura 6. Expresión de TNF- α en Giro Dentado..... | 20 |
| Figura 7. Expresión de IL-1 β en CA1..... | 21 |
| Figura 8. Expresión de Iba1 en cerebelo..... | 23 |
| Figura 9. Expresión de GFAP en cerebelo..... | 24 |
| Figura 10. Expresión de TNF- α en cerebelo..... | 25 |
| Figura 11. Expresión de IL-1 β en cerebelo..... | 26 |
| Figura 12. Contenido de IL-6 en plasma..... | 27 |
| Figura 13. Contenido de IL-10 en plasma..... | 28 |
| Figura 14. Contenido de IL-4 en plasma..... | 29 |

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

| | |
|---------------|--|
| ALF | Insuficiencia Hepática Aguda |
| EH | Encefalopatía Hepática |
| EHM | Encefalopatía Hepática Mínima |
| PHES | Psychometric Hepatic Encephalopathy Score |
| TNF- α | Factor de Necrosis Tumoral Alfa |
| IL | Interleucina |
| IFN γ | Interferón Gamma |
| AINE | Anti-Inflamatorio No Esteroideo |
| SNC | Sistema Nervioso Central |
| Iba | Ionized calcium- binding |
| TGF- β | Factor de Crecimiento Tumoral Beta |
| VEGF | Factor de Crecimiento Endotelial Vascular |
| BDNF | Factor Neurotrófico Derivado del Cerebro |
| PDGF | Factor de Crecimiento Derivado de las Plaquetas |
| GFAP | Proteína Ácida Fibrilar Glial |
| EDTA | Ácido Etilendiaminotetraacético |
| SDS | Dodecilsulfato de Sodio |
| Tris | Tris(hidroximetil)aminometano |
| PVDF | Polifluoruro de Vinilideno |
| BSA | Albúmina de Suero Bovino |
| TBS | Tampón Salino Tris |
| f.a. | fosfatasa alcalina |
| NBT | Tetrazolium, (3,3'-dimethoxy-4,4'-biphenylene) bis [2,(4-nitrophenyl)-5-phenyl-2H] |
| BCIP | 1H-Indol-3-ol, 5-bromo-4-chloro-dihydrogen phosphate |
| PFA | Paraformaldehído |
| PB | Tampón Fosfato |
| HRP | Horseradish Peroxidase |
| DAB | Diaminobenzidina |
| ANOVA | Análisis de la Varianza |
| SEM | Error Estándar de las Medias |
| HA | Hiperamonemia |
| C | Control |
| u.a. | unidades arbitrarias |
| GD | Giro Dentado |

1. INTRODUCCIÓN

1.1. ENCEFALOPATÍA HEPÁTICA

El hígado es el principal órgano encargado de la detoxificación de muchos compuestos tanto endógenos como exógenos. En su funcionamiento normal, es capaz de regular la concentración de dichas sustancias. Sin embargo, cuando el hígado falla (debido a una Insuficiencia Hepática Aguda (ALF), hepatitis crónica o cirrosis) dicho proceso no se produce correctamente y los compuestos tóxicos pueden llegar al cerebro y afectar a las funciones cerebrales. Uno de los compuestos que se acumula al no detoxificarse correctamente es el amonio, que es eliminado al ser incorporado en el ciclo de la urea en el hígado sano. Los pacientes que sufren una enfermedad hepática crónica presentan también inflamación crónica. Este estado de fallo hepático daña la función cerebral dando como resultado diversos síntomas que, en su conjunto, reciben el nombre de Encefalopatía Hepática (EH) (Revisión en Felipo, 2013).

Se distinguen dos tipos de EH: EH Mínima (EHM) y EH clínica. La EHM, disminuye la calidad de vida de los pacientes (Slowik et al, 2001) pero los síntomas no son evidentes y no pueden ser detectados por exámenes rutinarios físicos o neurológicos, requiriéndose una batería de tests neuropsicológicos y neurofisiológicos de referencia para poder llevar a cabo su diagnóstico: los tests psicométricos PHES (Psychometric Hepatic Encephalopathy Score) (Weissenborn et al, 2001). En la EH clínica, los síntomas sí son evidentes, con complicaciones neurológicas que pueden desencadenar el coma y la muerte. A su vez, la EH clínica se puede dividir en dos subtipos: (1) EH aguda, debida a un fallo hepático agudo y caracterizado por una rápida progresión de los síntomas. Entre las causas cabe destacar las hepatitis virales agudas, intoxicación por paracetamol y reacciones a fármacos; (2) EH crónica, debida a un fallo hepático crónico asociado a cirrosis o hepatitis. Para monitorizar el avance de la EH clínica y los efectos del tratamiento, las manifestaciones neurológicas se clasifican en cuatro diferentes grados usando la escala West Haven (Felipo, 2013).

Los pacientes con EHM tienen predisposición a sufrir la forma clínica de la enfermedad y una reducción de la esperanza de vida. La EHM tiene importantes consecuencias en la vida diaria de los pacientes con enfermedad hepática crónica. Los pacientes con EHM tienen problemas de atención, alteraciones del sueño y de la coordinación motora, que les predisponen a sufrir más accidentes domésticos, laborales o de tráfico. La EHM es un serio problema de salud, social y económico. Es por ello que el diagnóstico temprano y el tratamiento de la EHM mejorarían la calidad de vida y la supervivencia de los pacientes (Montoliu et al, 2015). Sin embargo, la mayoría de los pacientes siguen sin diagnosticar y sin tratar debido a la falta de procedimientos simples de diagnóstico.

Para avanzar en el estudio de la enfermedad sin la necesidad de recurrir a pacientes es necesario utilizar un modelo animal. Los modelos animales de EH tienen limitaciones y no reproducen exactamente las alteraciones presentes en pacientes, pero aun así son útiles y necesarios para el avance en el conocimiento de los mecanismos que intervienen en dicha enfermedad, con el principal objetivo de identificar nuevas dianas terapéuticas y comprobar los efectos de los nuevos tratamientos (Felipo, 2015). También son necesarios para buscar marcadores tempranos que ayuden a conseguir un diagnóstico temprano, pudiendo así frenar el avance de la EH crónica.

1.2. PRINCIPALES FACTORES QUE CONTRIBUYEN A LA EH

Para conseguir tratamientos efectivos para la EH es necesario conocer los factores responsables y los mecanismos por los que se producen las alteraciones neurológicas. Los dos principales factores que contribuyen a estas alteraciones son la hiperamonemia y la inflamación.

Existen evidencias, tanto experimentales como clínicas, que apuntan a la hiperamonemia como un factor responsable de algunas de las alteraciones neurológicas presentes en la EH (Felipo y Butterworth, 2002). En el cerebro, el amonio es detoxificado a través de su incorporación en glutamina por la enzima glutamina sintetasa, presente solo en astrocitos. Sin embargo, situaciones de hiperamonemia en sangre implican elevados niveles de amonio en cerebro, ya que se excede la capacidad de detoxificación del amonio por la glutamina sintetasa y además aumentan los niveles de glutamina en cerebro, lo que también puede ocasionar alteraciones en la función cerebral. La hiperamonemia en cerebro está asociada a alteraciones cognitivas y motoras (Aguilar et al, 2000; Rodrigo et al, 2010; Hernández-Rabaza et al, 2016a y b).

La inflamación es la reacción inmunológica que se desencadena en nuestro organismo como respuesta a agentes patógenos o a agresiones externas. En este proceso están implicados diferentes mecanismos con el objetivo de aislar al agente dañino y destruirlo. Además, participan diferentes tipos celulares, como macrófagos, linfocitos y factores inflamatorios que participan en la comunicación intercelular, como citocinas y factores de crecimiento que amplifican la respuesta inmune del proceso inflamatorio.

En la inflamación participan mediadores tanto pro-inflamatorios como anti-inflamatorios. Éstos últimos frenan la respuesta inflamatoria, inhibiendo la liberación de más factores pro-inflamatorios. Las principales citocinas pro-inflamatorias que participan en la respuesta inflamatoria son el Factor de Necrosis Tumoral α (TNF- α), y diferentes Interleucinas (ILs) como

IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12, IL-16, IL-17 e IL-18. Dentro del grupo de las citocinas anti-inflamatorias se encuentran la IL-4, la IL-10 y el Interferón Gamma (IFN- γ) (Feldmann, 2001).

La inflamación actúa sinérgicamente con la hiperamonemia en el desarrollo de la EH, produciendo deterioro cognitivo y motor. Montoliu et al (2009) demostraron que las interleucinas pro-inflamatorias IL-6 y IL-18 estaban aumentadas en pacientes cirróticos con EHM comparados con pacientes cirróticos sin EHM. Hay una correlación positiva entre los niveles séricos de estas interleucinas y el grado de EHM evaluado con los tests psicométricos.

Tanto la hiperamonemia como la inflamación producen neuroinflamación, la cual contribuye directamente a la alteración de las funciones cerebrales y al deterioro cognitivo y motor en EH. Los principales mecanismos por los que la hiperamonemia y el fallo hepático podrían inducir neuroinflamación son:

- a) Infiltración de células sanguíneas en cerebro.
- b) Activación de la microglía directamente por los niveles altos de amonio en cerebro. Datos en cultivos primarios de microglía indican que el amonio, a altas concentraciones, puede inducir cierto grado de activación de la microglía (Zemtsova et al, 2011). In vivo, no se sabe si el aumento más moderado de los niveles de amonio en el cerebro es capaz de inducir directamente la activación de la microglía y con ello neuroinflamación.
- c) A través de efectos periféricos que se transducen al cerebro:
 - Las citocinas de la sangre pueden estimular receptores en células endoteliales y disparar de este modo la liberación de factores inflamatorios en el cerebro.
 - Transferencia de citocinas pro-inflamatorias de la sangre al cerebro en las regiones cerebrales donde que la barrera hematoencefálica es más permeable.

Por ejemplo, el TNF- α , el cual activa receptores en células endoteliales del cerebro y puede así inducir neuroinflamación. TNF- α está implicado en la inducción de otras citocinas y factores inflamatorios, acelerando así la atracción de más tipos celulares al lugar de la infección para aislar y destruir el agente dañino (Doukas et al, 1990; Schrode et al, 1990). El tratamiento periférico con anti-TNF- α (Infliximab) consigue mejorar el deterioro cognitivo presente en algunas enfermedades inflamatorias crónicas (Raftery et al, 2012). Esto sugiere que la inflamación periférica se puede transducir al cerebro y producir neuroinflamación a través de la activación de receptores de citocinas.

Datos preliminares sugieren que la transducción de la inflamación periférica al cerebro sería el mecanismo más probable por el cual la hiperamonemia y el fallo hepático inducen neuroinflamación. La activación de la microglía se produce principalmente alrededor de los

vasos sanguíneos, sugiriendo que factores de la sangre están induciendo esta reacción inflamatoria en cerebro.

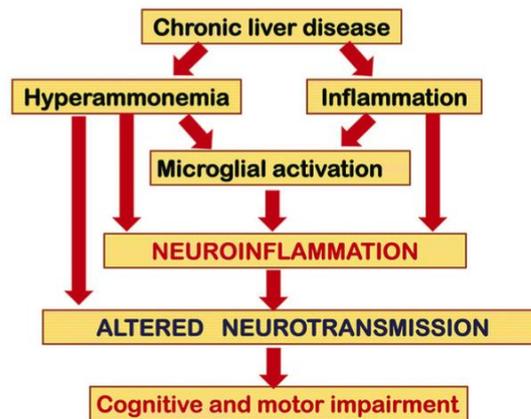


Figura 1. Hiperamonemia y neuroinflamación actúan sinérgicamente para inducir alteraciones neurológicas en fallo hepático crónico. El fallo hepático crónico induce tanto hiperamonemia como inflamación periférica, provocando la activación de la microglía y neuroinflamación, la cual altera la neurotransmisión, provocando deficiencias cognitivas y motoras. *Figura tomada de Montoliu et al, 2015.*

En modelos animales, la hiperamonemia crónica sin fallo hepático por sí sola induce neuroinflamación. El tratamiento de las ratas hiperamonémicas con un Anti-inflamatorio No Esteriodeo (AINE), el ibuprofeno, disminuye la activación de la microglía y la neuroinflamación y restaura la capacidad de aprendizaje y la actividad motora (Rodrigo et al, 2010). En humanos, estudios sobre neuroinflamación en EH crónica se han iniciado recientemente, por lo que todavía existen pocos datos sobre este proceso.

1.3. NEUROINFLAMACIÓN

El mantenimiento de la función cerebral es esencial para su supervivencia y por ello, el Sistema Nervioso Central (SNC) está separado de la sangre por la barrera hematoencefálica, impidiendo el acceso libre de las citocinas y agentes externos al cerebro. Sin embargo, para que se produzca una respuesta en los procesos inflamatorios, el sistema inmune transmite señales al cerebro. Las células que forman parte del sistema inmune en el cerebro son sobre todo células gliales, la microglía principalmente y también la astrogía (Bentivoglio et al, 2010).

1.3.1. Células gliales en neuroinflamación

1.3.1.1. Microglía

La microglía son los macrófagos residentes en el SNC y representan el principal tipo celular del sistema inmune innato (Bentivoglio et al, 2010). Son un tipo celular que tiene dos funciones. Por un lado, tienen una función defensiva frente al daño producido por un agente dañino exógeno; por otro lado, tienen una función reparadora frente al daño producido por el propio organismo. Ante estos estímulos, la microglía responde rápidamente secretando citocinas o potenciando su capacidad fagocítica. La microglía responde de diferentes modos según el entorno en que se encuentre y según el área cerebral (Aloisi, 2001).

Morfología de la microglía.

La microglía se puede encontrar en 2 estados:

- Microglía en reposo. En condiciones de reposo la microglía posee una morfología con muchas ramificaciones largas y un soma pequeño. Se trata de microglía inactiva.
- Microglía reactiva. La microglía adopta una morfología ameboide que se caracteriza por un soma grande con pocas ramificaciones y cortas. La principal función de la microglía cuando se encuentra en este estado es la fagocitosis de células muertas tras un proceso de apoptosis (Nakajima et al, 2001). El daño cerebral debido a una infección u otros factores, hace que la microglía se active, prolifere en la zona afectada y aumente la expresión de marcadores de superficie y receptores. Además, dicha activación implica cambios en su morfología, adoptando esta forma ameboide o reactiva. La microglía activada secreta péptidos de señalización como citocinas y quimiocinas, provocando la activación de astrocitos vecinos (Vallejo et al, 2010).

La microglía tiene funciones fisiológicas pero también es responsable de efectos patofisiológicos en muchas patologías del sistema nervioso. La microglía responde ante una agresión ejerciendo un papel citotóxico. Este proceso implica la activación de mecanismos de fagocitosis y la activación de genes del sistema inmune (Medzhitov y Janeway, 2000). Éste es un efecto transitorio y beneficioso. Sin embargo, el efecto perjudicial se produce cuando la activación de la microglía se mantiene en el tiempo, dando lugar así a una neuroinflamación crónica. La neuroinflamación crónica juega un papel muy importante en distintas enfermedades neurodegenerativas, como son la esclerosis lateral amiotrófica, la esclerosis múltiple, la enfermedad de Alzheimer (McGeer et al, 2010), Parkinson (Gao et al, 2011) y otras patologías con deterioro cognitivo como la EH (Cauli et al, 2007; Rodrigo et al, 2010).

Iba-1 (Ionized calcium binding adaptor molecule-1) es un receptor de microglía que se expresa en su superficie en condiciones de inflamación. Es un marcador específico de microglía (Imai et al, 1996; Ji et al, 2007), pues no se expresa en neuronas, astrocitos u oligodendrocitos

(Imai et al, 2002). Iba-1 está implicado en la organización de la actina en el citoesqueleto (Imai et al, 2002) y también participa en la fagocitosis (Ohsawa et al, 2000; Ito et al, 2001). Por tanto Iba-1 es un marcador específico para la identificación de la microglía. (Imai et al, 1996; Ito et al, 2001; Imai et al, 2002; Hirasawa et al, 2005).

La función de la microglía y sus características inmunofenotípicas son muy sensibles a los cambios que suceden en su entorno. Se modulan por una gran variedad de señales producidas sistemáticamente en el lugar de la infección. En respuesta a estas señales, la microglía adquiere diversos fenotipos, según los cuales participa en la respuesta citotóxica, en la regulación inmune y después vuelve al estado original. Se distinguen cuatro fenotipos: M0 o fenotipo inactivado; M1 o estado activado con actividad–citotóxica; M2a, implicado en la reparación y regeneración; M2b con actividad inmunoreguladora y M2c o fenotipo desactivado (Chhor et al, 2013).

En presencia de un daño neuronal o enfermedad, la microglía pasa del estado de reposo, M0, a un estado activado. Los factores que activan el fenotipo M1, como el TNF- α , inducen la síntesis por parte de la microglía de interleucinas pro-inflamatorias, metabolitos oxidativos y proteasas. Dichos factores constituyen un mecanismo de defensa frente a microbios. El fenotipo M2 resulta de una activación de la microglía en presencia de citocinas anti-inflamatorias, como son la IL-4, IL-10, IL-13 y el Factor de Crecimiento Tumoral beta (TGF- β). Este fenotipo produce una gran variedad de factores de crecimiento, como son el Factor de Crecimiento Endotelial Vascular (VEGF), Factor Neurotrópico Derivado del Cerebro (BDNF) y Factor de Crecimiento Derivado de las Plaquetas (PDGF), importantes en el proceso de angiogénesis, maduración de los oligodendrocitos, crecimiento axonal, y la reparación de la remielinización (Ghosh et al, 2016).

Tabla 1. Marcadores fenotípicos de los estados de activación de la microglía.

| | Proposed role in inflammation | | |
|---|-------------------------------|---|--|
| | Inflammotoxic | Pro-inflammatory | Anti-inflammatory |
| M1 classic phenotype (cytotoxic) | → TNF α iNOS | → IL-1 β IL-6 IL-12 IFN γ CXCL1 (KC) IL-1 α IL-2 CCL5 (RANTES) | Cox-2 |
| M2a alternate phenotype (repair and regeneration) | | | → IL-4 IL-1RA (IL-1Rn) CX3CR1 (fractalkine receptor) TGF- β |
| M2b (c) Type II-deactivating phenotype (immunomodulatory) | | | → IL-10 Cox-2 SphK1/2 SOCS3 IL-4R α |

→ Factores estudiados en el presente trabajo. *Tabla obtenida de Ghosh et al, 2016*

La capacidad de poder identificar el estado de activación de la microglía puede ser clave para desarrollar una terapia. Hasta ahora se pensaba que el fenotipo M1 citotóxico se desarrolla después de una lesión y que el cambio a M2 se da más tarde en el tiempo. Sin embargo, la presencia temprana de M2a (incluso antes de M1) ha sido observada después de un daño hipóxico/isquémico in vivo. Todo apunta a que los marcadores de M2 aumentan el primer día después de la infección y persisten hasta 7 días, solapando con el aumento de los marcadores de M1. También se ha demostrado que una previa activación de la microglía ante un daño afecta a la respuesta de ésta ante un segundo estímulo (Ghosh et al, 2016).

1.3.1.2. Astrocitos

Los astrocitos son células gliales que rodean los capilares del SNC, formando una barrera para la entrada en el cerebro de sustancias tóxicas. Una de sus funciones más importantes es la de mantener un microentorno adecuado para la función de las neuronas (Chung et al, 2010). Un marcador específico de los filamentos intermedios que constituyen los astrocitos es GFAP (Proteína Ácida Fibrilar Glial) (Sevan et al, 2010). Al igual que la microglía, participan en la respuesta inmune del SNC frente a agresiones y cuando se activan, secretan citocinas y otros factores inflamatorios implicados en la respuesta inmune y comunicación intercelular (Farina et al, 2007). Dicho proceso de activación implica cambios en su morfología, que se producen de una forma gradual (Sofroniew y Vinters. 2010).

1.4. ESTADO ACTUAL Y TERAPIAS EMERGENTES

La investigación llevada a cabo en la última década ha dado como resultado nuevos enfoques para el tratamiento de la EH y también para el diagnóstico temprano de la EHM.

Como tratamiento para la EH crónica, tradicionalmente se ha intentado reducir los niveles de amonio reduciendo la cantidad de proteínas ingeridas en la dieta así como también la administración de un disacárido no absorbible, como es la lactulosa, la cual acidifica el lumen intestinal y reduce el transporte de amonio al torrente sanguíneo. Otra opción es también el uso de antibióticos, como la Rifaximina, que inhibe el RNA bacteriano y la síntesis de proteínas. Estudios recientes han demostrado que es el antibiótico más efectivo en la reducción de los niveles de amonio en sangre en pacientes con EH al reducir el crecimiento de bacterias productoras de amoniaco. Otra alternativa es el tratamiento con benzoato sódico o fenilbutirato, empleados en niños con deficiencias enzimáticas o desórdenes en el ciclo de la urea. En el caso del fenilbutirato, éste se une a la glutamina en el hígado y en el riñón para formar fenilacetilglutamina, que no puede ser metabolizado por la glutaminasa y por tanto evita la síntesis de amoniaco y es excretado entonces en la orina. Por otro lado, el benzoato sódico se une a la glicina, dando lugar a la formación de ácido hipúrico, excretado por los riñones. La glicina es un aminoácido que se metaboliza y genera amoniaco como compuesto final. Es por ello que el tratamiento con benzoato sódico se administra para prevenir así el metabolismo de la glicina y evitar la producción de amoniaco (Rose, 2012).

Por último, también se han desarrollado estrategias centradas en la reducción de la neuroinflamación. El tratamiento con AINES, como el ibuprofeno, restaura las alteraciones cognitivas y motoras pero, en pacientes con fallo hepático, el ibuprofeno podría inducir fallo renal. Por ello, se han probado otro tipo de anti-inflamatorios como los inhibidores de p38, que reduce la activación de la microglía reduciendo la neuroinflamación sin afectar a los riñones y restaura la función cognitiva y motora en ratas con EH (Agustí et al, 2011).

Para que estos tratamientos puedan aplicarse con mayor eficacia es necesario un diagnóstico temprano de la EHM, para evitar así la EH clínica. La investigación actual se centra en la búsqueda de marcadores tempranos por técnicas no invasivas: electroencefalograma, resonancia magnética y análisis de sangre. Encontrar un biomarcador temprano de EHM en sangre sería la solución más fácil y económica para el paciente. Por esto, encontrar cuáles son los primeros factores inflamatorios que desencadenan la neuroinflamación crónica en último término es uno de los principales objetivos del Laboratorio de Neurobiología. Además de conocer el mecanismo por el que se produce neuroinflamación y poder actuar tempranamente sobre las primeras dianas que desencadenan la progresión de la neuroinflamación y por tanto del deterioro neurológico. En este objetivo general se engloba este trabajo.

2. OBJETIVOS

El principal objetivo de este estudio es analizar la progresión de la neuroinflamación en hipocampo y cerebelo de ratas con hiperamonemia crónica. Los objetivos concretos son:

- 2.1. Analizar, mediante inmunohistoquímica, la activación de microglía y astrocitos en hipocampo y cerebelo de ratas a los 3 días, 2, 4 y 8 semanas de hiperamonemia.

- 2.2. Analizar, mediante inmunohistoquímica, la síntesis de factores inflamatorios, como IL-1 β y TNF- α en hipocampo y cerebelo de ratas a los 3 días, 2, 4 y 8 semanas de hiperamonemia.

- 2.3. Evaluar el papel de la progresión de la inflamación periférica en la progresión de la neuroinflamación.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. ANIMALES

Se han utilizado ratas albinas macho de la cepa Wistar suministradas por Charles River. Se estabularon en jaulas en ambiente controlado: ciclo de 12 horas de luz (7:00-19:00 h) y 12 h de oscuridad (19-7:00 h), 23 ± 1 °C de temperatura y una humedad del $55\pm 5\%$. Se alimentaron con piensos comerciales y tuvieron libre acceso a agua y comida. Todos los procedimientos con animales fueron supervisados y aprobados por el Centro de Investigación Príncipe Felipe siguiendo la legislación española “Protección de los Animales Utilizados para Experimentos y Otros Propósitos Científicos” y de acuerdo con las normas de la Unión Europea (Directiva 2010/63/EU).

3.1.1. Modelo animal de hiperamonemia crónica sin fallo hepático

El modelo animal que se emplea para el estudio de EH son ratas hiperamonémicas sin fallo hepático. Este modelo se desarrolló a finales de los años 80 en nuestro laboratorio (Felipo et al, 1988; Azorín et al, 1989). Es un modelo basado en una dieta rica en amonio, administrando acetato amónico al 30% en la comida de los animales. Dicha dieta provoca un aumento crónico en los niveles de amonio en sangre y cerebro de 2-3 veces, al menos. Este modelo reproduce algunas alteraciones neurológicas de la EH, las cuales serán debidas únicamente a la hiperamonemia y permite distinguir qué efectos son debidos a la hiperamonemia y cuales a otras alteraciones asociadas al fallo hepático, cuando se compara con modelos animales con fallo hepático. Este modelo permite mantener el estado de hiperamonemia durante largos periodos de tiempo, pudiendo así realizar estudios a largo plazo.

3.1.2. Curso temporal del experimento

Se repartieron las ratas en dos grupos: ratas control y ratas con hiperamonemia crónica. En el grupo control se cuenta con un total de 12 animales y en el grupo de ratas hiperamonémicas un total de 17 animales distribuidos en los 4 periodos de tiempo analizados (3 días, 2, 4 y 8 semanas tras el comienzo de la dieta). Se realizaron extracciones de sangre a diferentes tiempos (1, 2, 3-4, 5-6 y 8 semanas) para la obtención de plasma y análisis de inflamación periférica mediante western blot. A los 3 días, 2, 4 y 8 semanas de hiperamonemia, algunas de ellas fueron perfundidas para la obtención de tejido para estudiar la neuroinflamación mediante inmunohistoquímica.

3.2. ANÁLISIS DE INFLAMACIÓN PERIFÉRICA Y NEUROINFLAMACIÓN

3.2.1. Obtención de plasma

Se saca sangre (entre 100 y 500 μ l) de la vena safena. Para obtener plasma se añade Ácido Etilendiaminotetraacético (EDTA) 7.5 mM, se centrifuga a 270 g durante 5 minutos y se recoge el sobrenadante. La centrifugación se repite dos veces.

3.2.2. Determinación de amonio en sangre

El amonio se midió inmediatamente después de la extracción de sangre (es suficiente con solo 20 μ l) con el Kit II para determinación de amonio en el sistema PocketChemBA (Arkay, Inc., Kyoto, Japón) siguiendo las especificaciones del fabricante.

3.2.3. Western Blot

Se separan las proteínas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 15% con Dodecilsulfato de Sodio (SDS). Las muestras se diluyen (1:1) en tampón de carga 2x (Tris-HCl 0.5 M a pH 6.8, Glicerol 5%, SDS 10%, 2-Mercaptoetanol 2.5%, Bromofenol 1%) y se hierven durante 5 minutos a 100 °C en un termoblock. A continuación se cargan las muestras en el gel y se realiza la electroforesis a intensidad de corriente de 25 mA por gel durante 1 hora. Una vez finalizada la electroforesis, se transfieren las proteínas a una membrana de Polifluoruro de Vinilideno (PVDF) (rehidratada previamente en metanol) en tampón de transferencia (Tris Base 0.025 M, Glicina 0.05 M), durante 2 horas a una intensidad de 240 mA. A continuación, se bloquea la membrana con BSA durante 45-60 minutos para evitar uniones inespecíficas y se incuban con el anticuerpo primario específico (*Tabla 2*) diluido en Albúmina de Suero Bovino (BSA) al 5% en Tampón Salino Tris (TBS-Tween) durante toda la noche en agitación a 4°C.

Se lavan las membranas 4 veces durante 10 minutos con TBS-Tween y se incuban con el anticuerpo secundario correspondiente conjugado con fosfatasa alcalina, diluido también en la solución de BSA 5%, durante 1 hora a temperatura ambiente. Las membranas se lavan 4 veces durante 10 minutos con TBS-Tween y se realiza un último lavado de 10 minutos en tampón sustrato (NaCl 100 mM, MgCl₂ 5 mM, Tris-HCl 100 mM a pH= 9.5). Por último, se revela mediante un método colorimétrico utilizando el sustrato de la enzima fosfatasa alcalina con una solución de revelado (NaCl 100 mM, MgCl₂ 5 mM, Tris-HCl 100 mM, 0.6% stock Tetrazolium (3,3'-dimethoxy-4,4'-biphenylene) bis [2,(4-nitrophenyl)-5-phenyl-2H (NBT), 0.35% stock 1H-Indol-3-ol, 5-bromo-4-chloro-dihydrogen phosphate (BCIP), pH= 9.5).

Tabla 2. Anticuerpos primarios y secundarios utilizados con su correspondiente dilución.

| Anticuerpo 1 ^{ario} | Dilución | Casa comercial | Anticuerpo 2 ^{ario} | Dilución |
|------------------------------|----------|-------------------|------------------------------|----------|
| Anti IL-6 | 1/1000 | Biosource ARC0062 | Anti-IgG conejo-f.a.* | 1:4000 |
| Anti IL-4 | 1/500 | Abcam Ab9811 | Anti-IgG conejo-f.a.* | 1:4000 |
| Anti IL-10 | 1/500 | Abcam Ab9969 | Anti-IgG conejo-f.a.* | 1:4000 |

f.a.* fosfatasa alcalina

Las imágenes de los western blot se capturan en un escáner Hewlett Packard Scanjet 5300C y la intensidad de las bandas se cuantifica con el programa Alphamager 2200 (AlphaEaseFC 2200 for Windows, Cambridge, UK).

3.2.4. Inmunohistoquímica

Las ratas se anestesian por inyección intraperitoneal de tiopental 0.1 ml/kg y se perfunden por vía intracardiaca con suero salino para eliminar la sangre. A continuación, para fijar los tejidos se perfunde con 500 ml de Paraformaldehído (PFA) al 4% en Tampón Fosfato (PB) 0.1 M a temperatura ambiente. Los cerebros se extraen cuidadosamente y se mantienen en PFA durante un periodo no superior a 24 horas, tras el cual se guardan en una solución de PB 0.1 M conteniendo azida sódica al 0.01%. A continuación, el cerebro entero se incluye en parafina y se cortan secciones horizontales de 5µm utilizando un micrótomo.

Para desparafinar las muestras se incuban los cortes 1 hora a 62 °C. A continuación se realiza la recuperación antigénica (FLEX TRS High) debido a que durante el proceso de inclusión en parafina se forman enlaces covalentes con los antígenos que dificultan el posterior reconocimiento por el anticuerpo. Mediante un tratamiento con calor (95°C), se consiguen disociar dichos enlaces para un reconocimiento del anticuerpo primario efectivo.

Para realizar la inmunohistoquímica se utiliza un equipo de tinción *Autostainer Link 48* (Dako Diagnósticos). En primer lugar los cortes se lavan con un tampón y se incuban 5 min con Endogenous Enzyme Block (FLEX peroxidasa Block) para bloquear la actividad peroxidasa endógena. Los cortes se lavan con el mismo tampón y se incuban con el anticuerpo primario diluido en solución de bloqueo. Los anticuerpos primarios usados fueron: Iba1 (1:300, *Abcam*) durante 30 minutos, IL-1β (1:100, *RD Systems*) 30 minutos, TNF-α (1:2000, *AB66579*) 45 minutos y GFAP (listo para usar, *DAKO*) durante 20 minutos. Para eliminar el anticuerpo primario residual que no ha quedado adherido al tejido, se vuelven a lavar los cortes con el mismo tampón. Los anticuerpos secundarios (listos para usar, *DAKO*) tienen unido un sistema de revelado basado en Horseradish Peroxidase (HRP) que reacciona con un sustrato colorimétrico, Diaminobenzidina (DAB). Los cortes se incuban con el anticuerpo secundario durante 20 minutos. El anticuerpo secundario residual es eliminado mediante varios lavados.

Para el revelado se incuban los cortes durante 10 minutos con el DAB. A continuación, los cortes son tratados con hematoxilina para contrateñir los núcleos y se vuelven a lavar.

Finalmente, las muestras se deshidratan con concentraciones crecientes de alcoholes: 70%, 96% y 100% durante 5, 5 y 10 minutos respectivamente. Tras la deshidratación, los cortes se mantienen en xileno al menos durante 10 minutos y se montan. Una vez secas las preparaciones, se escanean con la ayuda de un *Scanner Panoramic 250* (Automatic Brightfield Scan). Dichas imágenes escaneadas fueron analizadas con el programa *Panoramic Viewer*, que permite realizar fotos de las regiones de interés de los cortes con objetivos de 1X, 5X, 10X, 20X, 40X y 56X.

3.3. CUANTIFICACIÓN

Se hicieron fotos tanto de hipocampo como de cerebelo para cada uno de los animales del grupo control e hiperamonémico.

Microglía (Iba1)

Para analizar la activación de microglía se cuantificó el área y perímetro de las células marcadas con Iba1, para diferenciar la morfología y se contaron las células marcadas como medida de la proliferación de la microglía. Se hicieron un total de 15 fotos y se contaron mínimo 40 células, para cada una de las regiones analizadas y por cada animal. Las fotos se realizaron a 56X para el análisis de área y perímetro y a 30X para la proliferación. A continuación, las imágenes fueron analizadas con el programa de análisis de imagen *Image J*.

- Análisis de área y perímetro.

El área y perímetro son menores en el caso de la microglía activada, con forma ameboides, pues disminuyen el tamaño y número de prolongaciones. Las imágenes se filtran antes de cuantificar para eliminar ruido de fondo o marcas de otros planos. Para ello se convierten las imágenes a 8 Bits y se aplica la función *Autolocal threshold*; a continuación se eligió el método de análisis que más se ajustaba a nuestra inmunohistoquímica, el método *Bernsen*. Luego, con el filtro de tamaño (3000 – 20000 píxeles), se eliminan las marcas correspondientes a ruido de fondo o a ramas de microglía de otro plano.

Para garantizar que todas aquellas marcas que había generado el filtro correspondían únicamente a microglía, todas las fotos fueron revisadas y eliminadas todas aquellas señales que, estando dentro del intervalo de tamaño, correspondían a ruido de fondo u otro tipo de célula. Finalmente, los datos de área y perímetro obtenidos fueron convertidos a unidades de μm puesto que el programa genera los datos en unidades de píxeles. Para poder convertir los datos, es necesario disponer de una escala que nos proporciona el programa *Panoramic*

Viewer en la parte de arriba a la izquierda de la foto (Fig. 2). En ella, se muestran los μm correspondientes a esa determinada longitud. De tal manera que, dibujando una línea recta sobre dicha escala, podemos saber cuáles son los pixeles que corresponden a esos μm . Utilizando este valor de conversión, los datos de área se expresan en μm^2 y el perímetro en μm . Finalmente, se obtuvo la media de los datos obtenidos para cada una de las fotos.

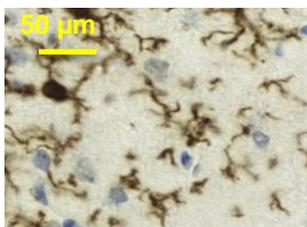


Figura 2. Imagen a 30X obtenida con el programa Panoramic Viewer. En ella se puede observar la escala utilizada para la conversión de pixeles a μm en la parte superior izquierda.

Astroцитos (GFAP)

Para el análisis de la activación de astroцитos se cuantificó la expresión de GFAP. Se hicieron un total de 15 fotos a 56X para cada una de las regiones analizadas y por animal. A continuación, las imágenes fueron analizadas con el programa de análisis de imagen *Image J*. Para descartar artefactos sobre las fotos se aplicó un filtro. Se convirtieron las imágenes a 8 Bits y se aplicó la función Autolocal threshold; se eligió como método de análisis, el método Bernsen. A continuación, se filtró por tamaño (0-infinity).

Citocinas: TNF- α y IL-1 β

Para el análisis de la expresión de TNF- α se hicieron un total de 6 fotos a 40X por animal y por región analizada. Se contaron entre 50 y 90 células por foto. A continuación, las imágenes fueron analizadas con el programa *Image J*. Se contó el número de células positivas para TNF- α en hipocampo (CA1 y Giro Dentado (GD)) y se sacó un porcentaje con respecto al total de células. En cerebelo, se cuantificó el contenido total en sustancia blanca.

En el caso de la IL-1 β , en el cerebelo, se hicieron entre 10 y 15 fotos a 30X por animal. A continuación, las imágenes fueron analizadas con el programa *Image J*. Se cuantificó el número total de células que eran positivas para IL-1 β y los resultados se expresaron como el número de células por mm^2 . En el hipocampo el análisis de IL-1 β se realizó como el de TNF- α .

3.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se utilizó el programa GraphPad Software, Inc. Prism 5. Los datos se expresan como porcentaje del valor medio de los controles y son la media \pm Error Estándar de las Medias

(SEM) de 3-5 animales. Se realizó un Análisis de la Varianza (ANOVA) de dos vías, en el que las dos variables eran el tiempo y la hiperamonemia y ANOVA de una vía para ver el efecto del tiempo dentro de cada grupo, control e hiperamonémico. Se consideró como significativo un valor de $p < 0.05$.

4. RESULTADOS

Antes que nada hemos comprobado que las ratas son hiperamonémicas a todos los tiempos: el valor medio de amonio en sangre para las ratas control es $20 \pm 3.5 \mu\text{M}$ y no varía con el tiempo. Para las ratas hiperamonémicas el valor medio es $99 \pm 25 \mu\text{M}$ y tampoco varía significativamente con el tiempo.

4.1. HIPOCAMPO

4.1.1. La microglía está activada en el hipocampo de ratas con hiperamonemia crónica a las 2 y 4 semanas.

Las ratas con hiperamonemia sin fallo hepático muestran activación de la microglía en hipocampo, ya que se observa una disminución en el área y perímetro de las células que expresan Iba1 en hipocampo comparadas con las ratas control. El análisis estadístico con ANOVA de 2 vías y post test Bonferroni para el área muestra una interacción significativa entre el tiempo y la hiperamonemia ($p < 0.001$), un efecto significativo de la hiperamonemia y del tiempo ($p < 0.01$). En el caso del perímetro, existe una interacción significativa entre el tiempo y la hiperamonemia ($p < 0.001$) y un efecto significativo de la hiperamonemia ($p < 0.01$) (Fig. 3).

El área en ratas hiperamonémicas disminuye significativamente a las 2 (HA = $330 \pm 23 \mu\text{m}^2$, $p < 0.001$) y 4 semanas (HA = $337 \pm 8 \mu\text{m}^2$, $p < 0.01$) con respecto a las control (C = $450 \pm 20 \mu\text{m}^2$; C = $413 \pm 18 \mu\text{m}^2$). A los 3 días no se aprecian diferencias significativas entre las ratas hiperamonémicas (HA = $301 \pm 13 \mu\text{m}^2$) y las control (C = $378 \pm 31 \mu\text{m}^2$) (Fig. 3I). El perímetro disminuye a 2 (HA = $292 \pm 18 \mu\text{m}$, $p < 0.05$) y 4 semanas de hiperamonemia (HA = $280 \pm 9 \mu\text{m}$, $p < 0.001$) con respecto a las control (C = $359 \pm 18 \mu\text{m}$; CV = $350 \pm 16 \mu\text{m}$). A los 3 días (HA = $301 \pm 13 \mu\text{m}$) no se observan diferencias significativas con respecto al control (C = $327 \pm 22 \mu\text{m}$) (Fig. 3J). A las 8 semanas de hiperamonemia, el área y perímetro de las ratas hiperamonémicas (HA = $437 \pm 16 \mu\text{m}^2$; HA = $364 \pm 14 \mu\text{m}$) se normaliza y ya no hay diferencias con las ratas control (C = $417 \pm 13 \mu\text{m}^2$; C = $331 \pm 11 \mu\text{m}$). Tanto el área como el perímetro

aumentan significativamente en las ratas hiperamonémicas a las 8 semanas con respecto al resto de tiempos.

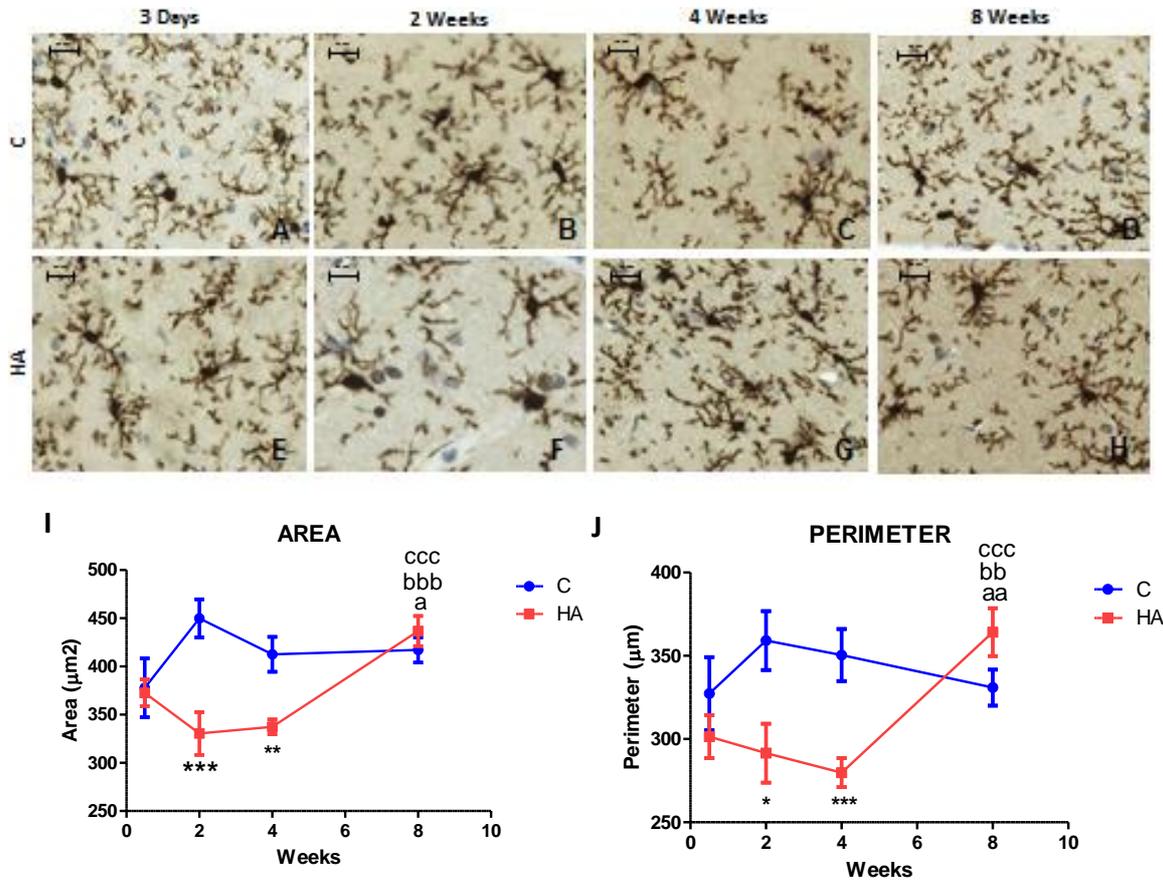


Figura 3. Expresión de Iba1 en hipocampo. Inmunohistoquímica para Iba1 en hipocampo en ratas control e hiperamonémicas a 3 días (A, E), 2 (B, F), 4 (C, G) y 8 (D, H) semanas tras empezar la dieta hiperamonémica. Fotos realizadas a 56X. En la Fig. 3I se muestra la progresión temporal del área en μm^2 y en la Fig. 3J la del perímetro en μm , de las células marcadas con Iba1 en el hipocampo de ratas control e hiperamonémicas. Los valores son la media \pm SEM de 3 ratas control y 4-5 ratas hiperamonémicas. Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto al control, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$; a indica diferencia significativa con respecto a HA 3 días, aa $p < 0.01$; b indica diferencia significativa con respecto a HA 2 semanas, bb $p < 0.01$; c indica diferencia significativa con respecto a HA 4 semanas, ccc $p < 0.001$. Escala = 50 μm .

4.1.2. El contenido de GFAP en el hipocampo está aumentado en hiperamonemia crónica tras 4 semanas.

El análisis del contenido del marcador de astrocitos GFAP muestra activación de astrocitos en el hipocampo de ratas hiperamonémicas a las 4 semanas de hiperamonemia. El análisis

estadístico con ANOVA de 2 vías y post test Bonferroni muestra una interacción significativa entre el tiempo y la hiperamonemia ($p < 0.01$) y un efecto significativo de la hiperamonemia y del tiempo ($p < 0.001$) (Fig. 4).

La expresión de GFAP en ratas hiperamonémicas (HA = 98498 ± 2491 u.a., $p < 0.05$) está ligeramente aumentado a los 3 días de hiperamonemia, comparado con las ratas control. A las 4 semanas está aumentado significativamente (HA = 127390 ± 4030 u.a., $p < 0.001$) con respecto a las control (C = 97394 ± 2499 u.a.). A las 2 y 8 semanas el contenido de GFAP no es diferente en HA (HA = 115435 ± 4114 u.a. y HA = 114467 ± 2609 u.a., $p > 0.05$) y control (C = 107426 ± 3836 u.a.; C = 108537 ± 2946 u.a.), debido a un aumento en las ratas control (Fig 4I). A los 3 días, la expresión de GFAP en las ratas hiperamonémicas es significativamente menor que a 2, 4 y 8 semanas. A las 2 y 8 semanas el contenido de GFAP en las ratas control es mayor que a los 3 días o 4 semanas (Fig. 4I).

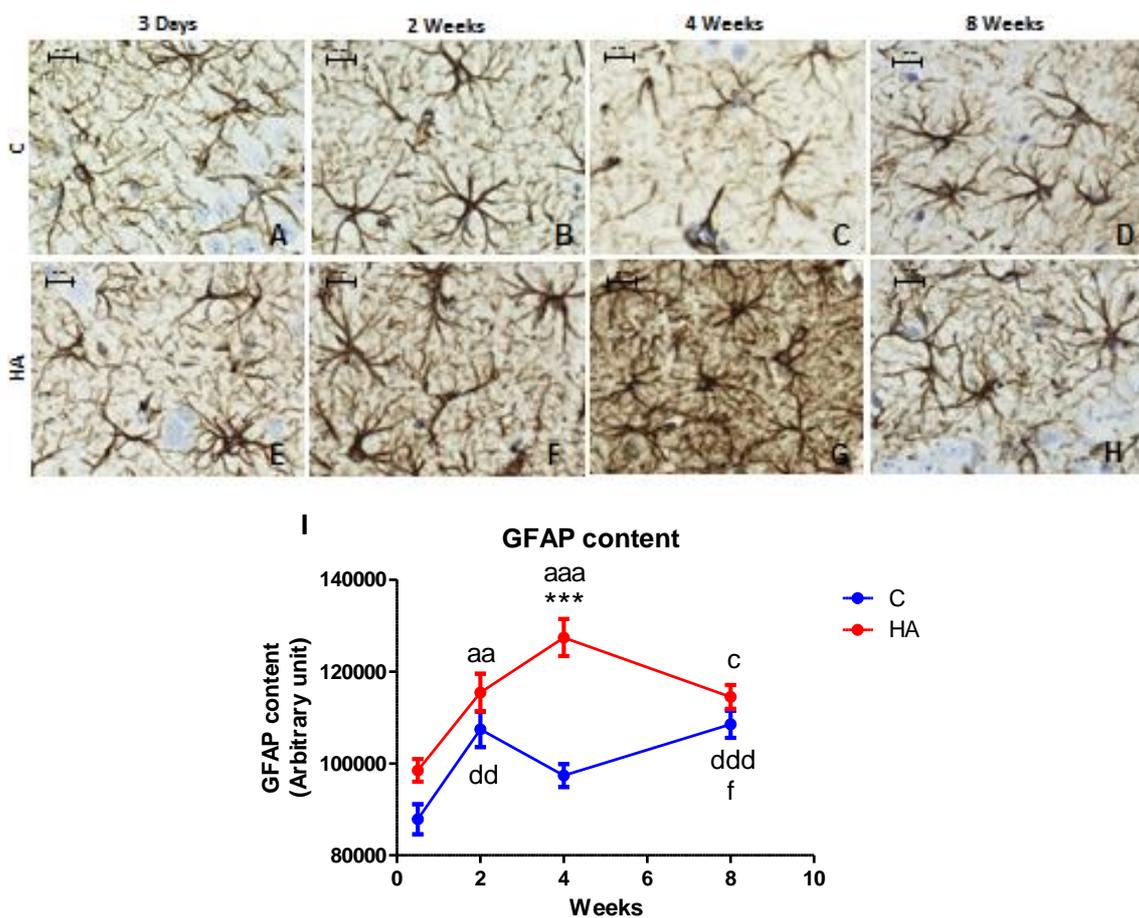


Figura 4. Expresión de GFAP en hipocampo. Inmunohistoquímica para GFAP en hipocampo en ratas control e hiperamonémicas a 3 días (A, E), 2 (B, F), 4 (C, G) y 8 (D, H) semanas tras empezar la dieta hiperamonémica. Fotos realizadas a 56X. En la Fig. 4I se muestra la progresión temporal de la expresión de GFAP en el hipocampo en las ratas control e hiperamonémicas. Los valores son la media \pm SEM de 3 ratas control y 4-5 ratas hiperamonémicas. Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto al control,

* $p < 0.05$, *** $p < 0.001$; a indica diferencia significativa con respecto a HA 3 días, aa $p < 0.01$, aaa $p < 0.001$; c indica diferencia significativa con respecto a HA 4 semanas, c $p < 0.05$; d indica diferencia significativa con respecto a C 3 días, dd $p < 0.01$, ddd $p < 0.001$; f indica diferencia significativa con respecto a C 4 semanas, f $p < 0.05$. Escala = 50 μm .

4.1.3. La expresión de TNF- α aumenta en el hipocampo a las 2 semanas de hiperamonemia.

Tanto TNF- α como IL-1 β se han analizado de momento solo en las regiones CA1 y GD del hipocampo porque era donde había una marca más clara, lo cual no implica que en el resto de áreas no hubiera marca. Posteriormente se analizará la expresión de estas citocinas en la región CA3 y en el Hilus.

Las ratas con hiperamonemia sin fallo hepático muestran aumentada la expresión de TNF- α en la región CA1 del hipocampo comparadas con las ratas control. El análisis estadístico con ANOVA de 2 vías y post test Bonferroni muestra una interacción significativa entre el tiempo y la hiperamonemia ($p < 0.05$) y un efecto significativo de la hiperamonemia ($p < 0.01$) y del tiempo ($p < 0.05$) (Fig. 5).

El número de células que expresan TNF- α en el área CA1 de hipocampo de ratas hiperamonémicas está aumentado solo 3 días después de comenzar la dieta hiperamonémica (HA = 10 ± 3 células por foto) con respecto a las control (C = 3 ± 1 células por foto) aunque la diferencia no es significativa ($p > 0.05$). A los 2 semanas de hiperamonemia (HA = 18 ± 3 células por foto, $p < 0.01$) sí hay un aumento significativo con respecto a las control (C = 5 ± 1 células por foto). A las 4 (HA = 11 ± 2 células por foto, $p > 0.05$) y 8 semanas el número de células que expresan TNF- α es igual en las ratas hiperamonémicas (HA = 4 ± 1 células por foto, $p > 0.05$) que en las control (C = 10 ± 2 células por foto; C = 7 ± 2 células por foto) (Fig. 5I).

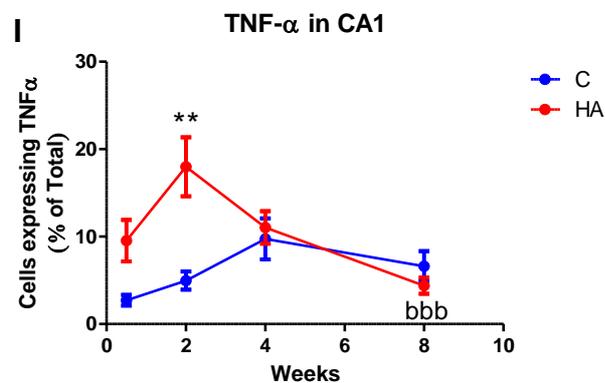
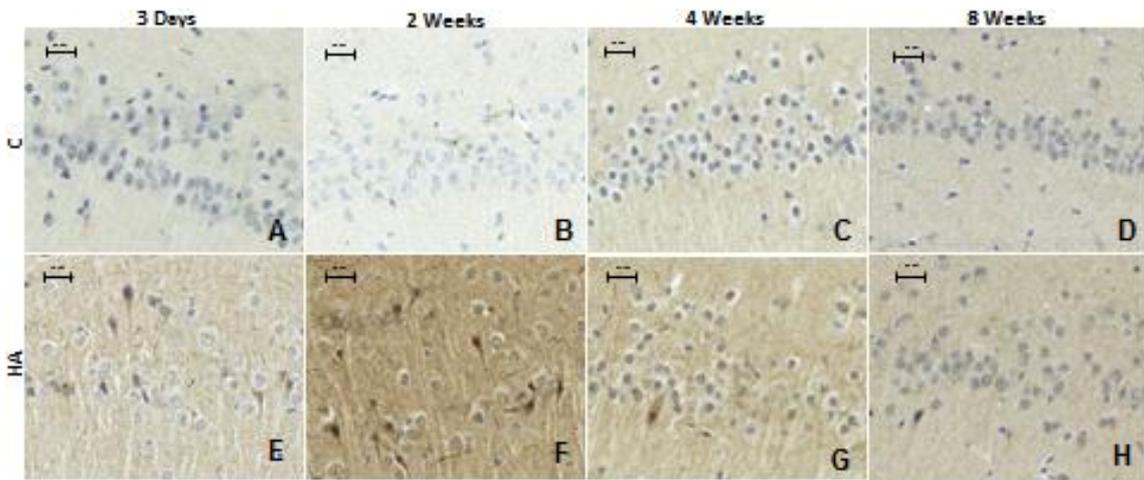


Figura 5. Expresión de TNF- α en CA1. Inmunohistoquímica para TNF- α en CA1 en ratas control e hiperamonémicas a 3 días (A, E), 2 (B, F), 4 (C, G) y 8 (D, H) semanas. Fotos realizadas a 56X. En la Fig. 5I se muestra la progresión temporal de la expresión de TNF- α en CA1 de las ratas control e hiperamonémicas. Los valores son la media \pm SEM de 3 ratas control y 4-5 ratas hiperamonémicas. Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto al control, ** $p < 0,01$; b indica diferencia significativa con respecto a HA 2 semanas, bbb $p < 0,001$. Escala = 50 μ m.

El número de células que expresan TNF- α también está aumentado en el GD del hipocampo de ratas hiperamonémicas, comparadas con las ratas control. El análisis estadístico con ANOVA de 2 vías y post test Bonferroni muestra una interacción significativa entre el tiempo y la hiperamonemia ($p < 0,01$) y un efecto significativo del tiempo ($p < 0,001$) (Fig. 6).

La expresión de TNF- α en el GD del hipocampo de ratas hiperamonémicas está aumentado significativamente a las 2 semanas (HA = 17 ± 3 células, $p < 0,001$) de hiperamonemia con respecto a las control (C = 7 ± 0 células). El número de células que expresan TNF- α en el GD en ratas hiperamonémicas disminuye significativamente a partir de ese momento, siendo igual que en las controles a las 4 y 8 semanas de hiperamonemia (Fig. 6I).

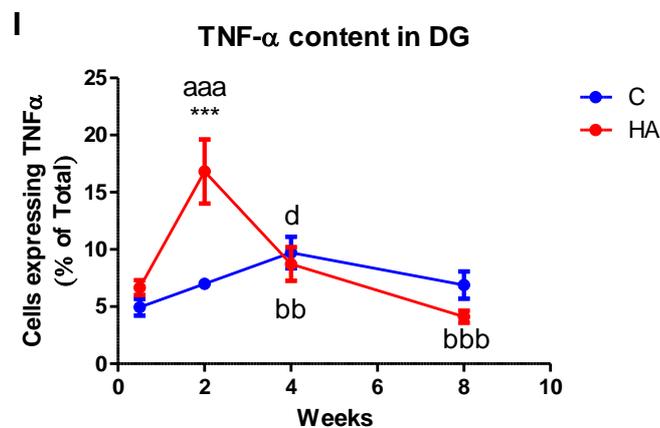
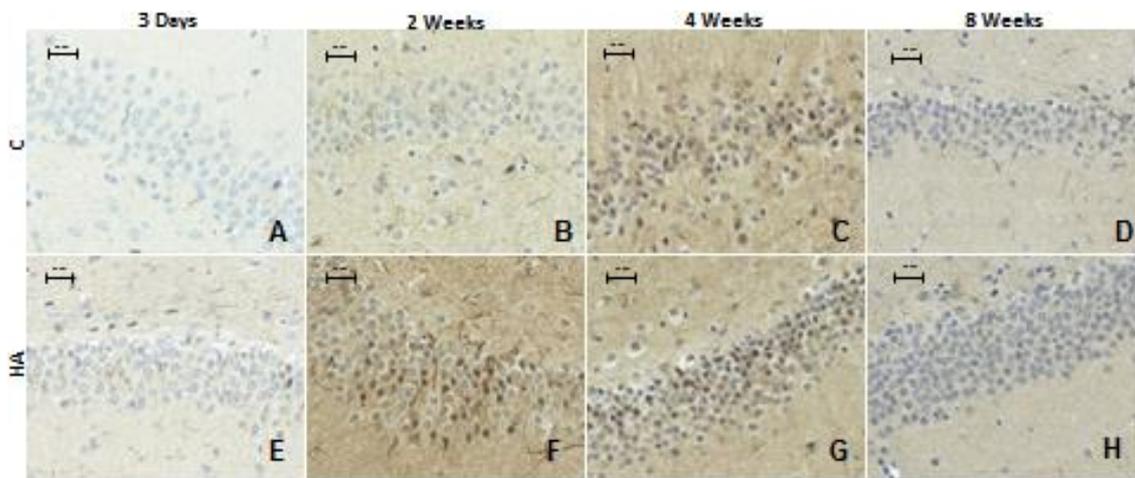


Figura 6. Expresión de TNF- α en GD. Inmunohistoquímica para TNF- α en GD en ratas control e hiperamonémicas a 3 días (A, E), 2 (B, F), 4 (C, G) y 8 (D, H) semanas. Fotos realizadas a 56X. En la Fig. 6I se muestra la progresión temporal de la expresión de TNF- α en el GD de las ratas control e hiperamonémicas. Los valores son la media \pm SEM de 3 ratas control y 4-5 ratas hiperamonémicas. Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto al control ** $p < 0,01$; a indica diferencia significativa frente a HA 3 días, aaa $p < 0,001$; b indica diferencia significativa con respecto a HA 2 semanas, bb $p < 0,01$, bbb $p < 0,001$; d indica diferencias significativas con respecto a C 3 días, d $p < 0,05$. Escala = 50 μ m.

4.1.4. La expresión de IL-1 β aumenta en el hipocampo de las ratas con hiperamonemia crónica a 8 semanas.

Las ratas con hiperamonemia crónica muestran un aumento en la expresión de IL-1 β en la región CA1 del hipocampo, tras 8 semanas de hiperamonemia, comparadas con las ratas control. El análisis estadístico con ANOVA de 2 vías y post test Bonferroni muestra una interacción significativa entre el tiempo y la hiperamonemia y un efecto significativo del tiempo ($p < 0,01$) (Fig. 7).

La expresión de IL-1 β está aumentada significativamente a las 8 semanas (HA = 17 \pm 3 células, $p < 0.01$) con respecto a las control (C = 2 \pm 1 células). A los 3 días (HA = 20 \pm 4 células, $p > 0.05$), 2 (HA = 6 \pm 1 células, $p > 0.05$) y 4 semanas (HA = 5 \pm 1 células, $p > 0.05$), no se observan diferencias significativas con respecto al control (C = 15 \pm 4 células; C = 9 \pm 2 células; C = 10 \pm 2 células, a 3 días, 2 y 4 semanas respectivamente) (Fig. 7I). Sin embargo, en las ratas hiperamonémicas el contenido de IL-1 β disminuye significativamente a las 2 y 4 semanas, comparado con el contenido a los 3 días de hiperamonemia.

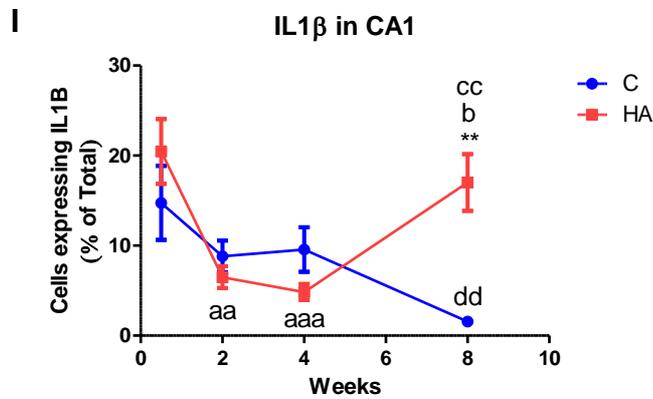
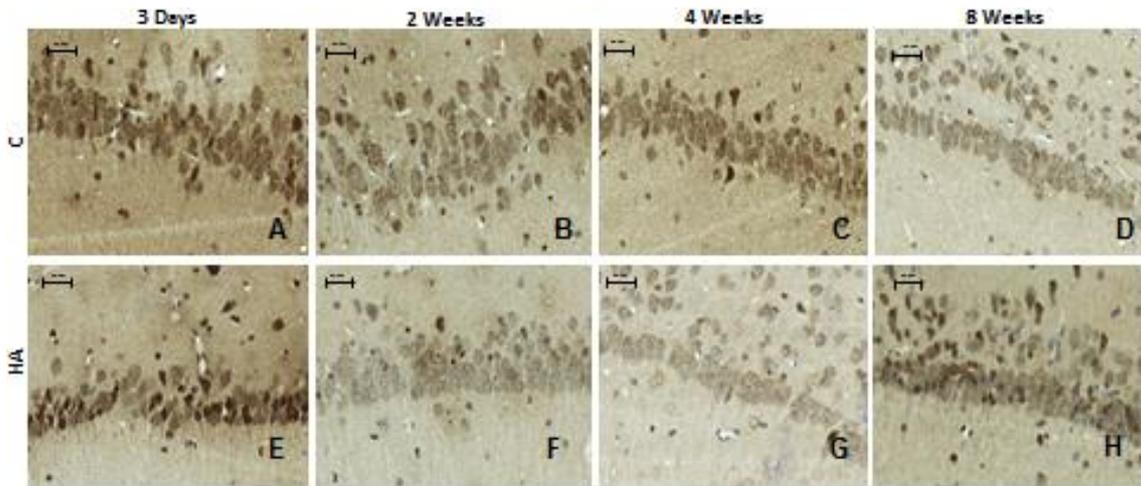


Figura 7. Expresión de IL-1 β en CA1. Inmunohistoquímica para IL-1 β en CA1 en ratas control e hiperamonémicas a 3 días (A, E), 2 (B, F), 4 (C, G) y 8 (D, H) semanas. Fotos realizadas a 40X. En la Fig. 7I se muestra la progresión temporal de la expresión de IL-1 β en el hipocampo de las ratas control e hiperamonémicas. Los valores son la media \pm SEM de 3 ratas control y 4-5 ratas hiperamonémicas. Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto al control, ** $p < 0.01$; a indica diferencia significativa frente a HA 3 días, aa $p < 0.01$, aaa $p < 0.001$; b indica diferencia significativa con respecto a HA 2 semanas, b $p < 0.05$; c indica diferencias significativas con respecto a HA 4 semanas, cc $p < 0.01$; d indica diferencia significativa con respecto a C 3 días, dd $p < 0.01$. Escala = 50 μ m.

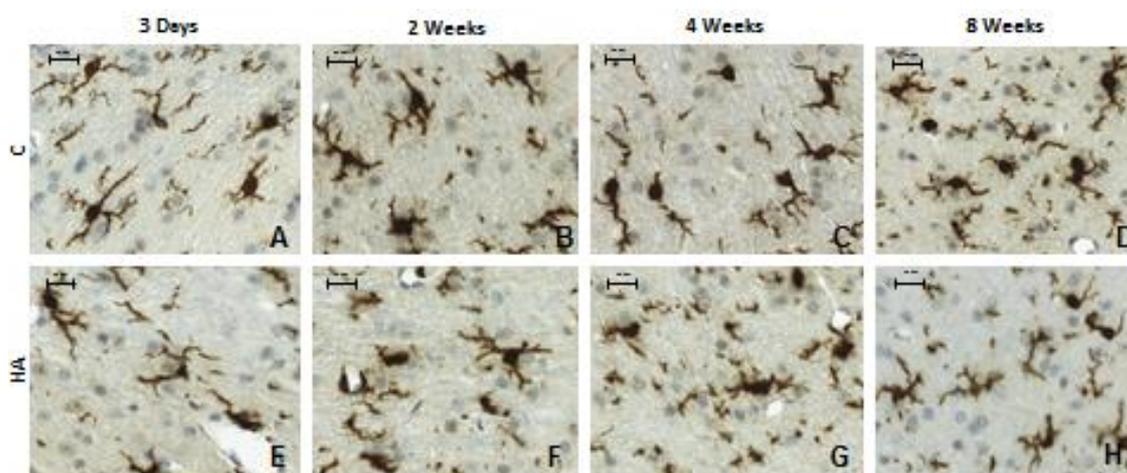
4.2. CEREBELO

Se han cuantificado las inmunohistoquímicas de TNF- α e IL-1 β solamente en la sustancia blanca del cerebelo porque estaba más marcada. Posteriormente se analizarán la capa granular y las neuronas de Purkinje.

4.2.1. La microglía está activada en el cerebelo de ratas a las 2 semanas de hiperamonemia.

Las ratas hiperamonemias muestran una disminución en el área y perímetro de las células que expresan Iba1 en cerebelo, comparadas con las ratas control. El análisis estadístico con ANOVA de 2 vías y post test Bonferroni para el área muestra una interacción significativa entre el tiempo y la hiperamonemia y un efecto significativo de la hiperamonemia ($p < 0.01$). En el caso del perímetro, existe interacción significativa entre el tiempo y la hiperamonemia ($p < 0.05$) y efecto significativo de la hiperamonemia ($p < 0.01$) (Fig.8).

En ratas hiperamonémicas el área de las células marcadas con Iba1 está significativamente disminuida a las 2 semanas de hiperamonemia (HA = $264 \pm 9 \mu\text{m}^2$, $p < 0.001$) con respecto a las control (C = $330 \pm 14 \mu\text{m}^2$). A los 3 días (HA = $304 \pm 11 \mu\text{m}^2$, $p > 0.05$), 4 (HA = $292 \pm 10 \mu\text{m}^2$, $p > 0.05$) y 8 semanas (HA = $300 \pm 10 \mu\text{m}^2$) no se observan diferencias significativas con respecto a las control (C = $323 \pm 16 \mu\text{m}^2$; C = $307 \pm 7 \mu\text{m}^2$; C = $298 \pm 7 \mu\text{m}^2$, a 3 días, 4 y 8 semanas respectivamente) (Fig. 8I). Como el área, el perímetro también es significativamente menor en las ratas hiperamonémicas tras 2 semanas de hiperamonemia (HA = $176 \pm 6 \mu\text{m}$, $p < 0.05$) con respecto a las control (C = $208 \pm 12 \mu\text{m}$), mientras que a las 4 (HA = $179 \pm 7 \mu\text{m}$, $p > 0.05$) y 8 semanas (HA = $191 \pm 7 \mu\text{m}$) no se observan diferencias significativas entre C e HA (C = $187 \pm 7 \mu\text{m}$; C = $187 \pm 7 \mu\text{m}$, a 4 y 8 semanas respectivamente). Tras 3 días de hiperamonemia se observa una disminución del perímetro, comparado con las ratas control, aunque no significativa (C = $217 \pm 9 \mu\text{m}$; HA = $184 \pm 8 \mu\text{m}$, $p > 0.05$) (Fig. 8J).



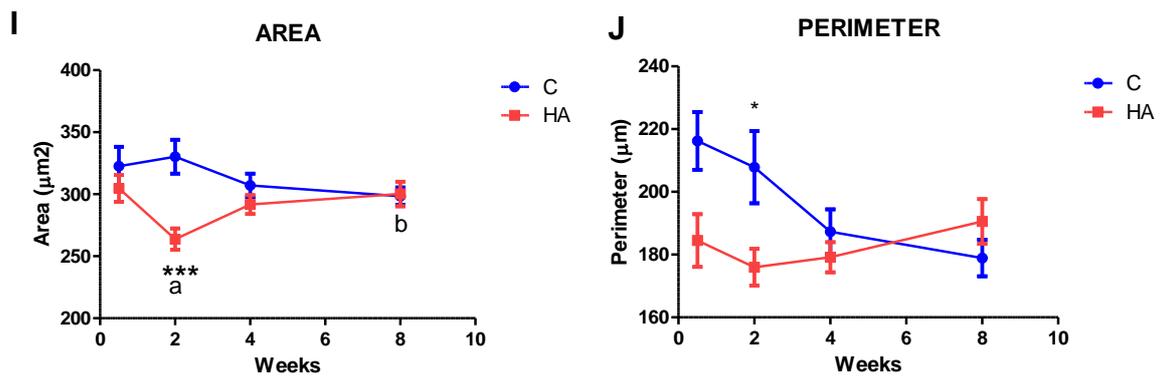


Figura 8. Expresión de Iba1 en cerebelo. Inmunohistoquímica para Iba1 en Sustancia Blanca en ratas control e hiperamonémicas a 3 días (A, E), 2 (B, F), 4 (C, G) y 8 (D, H) semanas tras el comienzo de la dieta. Fotos realizadas a 56X. En la Fig. 8I se muestra la progresión temporal del área de las células positivas para Iba1 en la sustancia blanca del cerebelo de las ratas control e hiperamonémicas. El perímetro se muestra en la Fig. 8J. Los valores son la media \pm SEM 3 ratas control y 4-5 ratas hiperamonémicas. Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto al control, * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$; a indica diferencia significativa con respecto a HA 3 días, $p < 0.05$; b indica diferencia significativa con respecto a HA 2 semanas, $p < 0.05$. Escala = 50 μm .

4.2.2. El contenido de GFAP en el cerebelo está aumentado en hiperamonemia crónica.

Las ratas hiperamonémicas muestran un aumento en el contenido de GFAP en cerebelo comparadas con las ratas control. El análisis estadístico con ANOVA de 2 vías y post test Bonferroni muestra una interacción significativa entre el tiempo y la hiperamonemia ($p < 0.001$), efecto significativo de la hiperamonemia y del tiempo ($p < 0.001$) (Fig. 9).

El contenido de GFAP en ratas hiperamonémicas está significativamente aumentado a los 3 días de hiperamonemia (HA = 150174 ± 3432 u.a.; C = 128230 ± 3119 u.a., $p < 0.001$) y a las 4 semanas (HA = 163676 ± 4628 u.a.; C = 129661 ± 2923 u.a., $p < 0.001$). A las 2 semanas de hiperamonemia se produce un aumento de la expresión de GFAP en las ratas control y por tanto no hay diferencias con las ratas hiperamonémicas (C = 158932 ± 4033 u.a.; HA = 156849 ± 3987 u.a., $p > 0.05$). Lo mismo ocurre a las 8 semanas (C = 145452 ± 4518 u.a.; HA = 156624 ± 3374 u.a., $p > 0.05$) (Fig. 9I).

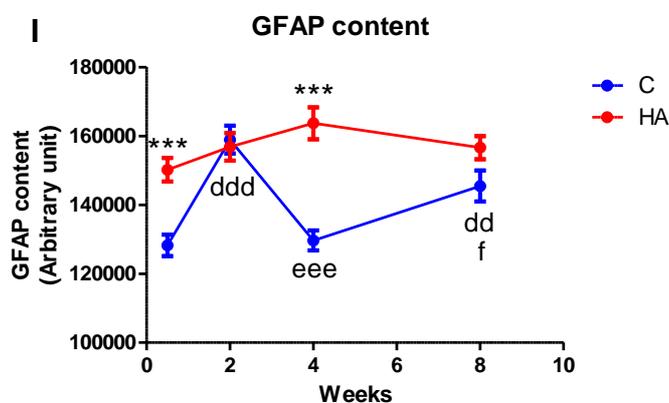
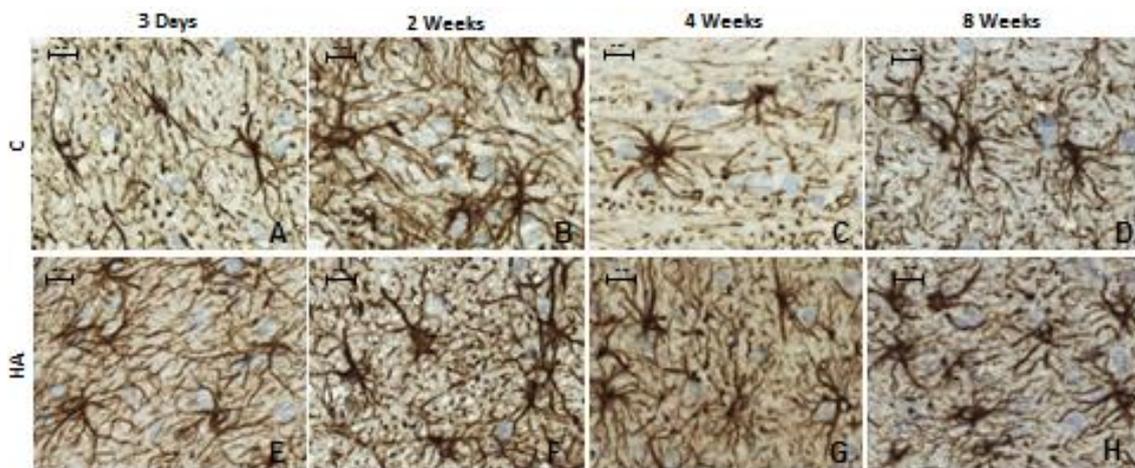


Figura 9. Expresión de GFAP en cerebelo. Inmunohistoquímica para GFAP en el cerebelo en ratas control e hiperamonémicas a 3 días (A, E), 2 (B, F), 4 (C, G) y 8 (D, H) semanas. Fotos realizadas a 56X. En la Fig. 9I se muestra la progresión temporal en el contenido de GFAP en el cerebelo en ratas control e hiperamonémicas a 3 días, 2, 4 y 8 semanas. Los valores son la media \pm SEM de 3 ratas control y 4-5 ratas hiperamonémicas. Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto al control, *** $p < 0,001$; d indica diferencia significativa con respecto a C 3 días, dd $p < 0,01$, ddd $p < 0,001$; e indica diferencia significativa con respecto a C 2 semanas, eee $p < 0,001$; f indica diferencia significativa con respecto a C 4 semanas, f $p < 0,05$. Escala = 50 μ m.

4.2.3. El contenido de TNF- α en el cerebelo está aumentado a las 4 semanas de hiperamonemia.

Las ratas hiperamonémicas tienen aumentado el número de células que expresan TNF- α en la sustancia blanca del cerebelo comparadas con las ratas control, a las 4 semanas. El análisis estadístico con ANOVA de 2 vías y post test Bonferroni muestra una interacción

significativa entre el tiempo y la hiperamonemia ($p < 0.01$) y un efecto significativo del tiempo ($p < 0.001$) (Fig. 10).

La expresión de TNF- α en ratas hiperamonémicas está aumentada significativamente a las 4 semanas (HA = 16541 ± 893 u.a., $p < 0.05$) de hiperamonemia con respecto a las control (C = 11945 ± 617 u.a.). A los 3 días (HA = 12162 ± 967 u.a., $p > 0.05$) y 2 semanas (HA = 14843 ± 1058 u.a., $p > 0.05$), las diferencias con respecto a las control no son significativas (C = 10514 ± 1150 u.a.; C = 13269 ± 879 u.a.). A las 8 semanas (HA = 9059 ± 864 u.a., $p > 0.05$) la expresión de TNF- α en ratas hiperamonémicas disminuye con respecto al contenido a las 4 semanas de hiperamonemia y ya no hay diferencias con el control (C = 12592 ± 877 u.a.) (Fig. 10I).

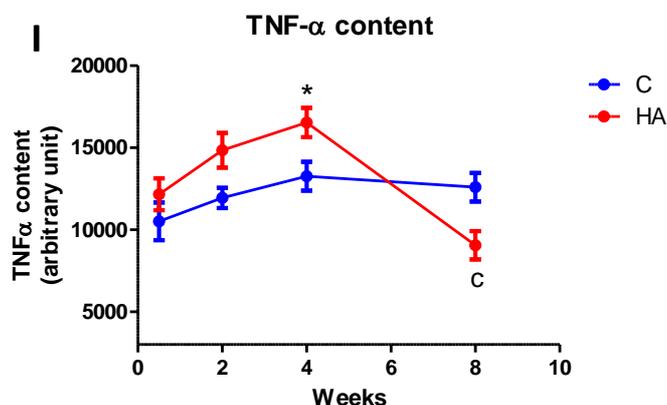
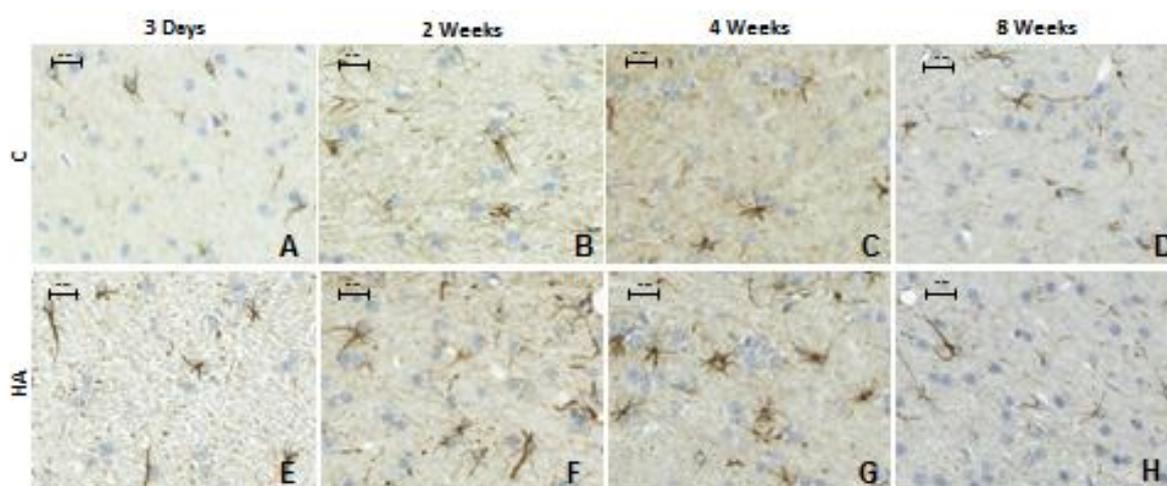


Figura 10. Expresión de TNF- α en cerebelo. Inmunohistoquímica para TNF- α en cerebelo en ratas control e hiperamonémicas a 3 días (A, E), 2 (B, F), 4 (C, G) y 8 (D, H) semanas. Fotos realizadas a 40X. En la Fig. 10I se muestra la progresión temporal en el contenido de TNF- α en el cerebelo en ratas control e hiperamonémicas a 3 días, 2, 4 y 8 semanas. Los valores son la media \pm SEM de 3 ratas control y 4-5 ratas hiperamonémicas. Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto al control, * $p < 0.05$. c indica diferencia significativa con respecto a HA 4 semanas, c $p < 0.05$. Escala = 50 μ m.

4.2.4. El contenido de IL-1 β en el cerebelo aumenta ligeramente en hiperamonemia crónica a 4 y 8 semanas.

Las ratas hiperamonémicas muestran un aumento no significativo en la expresión de IL-1 β en el cerebelo comparadas con las ratas control. El análisis estadístico con ANOVA de 2 vías y post test Bonferroni muestra interacción significativa entre el tiempo y la hiperamonemia ($p < 0.05$) (Fig. 11).

El número de células que expresan IL-1 β en las ratas hiperamonémicas está disminuido a los 3 días (HA = 713 ± 28 células/mm², $p > 0.05$) y 2 semanas (HA = 701 ± 30 células/mm², $p > 0.05$) con respecto a las control (C = 848 ± 36 células/mm²; C = 775 ± 25 células/mm²). A las 4 (HA = 797 ± 30 células/mm², $p > 0.05$) y 8 semanas (HA = 811 ± 25 células/mm², $p > 0.05$), su expresión aumenta (Fig. 11).

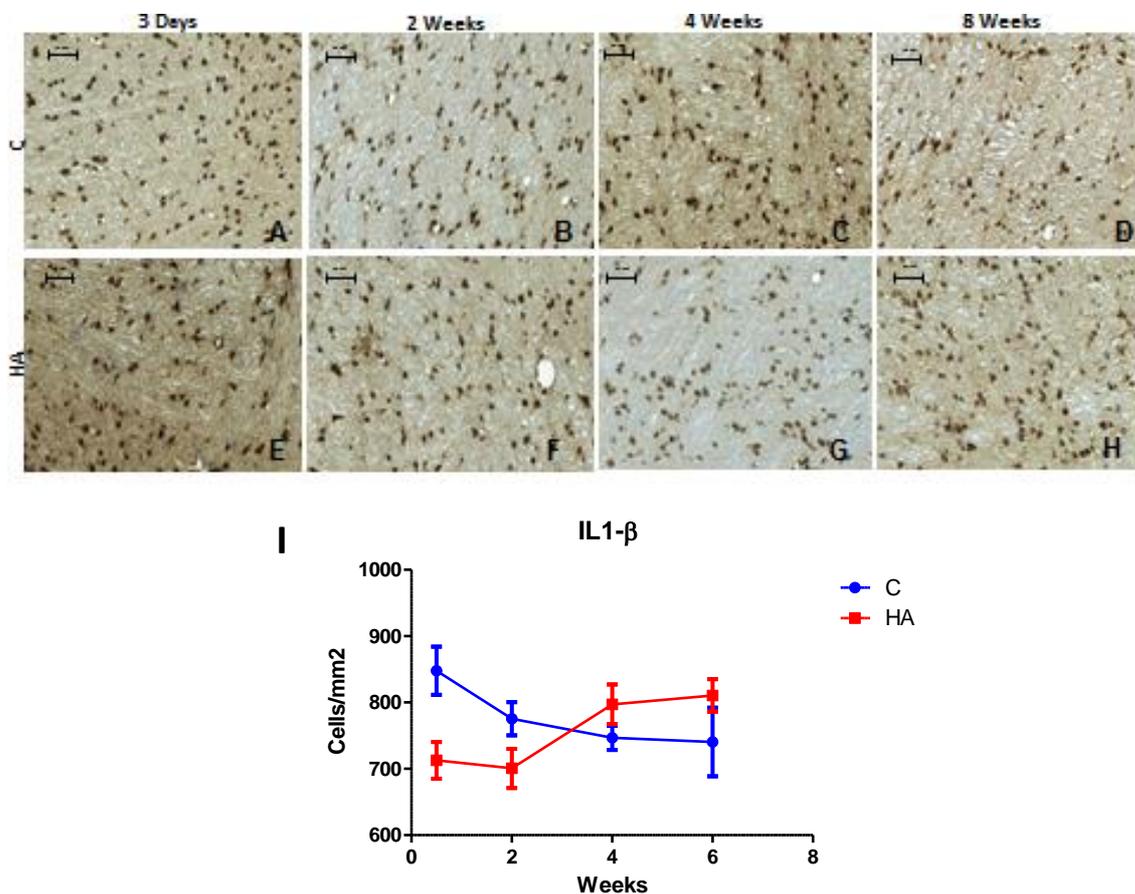


Figura 11. Expresión de IL-1 β en cerebelo. Inmunohistoquímica para IL-1 β en ratas control e hiperamonémicas a 3 días (A, E), 2 (B, F), 4 (C, G) y 8 (D, H) semanas. Fotos realizadas a 30X. En la Fig. 11I se muestra la progresión temporal en el contenido de IL-1 β en el cerebelo en ratas control e hiperamonémicas a 3 días, 2, 4 y 8 semanas. Los valores son la media \pm SEM 3 ratas control y 4-5 ratas hiperamonémicas. Escala = 50 μ m.

4.3. INFLAMACIÓN PERIFÉRICA

Puesto que los resultados anteriores demuestran que existe neuroinflamación en ratas hiperamonémicas y que los diferentes marcadores de neuroinflamación varían con el tiempo de hiperamonemia, hemos analizado si también hay inflamación periférica y cómo cambia el contenido de diferentes citocinas en el plasma con el tiempo de hiperamonemia.

Resultados previos en el laboratorio habían demostrado un aumento de TNF- α en sangre en ratas hiperamonémicas a las 1-2 (99 ± 14 pmol/ml en controles y 208 ± 24 pmol/ml en ratas hiperamonémicas ($p < 0.01$) y a las 3-4 semanas (37 ± 5 pmol/ml en controles y 62 ± 11 pmol/ml en ratas hiperamonémicas, $p < 0.05$).

4.3.1. Los niveles de IL-6 en plasma varían con el tiempo de hiperamonemia en ratas con hiperamonemia crónica.

Se ha analizado el contenido de la interleucina pro-inflamatoria IL-6 en plasma a lo largo del tratamiento con amonio. La IL-6 está aumentada significativamente a 1 semana, comparado con ratas control (HA = 133 ± 19 % del control, $p < 0.05$). A las 2 (HA = 77 ± 9 % del control, $p < 0.05$) y 3-4 semanas (HA = 66 ± 10 % del control, $p < 0.05$), se produce una disminución significativa de sus niveles de expresión, por debajo de los niveles en ratas control. A las 5-6 y 8 semanas, no existen diferencias significativas entre controles e hiperamonémicas. El análisis estadístico con ANOVA de 2 vías y post test Bonferroni muestra una interacción significativa entre el tiempo y la hiperamonemia y un efecto significativo del tiempo ($p < 0.01$) (Fig. 12).

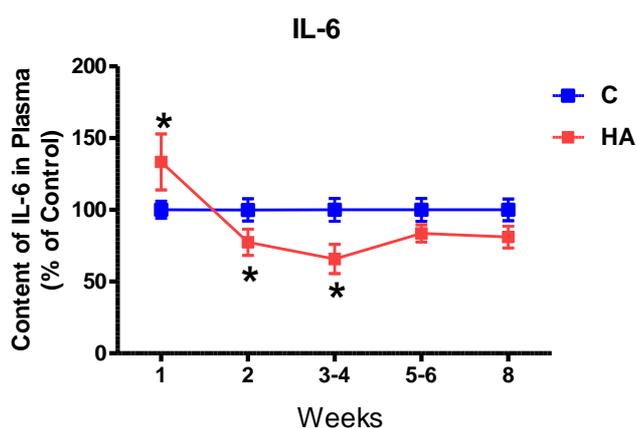


Figura 12. Contenido de IL-6 en plasma. Progresión temporal de IL-6 en plasma en ratas control e hiperamonémicas a 1, 2, 3-4, 5-6 y 8 semanas. Los valores son la media \pm SEM de 12-17 ratas por grupo. Los valores se expresan como % del control. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto al control, * $p < 0,05$.

4.3.2. Los niveles de IL-10 en plasma están disminuidos en ratas con hiperamonemia crónica.

El contenido de IL-10 en plasma está disminuido significativamente desde la semana 1-2 (HA = 68 ± 5 % del control), 3-4 (HA = 67 ± 9 % del control) y hasta las 5-6 semanas (HA = 67 ± 9 % del control) de hiperamonemia. A las 8 semanas, aumenta el contenido de IL-10 en el plasma de ratas hiperamonémicas hasta valores iguales que en las ratas control. El análisis estadístico con ANOVA de 2 vías y post test Bonferroni muestra una interacción significativa entre el tiempo y la hiperamonemia ($p < 0.001$) (Fig. 13).

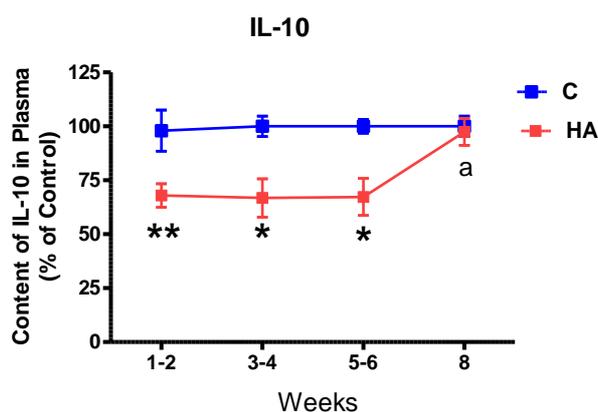


Figura 13. Contenido de IL-10 en plasma. Progresión temporal de IL-10 en plasma en ratas control e hiperamonémicas a 1-2, 3-4, 5-6 y 8 semanas. Los valores son la media \pm SEM de 9-14 ratas por grupo. Los valores se expresan como % del control. Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto al control * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$; a indica diferencia significativa con respecto a HA 1-2 semanas, $p < 0,05$.

4.3.3. Los niveles de IL-4 en plasma están disminuidos en ratas con hiperamonemia crónica a 1-2 semanas de hiperamonemia.

El contenido de IL-4 en plasma está disminuido significativamente a las 1-2 semanas comparado con las ratas control (HA = 74 ± 4 % del control; $p < 0.01$). A partir de ese momento se produce un aumento de su expresión y ya no hay diferencias respecto a las ratas control. El análisis estadístico con ANOVA de 2 vías y post test Bonferroni muestra una interacción significativa entre el tiempo y la hiperamonemia y un efecto significativo del tiempo ($p < 0.01$) (Fig. 14).

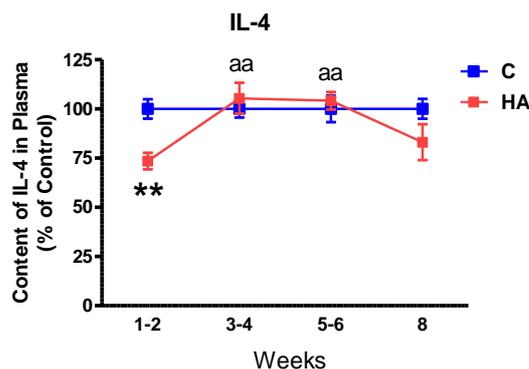


Figura 14. Contenido de IL-4 en plasma. Progresión temporal de IL-4 en plasma de ratas control e hiperamonémicas a 1-2, 3-4, 5-6 y 8 semanas. Los valores son la media \pm SEM de 9-12 ratas por grupo. Los valores se expresan como % del control. Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto al control, ** $p < 0.01$; a indica diferencia significativa con respecto a HA 1-2 semanas, aa $p < 0.01$.

4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Estudios recientes han demostrado que la inflamación periférica, junto con la hiperamonemia, son los principales mecanismos responsables de las alteraciones neurológicas en pacientes con EHM. Por ejemplo, en uno de los principales estudios que apoyan esta evidencia Montoliu et al. (2009) demuestran que los niveles de las citocinas pro-inflamatorias IL-6 e IL-18 en suero muestran una correlación positiva con la presencia y grado de EHM en pacientes cirróticos. En modelos animales de EHM se ha demostrado que existe neuroinflamación y que esta contribuye al deterioro cognitivo y motor (Cauli et al, 2007 y 2009; Rodrigo et al, 2010; Hernández-Rabaza et al, 2016a y b).

La neuroinflamación es también uno de los principales factores implicados en el desarrollo de algunas enfermedades neurodegenerativas, como el Alzheimer, Parkinson, esclerosis múltiple, esclerosis lateral amiotrófica y en el deterioro cognitivo que se produce en el envejecimiento (Chen et al, 2016).

4.1. **ACTIVACIÓN DE MICROGLÍA Y ASTROCITOS**

La microglía es el componente principal del sistema inmune en el cerebro. Su papel puede ser fisiológico o patológico, induciendo tanto efectos perjudiciales como beneficiosos sobre las neuronas. La microglía puede presentar diversos fenotipos funcionales. Se propone que la manipulación para cambiar los fenotipos de microglia de pro-inflamatorios (citotóxicos M1) a

anti-inflamatorio (neuroprotector M2) puede ser un enfoque terapéutico en algunas enfermedades neurodegenerativas con neuroinflamación asociada, tales como las enfermedades de Alzheimer o Parkinson y la esclerosis lateral amiotrófica (Tang et al, 2015) o en la EH (Hernández-Rabaza et al, 2016a).

La disminución, tanto del área como del perímetro de las células marcadas con Iba1 indica activación de microglía en las ratas con hiperamonemia crónica en hipocampo a las 2 y 4 semanas y en cerebelo solamente a las 2 semanas de hiperamonemia. Esto sugiere que la neuroinflamación es diferente en distintas áreas cerebrales y la activación de la microglía parece más duradera en el hipocampo que en el cerebelo. A las 8 semanas, la activación de la microglía revierte, ya no se observa variación de la morfología respecto a las ratas control en ninguna de las dos áreas (Figs. 3 y 8). Esto puede ser debido a un proceso adaptativo por el cual la respuesta inmune en el cerebro se adapta y ya no responde a la hiperamonemia.

Se observa un aumento de GFAP en las ratas control a las 2 semanas, comparado con el resto de tiempos, tanto en cerebelo como en hipocampo (Figs. 4 y 9). Esto puede ser debido a un problema con ese grupo de ratas o con su perfusión o inmunohistoquímica, ya que de momento solamente se ha podido realizar el experimento con un grupo de animales. Cualquier estrés repentino que hayan sufrido los animales, puede provocar un aumento en la expresión de GFAP, pues los astrocitos son un tipo celular que está continuamente proliferando. Se requieren más experimentos para confirmar los resultados. Una posible razón por la que únicamente la expresión de GFAP en los animales control está alterada a las dos semanas es que se cuantificó el contenido total de GFAP. En el momento de escanear el porta objetos, podría no haberse enfocado bien la imagen, la cual se vería borrosa o con más ruido de fondo, y esto afecta a este tipo de cuantificación. Sin embargo, en cualquier otro método de cuantificación, como por ejemplo, en el conteo de células positivas con respecto al total de células o en el análisis de área y perímetro, la marca sería eliminada de la cuantificación.

En el hipocampo de las ratas hipermonémicas se observa un aumento de GFAP respecto a las ratas control tras 4 semanas de hiperamonemia, lo cual indica activación de astrocitos a ese tiempo (Fig. 4). Por tanto, la activación de astrocitos sería posterior que la de la microglía (activada ya a 2 semanas de hiperamonemia).

Se ha demostrado que la neuroinflamación en el hipocampo contribuye al deterioro del aprendizaje y memoria espaciales observado en ratas con hiperamonemia a las 5 semanas, ya que un tratamiento que disminuye la neuroinflamación revierte las alteraciones de la memoria espacial (Hernández-Rabaza et al, 2016a).

En las ratas hiperamonémicas hay un aumento de la expresión de GFAP en cerebelo respecto a las ratas control, a los 3 días y 4 semanas de hiperamonemia. Estos resultados

sugieren que desde los 3 días de dieta y hasta las 4 semanas existe activación de astrocitos y por tanto debe haber neuroinflamación crónica en la sustancia blanca del cerebelo. A las 8 semanas de hiperamonemia no hay diferencia con los controles en la expresión de GFAP, debido a que se produce un aumento de la expresión en las ratas control. Por tanto, sigue existiendo expresión aumentada de GFAP en las ratas con hiperamonemia crónica, pero también en los controles, probablemente debido a la edad.

Se ha demostrado que la neuroinflamación en el cerebelo contribuye a la incoordinación motora en ratas con hiperamonemia a las 4 semanas, ya que un tratamiento que disminuye la neuroinflamación mejora la coordinación motora (Hernández-Rabaza et al, 2016b).

A diferencia del hipocampo, en el cerebelo la activación de astrocitos es más temprana que la de la microglía, apoyando la idea de que los mecanismos de neuroinflamación son diferentes en las dos áreas.

Liu et al. (2011), encontraron un punto de conexión entre la activación de la microglía y los astrocitos. La activación de la microglía y de astrocitos se produce espacial y temporalmente con patrones distintos de proliferación, fagocitosis y liberación de citocinas pro-inflamatorias o factores de crecimiento. La activación de la microglía supone una invasión hacia la zona infectada, fagocitosis y secreción de más citocinas para inducir la proliferación de más células. Además, promueven la reparación tisular secretando factores de crecimiento que facilitan la vuelta a la homeostasis. Los astrocitos, cuando se produce un daño, favorecen la reparación, mantenimiento y sustitución de aquellas células que no pueden regenerar. Ambos son reconocidos como participantes activos en diversas condiciones patológicas tales como un traumatismo, accidente cerebrovascular o trastornos neurodegenerativos crónicos. Su activación está estrechamente relacionada con el desarrollo y gravedad de enfermedades neurodegenerativas. La microglía se activa antes que los astrocitos y promueve la activación de los mismos mediante la síntesis de IL-1. Los astrocitos no solo facilitan la activación de la microglía, sino que también pueden inhibir algunas actividades de la misma, como por ejemplo, disminuir su producción de óxido nítrico, especies reactivas de oxígeno o TNF- α . De este efecto es responsable el TGF β sintetizado y liberado por los astrocitos, que disminuye la expresión de citocinas pro-inflamatorias por parte de la microglía (Liu et al, 2011). La expresión de TGF β y de interleucinas anti-inflamatorias en cerebelo e hipocampo está pendiente de análisis en las ratas de este estudio.

4.2. EXPRESIÓN DE CITOCINAS

TNF- α es una citocina pro-inflamatoria que se secreta al principio del proceso inflamatorio. Son muchas las evidencias que muestran que TNF- α es un regulador clave en

daños del sistema nervioso central después de una lesión aguda y en condiciones de inflamación crónica (Probert, 2015). Además, es una citocina que juega un papel importante en la inducción y mantenimiento de la respuesta inflamatoria, desencadenando una cascada de otras citocinas pro-inflamatorias, como son la IL-1 β , IL-6 e IL-8 (Siebert et al, 2015). TNF- α es también producido constitutivamente por el SNC por varias poblaciones de células, particularmente microglía y astrocitos (Probert, 2015).

IL-1 β es una citocina pro-inflamatoria importante en la respuesta inmune, ejerciendo un papel clave en la aparición y desarrollo de la síntesis de citocinas en el proceso inflamatorio y en la duración de la respuesta inmune. Además, está implicada en la degeneración neuronal, promoviendo su actividad acetilcolinesterasa y una activación de la microglía (Rubio-Pérez et al, 2012).

En el hipocampo se observa una variación en la expresión tanto de TNF- α como de IL-1 β a lo largo del tiempo en las ratas control. Con respecto a TNF- α , se observa un aumento (significativo en GD a 4 semanas) a las 4 y 8 semanas con respecto a los 3 días (Fig. 5). Este aumento podría ser debido simplemente al paso del tiempo y “envejecimiento” de las ratas, aunque son todavía jóvenes, aproximadamente tienen 3 meses de edad a las 8 semanas de empezar la dieta hiperamonémica. A las 8 semanas hay una disminución significativa del contenido de IL-1 β en la región CA1 en el hipocampo de las ratas control (Fig. 6). Hay muchas publicaciones que hacen referencia a un aumento de la expresión de citocinas en animales con edad avanzada comparado con los animales con una menor edad (Fagiolo et al, 1993; Plackett et al, 2004 y Franceschi et al, 2007). El envejecimiento está acompañado de cambios cuantitativos y cualitativos en el sistema inmune, resultando así en una mayor susceptibilidad a las neoplasias, infecciones o desordenes autoinmunes. Se sugiere que una de las mayores características del envejecimiento es el microambiente pro-inflamatorio. Kinga et al (2012) demostraron cómo la edad, y especialmente el fenómeno de envejecimiento asociado a la inflamación, influencia las reacciones del sistema inmune. En este estudio se demostró que la IL-1, IL-6 e IL-10 aumentan su expresión con la edad; la expresión de TGF- β disminuye con la edad, mientras que la de IFN- γ aumenta con la edad; finalmente, el TNF- α , no sufría ninguna variación con la edad. La disminución de IL-1 β en las ratas control podría deberse a un aumento de interleucinas anti-inflamatorias como IL-10 o TGF β a ese tiempo, las cuales inhibirían la expresión de IL-1 β , pro-inflamatoria.

Se puede observar cómo a las 2 y 4 semanas hay una disminución de IL-1 β en el hipocampo con respecto a 3 días en las ratas hiperamonémicas. Esto podría explicarse si hay una respuesta de las células al estímulo (amonio) que consiste en la liberación de interleucinas anti-inflamatorias que frenarían la liberación de las pro-inflamatorias como IL-1 β . Por ello, está

previsto analizar el contenido de las interleucinas IL-4 e IL-10 en estas mismas ratas, próximamente.

Un aumento en el contenido de TNF- α se observa a las 2 semanas de hiperamonemia, tanto en la región CA1 como en GD de hipocampo, pero el contenido de TNF- α es menor a las 4 y 8 semanas hiperamonemia, siendo ya igual que en ratas control. Esto sugiere que hay una expresión transitoria de TNF- α a lo largo del tiempo de hiperamonemia crónica y después ya no está aumentado, aunque posiblemente TNF- α ha inducido la liberación de otros factores inflamatorios que ejercerán su papel más tarde, como por ejemplo de IL-1 β , que aumenta a las 8 semanas de hiperamonemia, u otros factores que se analizarán también próximamente en el laboratorio. También se observa un aumento (aunque no significativo) de TNF- α a los 3 días con respecto a las control, solamente en CA1, apoyando la idea de diferentes patrones espaciales y temporales de expresión de factores inflamatorios, es decir, que el entorno afecta a la expresión de factores inflamatorios, como se ha comentado en la Introducción. Estos resultados están de acuerdo con el hecho de que TNF- α se secreta al principio en un proceso inflamatorio y después disminuye su expresión.

La expresión de la IL-1 β , también pro-inflamatoria, no está aumentada hasta las 8 semanas de hiperamonemia en hipocampo, indicando que la expresión de IL-1 β se produce más tarde que la de TNF- α tras el comienzo del daño.

En hipocampo, IL-1 β y TNF- α se expresan sobretodo en neuronas de CA1 y GD. No se sabe si la síntesis de estos factores inflamatorios se produce en las neuronas o si están unidos a sus receptores de membrana.

En cerebelo, el patrón temporal de expresión de TNF- α e IL-1 β es similar al de hipocampo. Se observa un aumento significativo de los niveles de expresión de TNF- α a 4 semanas de hiperamonemia, seguido de una disminución a las 8 semanas. Los niveles de IL-1 β aumentan ligeramente a las 4 y 8 semanas con respecto al control, aunque el aumento no es significativo con los datos actuales. En cerebelo, TNF- α e IL-1 β se expresan en células gliales, como microglía, astrocitos u oligodendrocitos, aunque no sabremos si se expresa también en neuronas como en el caso de hipocampo hasta que no se analicen otras zonas del cerebelo como la capa granular y la de Purkinje, ya que solamente se ha analizado la sustancia blanca, con células gliales principalmente.

La neuroinflamación modula la neurotransmisión. Hernández-Rabaza et al (2016a y b) demostraron que la activación de microglía y astrocitos inducida por la hiperamonemia conlleva una alteración en los niveles de expresión en membrana de receptores de neurotransmisores, viéndose así afectada la neurotransmisión. Las alteraciones en la neurotransmisión serían responsables de las alteraciones cognitivas y motoras. El tratamiento

con un anti-oxidante (sulforafano), consigue reducir la neuroinflamación y con ello normalizar la expresión en membrana de dichos receptores y recuperar la capacidad de aprendizaje y memoria y la coordinación motora.

Esto sugiere que la progresión de la neuroinflamación en el tiempo debe afectar también a la neurotransmisión a lo largo del tiempo de hiperamonemia crónica y por tanto las alteraciones neurológicas deben ir progresando con el tiempo en los modelos animales y posiblemente también en los pacientes cirróticos. Estos datos deben ser tenidos en cuenta a la hora de establecer estrategias terapéuticas para los pacientes con EHM y refuerzan la importancia de establecer pruebas diagnósticas que den idea del estado de progresión de la enfermedad.

4.3. PAPEL DE LA INFLAMACIÓN PERIFÉRICA

Una vez hemos demostrado que existe neuroinflamación en ratas hiperamonémicas, la cual evoluciona con el tiempo de hiperamonemia crónica, a continuación se analiza si la hiperamonemia induce inflamación periférica y si ésta también progresa con el tiempo de hiperamonemia crónica, con el objetivo de caracterizar el papel que desempeña la inflamación periférica en la inducción y progresión de la neuroinflamación en hiperamonemia.

En el plasma hemos analizado la expresión de la IL-6, como citocina pro-inflamatoria y de las citocinas anti-inflamatorias IL-4, IL-10. No se ha analizado el contenido de TNF- α e IL-1 β en el plasma porque sus niveles están por debajo, o muy cerca, de los niveles de detección de los anticuerpos para rata. La cantidad de sangre que se puede extraer a una rata es insuficiente para determinar con fiabilidad los niveles de estas citocinas, a no ser que se induzca su expresión potentemente. Sin embargo, sí es detectable el contenido de IL-6 en plasma de rata.

Los niveles de IL-6 se han encontrado elevados en el plasma y también en cerebro y líquido cefalorraquídeo en pacientes y en modelos animales de Alzheimer (Wang et al, 2015). La IL-6 en el cerebro puede estimular a los astrocitos y microglía para liberar una cascada de citocinas pro-inflamatorias.

Tras la liberación inicial de citocinas pro-inflamatorias, comienza el proceso anti-inflamatorio, en el que diferentes tipos celulares liberan citocinas anti-inflamatorias con el objetivo de volver a una homeostasis. Estas citocinas inhibitoras pueden suprimir la producción de citocinas pro-inflamatorias. La consecuencia clínica de una desregulación en este balance, como por ejemplo unos niveles elevados de citocinas pro-inflamatorias o unos bajos niveles o actividad de citocinas anti-inflamatorias, puede conducir a una sobreactivación del ciclo celular y citotoxicidad.

Los resultados obtenidos muestran un aumento de la expresión de IL-6 a 1 semana de hiperamonemia, comparado con las ratas control (Fig. 12). A partir de las dos semanas, su expresión disminuye.

Al comienzo del periodo de hiperamonemia, 1-2 semanas, las interleucinas anti-inflamatorias, IL-4 e IL-10, están disminuidas en las ratas hiperamonémicas comparadas con el grupo control, lo cual contribuiría, junto al aumento de IL-6, a un desplazamiento del balance pro y anti-inflamatorio hacia el estado pro-inflamatorio.

Las IL-4 y la IL-10 tienen efectos inhibitorios en la expresión y liberación de citocinas pro-inflamatorias, como por ejemplo IL-1, TNF- α , IL-6 o IL-8 (Rubio-Pérez et al, 2012). Esto podría explicar los resultados obtenidos en plasma, pues el aumento de la expresión de IL-6 (citocina pro-inflamatoria) se da en la semana 1 y a continuación disminuye cuando aumenta el contenido en plasma de la IL-4, en las ratas hiperamonémicas. La disminución de los niveles de IL-10 en plasma en las ratas hiperamonémicas podría también ser responsable del aumento de expresión de otras interleucinas pro-inflamatorias, como IL-17, IL-21 y muchas otras, que estamos ahora analizando en el laboratorio.

Nuestros resultados estarían de acuerdo con un papel de la inflamación periférica en la inducción de la neuroinflamación en hiperamonemia crónica. El amonio alteraría la expresión de citocinas en sangre, las cuales llegan a los órganos donde la barrera hematoencefálica es más permeable o bien estimulan receptores en células endoteliales provocando la secreción de citocinas inflamatorias en el cerebro y por consiguiente, neuroinflamación. El aumento de IL-6 pocos días tras empezar la hiperamonemia estaría conforme con la neuroinflamación temprana, como el aumento de TNF- α a las 2 semanas de hiperamonemia en hipocampo y cerebelo.

La activación de astrocitos a los 3 días de hiperamonemia en el cerebelo podría deberse a la transducción de la inflamación periférica pero también a un efecto directo del amonio que aumentaría rápidamente la actividad de la glutamina sintetasa y la glutamina, lo cual podría alterar su función.

Por otra parte, la normalización de los niveles de citocinas, tanto pro como anti-inflamatorias en plasma de ratas a las 8 semanas de hiperamonemia, coincide con la normalización también de la activación de microglía o los niveles de TNF- α en el cerebro, sugiriendo que se produce un proceso adaptativo por el cual la inflamación y neuroinflamación inicial evoluciona y se normaliza con respecto a las ratas control, aunque no completamente, pues los niveles de IL-1 β sí están aumentados en hipocampo a las 8 semanas de hiperamonemia crónica.

Actualmente se está analizando el contenido de éstos y otros factores inflamatorios en periodos cortos de tiempo tras empezar la hiperamonemia para caracterizar mejor esta fase temprana de la inflamación periférica.

5. CONCLUSIONES

1. La hiperamonemia crónica induce patrones temporales de activación de microglía y astrocitos y de expresión de factores inflamatorios diferentes según el área cerebral, hipocampo o cerebelo y también en diferentes subregiones del hipocampo.
2. La activación de astrocitos parece producirse más tempranamente en el cerebelo que en el hipocampo, mientras que la activación de la microglía se produce al mismo tiempo en las dos áreas, aunque permanece más tiempo activada en hipocampo que en cerebelo.
3. El aumento de TNF- α se produce antes (2 semanas) en hipocampo que en cerebelo (4 semanas).
4. La IL-1 β está más afectada por la hiperamonemia en el hipocampo que en el cerebelo.
5. La hiperamonemia provoca inflamación periférica, alterando la expresión de interleucinas pro y anti-inflamatorias de manera dependiente del tiempo de hiperamonemia.
6. La evolución temporal de la inflamación periférica debe contribuir a la progresión de la neuroinflamación.

6. BIBLIOGRAFÍA

AGUILAR, MA.; MIÑARRO, J. and FELIPO, V. (2000). Chronic moderate hyperammonemia impairs active and passive avoidance behavior and conditional discrimination learning in rats. *Experimental Neurology*. 161: 704-713.

AGUSTI, A.; CAULI, O.; RODRIGO, R.; LLANSOLA, M.; HERNÁNDEZ-RABAZA, V.; and FELIPO, V. (2011). p38 MAP kinase is a therapeutic target for hepatic encephalopathy in rats with portacaval shunts. *Gut*. 60(11): 1572-1579.

ALOISI, F. (2001). Immune function of microglia. *Glia*. 36(2): 165-79.

AZORÍN, I.; MINANA, MD.; FELIPO, V. and GRISOLIA, D. (1989) A simple animal model of hiperammonemia. *Hepatology*. 10: 311-314.

BENTIVOGLIO M, M.R. and BERTINI G. (2010). Neuroinflammation and brain infections: historical context and current perspectives. *Brain Res Rev*. 66(1-2): 152-73.

CAULI, O.; RODRIGO, R.; PIEDRAFITA, B.; BOIX, J. and FELIPO, V. (2007). Inflammation and hepatic encephalopathy: ibuprofen restores learning ability in rats with portacaval shunts. *Hepatology*. 46: 514-519.

CAULI, O.; REGINA, R.; PIEDRAFITA, B.; LLANSOLA, M.; MANSOURI, M.T. and FELIPO, V. (2009). Neuroinflammation Contributes to Hypokinesia in Rats With Hepatic Encephalopathy: Ibuprofen Restores Its Motor Activity. *Journal of Neuroscience Research*. 87: 1369-1374.

CHEN, W-W.; ZHANG, X. and HUANG, W-J. (2016). Role of neuroinflammation in neurodegenerative diseases. *Molecular medicine reports*. 13: 3391-3396.

CHHOR, V.; LE CHARPENTIER, T.; LEBON, S.; ORÉ, MV.; CELADOR, I.; JOSSERAND, J.; DEGOS, V.; JACOTOT, E.; HAGBERG, H.; SÄVMAN, K.; MALLARD, C.; GRESSENS, P. and FLEISS, B. (2013). Characterization of phenotype markers and neuronotoxic potential of polarised primary microglia in vitro. *Brain Behavior Immunology*. 32: 70-85.

CHUNG, YC.; K.H.; BOK, E.; PARK, ES.; HUH, SH.; NAM, JH. and JIN, BK. (2010). The role of neuroinflammation on the pathogenesis of Parkinson's disease. *BMB Rep*. 43(4): 225-32.

DOUKAS J, P.J. (1990). IFN- γ enhances endothelial activation induced by tumor necrosis factor but not IL-1. *J. Immunol*. 145: 1727-3325.

FAGIOLO, U.; COSSARIZZA, A.; SCALA, E.; FANALES-BELASIO, E.; ORTOLANI, C.; COZZI, E.; MONTI, D.; FRANCESCHI, C. and PAGANELLI, R. (1993). Increased cytokine production in mononuclear cells of healthy elderly people. *Eur J Immunol*. 23: 2375-2378.

FARINA, C.; ALOISI, F. and MEINL, E. (2007). Astrocytes are active players in cerebral innate immunity. *Trends Immunol*. 28: 138-145.

FELIPO, V.; MIÑANA, MD. and GRISOLÍA, S. (1998) Long-term ingestion of ammonium increases acetylglutamate and urea levels without affecting the amount of carbamoyl-phosphate synthase. *Eur Journal*. 176: 567-571.

FELIPO, V. (2013). Hepatic encephalopathy: effects of liver failure on brain function. *Nature Reviews Neuroscience*. 14: 851-858.

FELIPO, V. and BUTTERWORTH, R.F. (2002). Neurobiology of ammonia. *Progress in Neurobiology*. 67: 259-279.

FELDMANN, M, B.F.; FOXWELL, BM. and MAINI, RN. (2001). The role of TNF alpha and IL-1 in rheumatoid arthritis. *Curr Dir Autoimmun*. 3: 188-99.

FRANCESCHI, C.; CAPRI, M.; MONTI, D.; GIUNTA, S.; OLIVIERI, F.; SEVINI, F.; PANOURGIA, MP.; INVIDIA, L.; CELANI, L.; SCURTI, M.; CEVENINI, E.; CASTELLANI, GC. and SALVIOLI, S. (2007). Inflammaging and anti-inflammaging: a systemic perspective on aging and longevity emerged from studies in humans. *Mech Ageing Dev*. 128: 92-105.

GAO, X.; C.H.; SCHWARZSCHILD, MA. and ASCHERIO, A. (2011). Use of ibuprofen and risk of Parkinson disease. *Neurology*. 76(10): 863-9.

GHOSH, M.; XU, YOUNG and PEARSE, D. (2016). Cyclic AMP is a key regulatory of M1 to M2a phenotypic conversion of microglia in the presence of Th2 cytokines. *Journal of neuroinflammation*. 13: 9.

HERNÁNDEZ-RABAZA, V.; CABRERA-PASTOR, A.; TAORO-GONZALEZ, L.; MALAGARNERA, M.; AGUSTI, A.; LLANSOLA M. and FELIPO, V. (2016a). Hyperammonemia induces glial activation, neuroinflammation and alters neurotransmitter receptors in hippocampus, impairing spatial learning: reversal by sulforaphane. *Journal of Neuroinflammation*. 13: 41.

HERNÁNDEZ-RABAZA, V.; CABRERA-PASTOR, A.; TAORO-GONZALEZ, L.; GONZALEZ-USANO, A.; AGUSTI, A.; BALZANO, T.; LLANSOLA M. and FELIPO, V. (2016b). Neuroinflammation increases GABAergic tone and impairs cognitive and motor function in hyperammonemia by increasing GAT-3 membrane expression. Reversal by sulforaphane by promoting M2 polarisation of microglia. *Journal of Neuroinflammation*. 13: 83.

HIRASAWA, T.; O.K. and IMAI, Y. (2005). Visualization of microglia in living tissues using Iba1EGFP transgenic mice. *J Neuroscience Res*. 81: 357-362.

IMAI, Y.; I.I.; ITO, D.; OHSAWA, K. and KOHSAKA, S. (1996). A novel gene iba1 in the major histocompatibility complex class III region encoding an EF hand protein expressed in a monocytic lineage. *Biochem Biophys Res Commun*. 224: 855-862.

IMAI, Y. and KOHSAKA, S. (2002). Intracellular signaling in M-CSF induced microglia activation: role of Iba-1. *GLIA*. 40: 164-174.

ITO, D.; T.K.; SUZUKI, S.; DEMBO, T. and FUKUUCHI, Y. (2001). Enhanced expression of Iba1, ionized calcium-binding adapter molecule 1, after transient focal cerebral ischemia in rat brain. *Stroke*. 32: 1208-1215.

JI, KA.; JEONG, HK.; MIN, KJ.; KANG, SH.; JOU, I. and JOE, EH. (2007). Resident microglia die and infiltrated neutrophils and monocytes become major inflammatory cells in lipopolysaccharide-injected brain. *Glia*. 55(15): 1577-88.

KINGA, M.; DUTKIEWICZ, J.; GOLEC, M.; CHILOSI, M.; SKORSKA, C.; HUAUX, F.; PASTENA, C.; PEDICA, F.; SITKOWSKA, J.; LISOWSKA, Q.; CHOLEWA, G.; ZWOLINSKI, J.; MACKIEWICZ, B.; GORA-FLOREK, A.; ZIESCHE, R. and MILANOWSKI, J. (2015). Age influence on mice lung tissue response to *Aspergillus fumigatus* chronic exposure. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*. 22(1): 69-75.

LIU, W.; TANG, Y. and FENG, J. (2011). Cross talk between activation of microglia and astrocytes in pathological conditions in the central nervous system. *Life Sciences*. 89(5-6): 141-6.

MCGEER, EG. and M.P. (2010). Neuroinflammation in Alzheimer's Disease and Mild Cognitive Impairment: A Field in Its Infancy. *J Alzheimer Disease*. 19(1): 355-61.

MEDZHITOV, R. and JANEWAY, C.J. (2000). Innate immune recognition: mechanisms and pathways. *Immunol Review*. 173: 89-97.

MONTOLIU, C.; PIEDRAFITA, B.; SERRA, MA.; DEL OLMO, JA.; URIOS, A.; RODRIGO, JM. and FELIPO, V. (2009). IL-6 and IL-18 in blood may discriminate cirrhotic patients with and without minimal hepatic encephalopathy. *Journal of Clinical Gastroenterology*. 43(3): 272-9.

MONTOLIU, C.; LLANSOLA, M. and FELIPO, V. (2015). Neuroinflammation and neurological alterations in chronic liver diseases. *Reviews Neuroimmunology and inflammation*. 55(1-3): 106-112.

NAKAJIMA, K. and K.S., (2001). Microglia: activation and their significance in the central nervous system. *J Biochem*. 130.

OHSAWA, K.; I.Y.; KANAZAWA, H.; SASAKI, Y. and KOHSAKA, S. (2000). Involvement of Iba1 in membrane ruffling and phagocytosis of macrophages/microglia. *J Cell Sci*. 113: 3073-3084.

PLACKETT, TP.; BOEHMER, ED.; FAUNCE, DE. and KOVACS, EJ. (2004). Aging and innate immune system. *J Leukoc Biol*. 76: 291-299.

PROBERT, L. (2015). TNF and its receptors in the CNS: the essential, the desirable and the deleterious effects. *Neuroscience*. 302: 2-22.

RAFTERY, G.; HE, J.; PEARCE, R.; BIRCHALL, D.; NEWTON, JL.; BLAMIRE, AM. and ISAACS, JD. (2012). Disease activity and cognition in rheumatoid arthritis: an open label pilot study. *Arthritis Res Ther*. 14(6): R263.

RODRIGO, R.; CAULI, O.; GOMEZ-PINEDO, U.; AGUSTI, A.; HERNANDEZ-RABAZA, V.; GARCIA VERDUGO, JM. and FELIPO, V. (2010). Hyperammonemia induces neuroinflammation that contributes to cognitive impairment in rats with hepatic encephalopathy. *Gastroenterology*. 139(2): 675-84.

ROSE, CF. (2012). Ammonia-Lowering Strategies for the Treatment of Hepatic Encephalopathy. *Clinical pharmacology & Therapeutics*. 92(3).

RUBIO-PÉREZ, JM. and MORILLAS-RUIZ, JM. (2012). A Review: Inflammatory Process in Alzheimer's Disease, Role of Cytokines. *The Scientific World Journal*. 2012: 756357.

SCHRODE, JM.; HENNEICKEH, H.; PREISSNER, WC. and CHRISTOPHERS, E. (1990). IL-1 β or tumor necrosis factor- α stimulate release of three NAP-1/IL-8-related neutrophil chemotactic proteins in human dermal fibroblasts. *J. Immunology*. 144: 2223-32.

SEYAN, H.R. and SHAWCROSS, DL. (2010). Changing face of hepatic encephalopathy: role of inflammation and oxidative stress. *World J Gastroenterology*. 16(27): 3347- 57.

SIEBERT, S.; TSOUKAS, A.; ROBERTSON, J. and MCINNES, L. (2015). Cytokines as therapeutic targets in rheumatoid arthritis and other inflammatory diseases. *Pharmacology Review*. 67: 280–309.

SLOWIK, A.; C.-M.I., BODGAL, J. and SZCZUDLIK A. (2001). The diagnosis of subclinical hepatic encephalopathy. *Przegl Lek*. 58(12): 1059-62.

SOFRONIEW, M.V. and VINTERS H.V. (2010). Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathology*. 119: 7-35.

TANG, Y. and LE, W. (2015). Differential Roles of M1 and M2 Microglia in Neurodegenerative Diseases. *Molecular Neurobiology*. 53: 1181-1194.

VALLEJO, R.; VOGEL, L. and BENYAMIN, R. (2010). The role of glia and the immune system in the development and maintenance of neuropathic pain. *Pain Pract*. 10(3): 167-84.

WANG, W-Y.; TAN, M-S.; YU, JT and TAN, L. (2015). Role of pro-inflammatory cytokines released from microglia in Alzheimer's disease. *Annals of Translational Medicine*. 3(10): 136.

WEISSENBORN, K.; ENNEN, JC.; SCHOMERUS, H.; RUCKERT, N. and HECKER, H. (2001). Neuropsychological characterization of hepatic encephalopathy. *Hepatology*. 34(5): 768-773.

ZEMTSOVA, I.; GÖRG, B.; KEITEL, V.; BIDMON, HJ.; SCHRÖR, K. and HÄUSSINGER, D. (2011). Microglia activation in hepatic encephalopathy in rats and humans. *Hepatology*. 54(1): 204-15.