

# UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA



## ***CARACTERIZACIÓN DE LA NEUROINFLAMACIÓN EN CEREBELO Y DE LAS ALTERACIONES NEUROLÓGICAS ASOCIADAS EN PACIENTES CON ENFERMEDAD HEPÁTICA***

TRABAJO FIN DE MÁSTER EN BIOTECNOLOGÍA BIOMÉDICA

ALUMNA: Natalia Varela Andrés

TUTORES EXTERNOS: Carmina Montoliu y Tiziano Balzano

TUTOR UPV: Máximo Ibo Galindo

***Curso Académico: 2018/2019***

**VALENCIA, JULIO DE 2019**



# RESUMEN

La encefalopatía hepática (EH) engloba un conjunto de trastornos neuropsiquiátricos complejo que aparece como consecuencia de un daño hepático severo, principalmente cirrosis. Cuando el hígado sufre dicho daño, disminuye su capacidad detoxificadora, de modo que comienzan a acumularse en el organismo amonio y otras sustancias que pueden afectar negativamente al sistema nervioso. La EH incluye un amplio rango de alteraciones neurológicas, tales como trastornos del sueño, deterioro cognitivo y de la coordinación, trastornos de la personalidad y pérdida de la consciencia. La gravedad de la sintomatología es muy variable, comenzando con un deterioro mental leve y pudiendo agravarse hasta un estado de coma o incluso la muerte del paciente.

La encefalopatía hepática mínima (MHE) es una fase temprana de la EH que se caracteriza por un deterioro cognitivo leve, déficit de atención y una disminución de la capacidad psicomotora. La EHM disminuye la calidad de vida de los pacientes y puede progresar a EH clínica. Para detectar y evaluar la EHM, se han establecido como test de referencia la batería PHES (Psychometric Hepatic Encephalopathy Score), pero se sospecha que no tienen una sensibilidad suficiente para el diagnóstico.

El cerebelo desempeña un papel clave en la regulación de la función motora. En muestras de tejido cerebeloso de pacientes con distintos grados de enfermedad hepática se ha observado activación de microglía, neuroinflamación, infiltración linfocitaria y una pérdida neuronal significativa. Sin embargo, aún no se conocen en detalle muchos de los mecanismos moleculares implicados.

Los objetivos principales del presente trabajo consisten en evaluar la sensibilidad del PHES para detectar alteraciones motoras tempranas en pacientes cirróticos, y caracterizar la neuroinflamación en cerebelo a nivel celular y molecular. Para cumplir dichos objetivos, se ha realizado un estudio en pacientes utilizando la batería PHES y test psicomotores complementarios. Por otro lado, se ha analizado, mediante inmunohistoquímica, el contenido de las moléculas mediadoras de la inflamación TNF- $\alpha$ , glutaminasa y CCL20 en distintas capas del cerebelo en muestras post mórtem de pacientes con distintos grados de enfermedad hepática.

Los resultados obtenidos demuestran que el PHES no tiene sensibilidad suficiente para el diagnóstico, pues los pacientes cirróticos clasificados como sin EHM ya muestran alteraciones motoras. Los pacientes con distinto grado de daño hepático muestran un aumento en el contenido del TNF- $\alpha$ , glutaminasa en las capas granular y de Purkinje, y de CCL20 en meninges, que se inicia ya en etapas previas a la cirrosis. Estos resultados sugieren que los factores analizados podrían ser responsables del aumento de la neuroinflamación y la infiltración linfocitaria ya observada en cerebelo, promoviendo el desarrollo de las alteraciones motoras de los pacientes.

**Palabras clave:** CCL20; cerebelo; cirrosis; encefalopatía hepática; encefalopatía hepática mínima; esteatohepatitis; glutaminasa; test psicométricos; TNF- $\alpha$ .

## ABSTRACT

Hepatic encephalopathy (HE) includes a complex set of neuropsychiatric disorders that appear as a consequence of severe liver damage, mainly cirrhosis. Liver damage leads to a decrease in its detoxifying capacity, so that there is an accumulation of ammonium and other substances in the organism that can affect negatively the nervous system. HE includes a wide range of neurological alterations, such as sleep disorders, cognitive and coordination impairment, personality disorders and loss of consciousness. The severity of the symptoms is very variable, from mild cognitive impairment to coma or even the death of the patient.

Minimal hepatic encephalopathy (MHE) is an early stage of HE, characterized by mild cognitive impairment, attention deficit, and the decrease of psychomotor abilities. MHE reduces the quality of life of patients and can progress to clinical EH. In order to detect and evaluate MHE, PHES (Psychometric Hepatic Encephalopathy Score) battery has been established as a gold standard for the diagnosis, but it is suspected that these tests are not sensitive enough.

Cerebellum plays a key role in regulating the motor function. It has been shown microglia activation, neuroinflammation, lymphocyte infiltration and significant neuronal loss in cerebellar tissue from patients with different degrees of liver disease. However, many of the molecular mechanisms involved are still not known in detail.

The aim of this work is to evaluate the sensitivity of PHES to detect early motor alterations in cirrhotic patients, and to characterize cellular and molecular mechanisms involved in neuroinflammation. To achieve these objectives, a group of cirrhotic patients has been evaluated using the PHES battery and complementary psychomotor tests. On the other hand, the content of the inflammation mediators TNF- $\alpha$ , glutaminase and CCL20 in different layers of the cerebellum has been analyzed, using immunohistochemistry, in post-mortem cerebellar tissue samples of patients with different stages of liver disease.

The results prove that PHES is not sensitive enough for the diagnosis, since cirrhotic patients classified as without MHE already show motor alterations. Cerebellum from patients with different degrees of liver damage show higher level of TNF- $\alpha$ , glutaminase in the granular and Purkinje layers, and the same for CCL20 in meninges. This increase starts already in stages prior to cirrhosis. These results suggest that the analysed factors could be responsible to promote neuroinflammation and infiltration of immune cells in cerebellum, leading to motor alterations reported in patients.

**Keywords:** CCL20; cerebellum; cirrhosis; glutaminase; hepatic encephalopathy; minimal hepatic encephalopathy; psychometric tests; steatohepatitis; TNF- $\alpha$ .

# ÍNDICE

<b>1</b>	<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
1.1	<b>Encefalopatía Hepática: características generales</b>	<b>1</b>
1.1.1	Diagnóstico temprano del deterioro neurológico: pruebas psicométricas	2
1.2	<b>Clasificación de la EH</b>	<b>2</b>
1.3	<b>Patogénesis</b>	<b>5</b>
1.3.1	El hígado	6
1.3.1.1	Esteatosis hepática	8
1.3.1.2	Esteatohepatitis	9
1.3.1.3	Regeneración hepatocelular, fibrogénesis y progresión a cirrosis	10
1.3.2	Hiperamonemia	12
1.3.3	Inflamación periférica y neuroinflamación	14
1.4	<b>Alteraciones neurológicas de la EH: papel del cerebelo</b>	<b>16</b>
<b>2</b>	<b>HIPÓTESIS</b>	<b>19</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>20</b>
<b>4</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>21</b>
4.1	<b>Estudio en pacientes cirróticos</b>	<b>21</b>
4.1.1	Determinación de los niveles de amonio en sangre	22
4.1.2	Clasificación de pacientes mediante la batería PHES	23
4.1.3	Estudio de las alteraciones motoras: test de coordinación	25
4.1.3.1	Test de coordinación bimanual	25
4.1.3.2	Test de coordinación visomotora	26
4.2	<b>Análisis post mórtem de muestras de cerebelo humano</b>	<b>26</b>
4.2.1	Inmunohistoquímica	28
4.2.2	Análisis de las imágenes de inmunohistoquímica	29
4.2.2.1	Contenido de TNF- $\alpha$ y glutaminasa en corteza cerebelosa	29
4.2.2.2	Cuantificación de nucléolos con marca de TNF- $\alpha$	30
4.2.2.3	Análisis de CCL20 en meninges	31
4.3	<b>Análisis estadístico</b>	<b>31</b>
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>32</b>
5.1	<b>Alteraciones neurológicas en pacientes cirróticos</b>	<b>32</b>
5.1.1	La batería PHES no detecta todos los pacientes con déficits motores tempranos	32
5.1.2	Los niveles de amonio aumentan en los pacientes cirróticos	33
5.2	<b>Estudio en muestras post mórtem de cerebelo de pacientes con distintos grados de enfermedad hepática</b>	<b>33</b>
5.2.1	El contenido de TNF- $\alpha$ en cerebelo aumenta ya en esteatohepatitis leve	34
5.2.1.1	El contenido de glutaminasa aumenta en estadios más avanzados de la enfermedad hepática	38
5.2.2	La expresión de CCL20 aumenta drásticamente en esteatohepatitis leve y moderada	41
<b>6</b>	<b>DISCUSIÓN</b>	<b>43</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSIONES</b>	<b>49</b>
<b>8</b>	<b>REFERENCIAS</b>	<b>50</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Patogénesis de la EH .....	5
<b>Figura 2.</b> Estructura del lobulillo hepático .....	6
<b>Figura 3.</b> Arquitectura microscópica hepática.....	7
<b>Figura 4.</b> Ciclo de la urea.....	13
<b>Figura 5.</b> Corte histológico de cerebelo humano teñido con hematoxilina.....	16
<b>Figura 6.</b> Batería de test psicométricos PHES.....	24
<b>Figura 7.</b> Test de coordinación motora.....	26
<b>Figura 8.</b> Resultados de los test de coordinación .....	32
<b>Figura 9.</b> Concentración de amonio en sangre periférica .....	33
<b>Figura 10.</b> Contenido de TNF- $\alpha$ en capa de Purkinje de cerebelo.....	34
<b>Figura 11.</b> Intensidad promedio de TNF- $\alpha$ en neuronas de Purkinje .....	35
<b>Figura 12.</b> Presencia de TNF- $\alpha$ en nucleolo de neuronas de Purkinje de cerebelo .....	35
<b>Figura 13.</b> Porcentaje de nucleolos marcados con TNF- $\alpha$ .....	36
<b>Figura 14.</b> Contenido de TNF- $\alpha$ en capa granular de cerebelo.....	37
<b>Figura 15.</b> Estudio del contenido de TNF- $\alpha$ en capa granular.....	38
<b>Figura 16.</b> Contenido de glutaminasa en capa de Purkinje de cerebelo .....	38
<b>Figura 17.</b> Intensidad promedio de glutaminasa en neuronas de Purkinje.....	39
<b>Figura 18.</b> Contenido de glutaminasa en capa granular de cerebelo .....	40
<b>Figura 19.</b> Estudio del contenido de glutaminasa en capa granular .....	40
<b>Figura 20.</b> Presencia de CCL20 en meninges de cerebelo .....	41
<b>Figura 21.</b> Células con marca de CCL20 en meninges.....	42

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Composición de los diferentes grupos incluidos en el estudio .....	22
<b>Tabla 2.</b> Resumen de los sujetos fallecidos analizados.....	27
<b>Tabla 3.</b> Anticuerpos primarios utilizados en los experimentos de inmunohistoquímica.....	29

# ABREVIATURAS

**ANOVA:** *Analysis of variance*

**ASH:** *Alcoholic steatohepatitis*

**BHE:** Barrera hematoencefálica

**CCL20:** *(C-C motif) ligand 20*

**CHC:** Carcinoma hepatocelular

**CX3CL1:** *(C-X3-C motif) ligand 1*

**CXCL13:** *(C-X-C motif) ligand 13*

**DPIT:** Derivaciones portosistémicas intrahepáticas transyugulares

**EEM:** Error estándar de la media

**EH:** Encefalopatía hepática

**EHGA:** Enfermedad de hígado graso alcohólico

**EHGNA:** Enfermedad de hígado graso no alcohólico

**EHM:** Encefalopatía hepática mínima

**FHA:** Fallo hepático agudo

**GABA:** *Gamma-aminobutyric acid*

**IL:** Interleuquina

**MEC:** Matriz extracelular

**MELD:** *Model for end-stage liver disease*

**NASH:** *Non-alcoholic steatohepatitis*

**NF- $\kappa$ B:** *Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*

**PBMC:** *Peripheral blood mononuclear cell*

**PDGF:** *Platelet derived growth factor*

**PHES:** *Psychometric Hepatic Encephalopathy Score*

**PSE:** *Portosystemic encephalopathy*

**ROS:** *Reactive oxygen species*

**SH:** Esteatohepatitis (*steatohepatitis*)

**SH1:** Esteatohepatitis de grado 1

**SH2:** Esteatohepatitis de grado 2

**SH3:** Esteatohepatitis de grado 3

**SNC:** Sistema nervioso central

**TACE:** *Tumor necrosis factor-alpha converting enzyme*

**TGF- $\beta$ :** *Transforming growth factor beta*

**TNF- $\alpha$ :** *Tumor necrosis factor alpha*

**TNFR1:** *Tumor necrosis factor receptor 1*

**TNFR2:** *Tumor necrosis factor receptor 2*

**TNFs:** Factor de necrosis tumoral soluble

**TNFtm:** Factor de necrosis tumoral transmembrana

# 1 INTRODUCCIÓN

## 1.1 Encefalopatía Hepática: características generales

La encefalopatía hepática (EH) es el término utilizado para describir un conjunto heterogéneo de trastornos neuropsiquiátricos que surgen y se desarrollan como consecuencia de un daño hepático grave (Felipo, 2013). Es una complicación frecuente en casos cirrosis y de hipertensión portal, normalmente diagnosticada en pacientes cirróticos y/o con derivación portosistémica (Ferenci *et al.*, 2002; Patidar y Bajaj, 2015; Hadjihambi *et al.*, 2018), que conlleva una disminución de la función cognitiva (Swaminathan *et al.*, 2018). No se trata de un único síndrome, sino que en función del tipo de daño hepático aparecen distintas formas de EH, y varían en cada una tanto los mecanismos celulares y moleculares implicados como los posibles tratamientos (Felipo, 2013; Ferenci, 2017).

La sintomatología de la EH es muy amplia, incluyendo alteraciones neurológicas como el deterioro de la función cognitiva e intelectual, de la coordinación y de la función neuromuscular (como asterixis e hiperreflexia), pero también trastornos del sueño, de la personalidad y pérdida de consciencia (Felipo, 2013; Hadjihambi *et al.*, 2018). Los síntomas pueden progresar y agravarse (Wijdicks, 2016), desde subclínicos hasta causar el coma o incluso la muerte (Felipo, 2013).

Los pacientes que no muestran síntomas evidentes de EH clínica pueden presentar encefalopatía hepática mínima (EHM), una fase temprana del síndrome que se caracteriza por un deterioro cognitivo leve, déficit de atención, enlentecimiento psicomotor y alteración de la coordinación visomotora y bimanual. Se describió por primera vez en 1957 (Parsons-Smith *et al.*, 1957), gracias a una serie de resultados obtenidos por electroencefalografía, y se denominaba EH latente o subclínica, términos que han sido paulatinamente sustituidos por EHM (Ferenci *et al.*, 2002; Amodio *et al.*, 2004).

Es habitual que no se observen anomalías cuando los pacientes con EHM se someten a pruebas neurológicas rutinarias, y el deterioro puede detectarse únicamente mediante determinados test psicométricos o análisis neurofisiológicos (Román *et al.*, 2011; Kappus y Bajaj, 2012; Felipo, 2013; Wijdicks, 2016). A pesar de denominarse 'mínima', la EHM disminuye la calidad de vida de los pacientes (Schomerus y Hamster, 2001; Prakash y D. Mullen, 2011; Hadjihambi *et al.*, 2018) pues dificulta la realización de tareas que requieren cierta coordinación o atención, aumenta el riesgo de accidentes de tráfico, laborales y domésticos, y predispone a sufrir EH clínica. Es un problema serio tanto de salud pública como social y económica, y un diagnóstico temprano puede mejorar no solo el estado de los pacientes, sino también su esperanza de vida, evitando la progresión del deterioro neurológico (Schomerus y Hamster, 2001; Kappus y Bajaj, 2012; Felipo, 2013; Wijdicks, 2016).

### **1.1.1 Diagnóstico temprano del deterioro neurológico: pruebas psicométricas**

Se ha llegado a un consenso para estandarizar el diagnóstico y evaluar la EHM que consiste en la utilización de pruebas psicométricas, de entre las cuales se establece la batería PHES (del inglés *Psychometric hepatic encephalopathy score*) como test de referencia o *'gold standard'* (Weissenborn *et al.*, 2001; Ferenci *et al.*, 2002). Gracias al PHES se ha observado la elevada incidencia de esta patología, que afecta a un 33-50% de los pacientes cirróticos sin síntomas clínicos de EH (Felipo, 2013). La batería consiste en cinco pruebas que evalúan diferentes capacidades, incluida la atención y la coordinación motora, y ha resultado muy útil para unificar la evaluación de la EHM en todo el mundo, ya que: cubre el espectro de funciones afectadas por la EH; existen factores de corrección en función de la edad y el nivel de estudios de los individuos evaluados; y son pruebas baratas (Ferenci *et al.*, 2002; Romero-Gómez *et al.*, 2007).

Sin embargo, se ha demostrado que los pacientes cirróticos clasificados como 'sin EHM' utilizando el PHES ya pueden presentar ciertos déficits neurológicos. Se ha observado que la ataxia, los temblores y el enlentecimiento psicomotor son marcadores tempranos de disfunción cerebral en una parte de los pacientes cirróticos, incluso antes de que se detecte un menor rendimiento al realizar el PHES (Butz *et al.*, 2010). Otros estudios muestran que algunos pacientes sin deterioro neurológico diagnosticado presentan déficits en pruebas de atención y coordinación adicionales (Felipo *et al.*, 2012a, 2014; Giménez-Garzó *et al.*, 2017). Es decir, algunas alteraciones en las funciones cognitivas y motoras no son detectables con la batería de referencia mencionada, pero sí pueden serlo con pruebas de mayor sensibilidad. Esto sugiere que, si bien el PHES ha servido como pauta fija en la detección de la EHM, no es lo suficiente fino para revelar y estudiar algunas anomalías, y por tanto el diagnóstico puede estar sujeto a un porcentaje significativo de error. Las alteraciones neurológicas varían además entre los pacientes, de modo que en unas ocasiones aparecen antes los déficits de coordinación y en otras los déficits cognitivos (Giménez-Garzó *et al.*, 2017).

Lo anterior indica que los pacientes con cirrosis constituyen una población heterogénea, y resultaría interesante realizar pruebas o test complementarios al PHES que permitiesen clasificar con la máxima precisión a los individuos en distintos subgrupos. Así, se podría estudiar en análisis posteriores los cambios que produce el daño hepático a nivel celular y molecular en cada uno de ellos y proponer opciones terapéuticas más personalizadas y por tanto más eficaces.

## **1.2 Clasificación de la EH**

Con el objetivo de subsanar los defectos y problemas para clasificar con precisión la EH, la Organización Mundial de Gastroenterología introdujo en 1998 una definición multiaxial de la

enfermedad (Ferenci *et al.*, 2002), que establece categorías en función de cuatro factores: la etiología, la gravedad, evolución temporal y la presencia o no de factores precipitantes (Ferenci, 2017; Hadjihambi *et al.*, 2018). Esta clasificación ha sido modificada con posterioridad, pero mantiene los elementos principales (Vilstrup *et al.*, 2014). Dependiendo de la enfermedad subyacente, se distinguen tres tipos distintos de EH clínica:

- Tipo A: EH aguda, asociada a fallo hepático agudo (FHA). Se caracteriza por un aumento de la presión intracraneal como consecuencia de un edema cerebral, que progresa rápidamente y puede conducir a una hernia cerebral (Swaminathan *et al.*, 2018). El desarrollo de EH en pacientes con FHA indica una fase crítica de dicha enfermedad, también denominada fallo hepático fulminante, con necrosis masiva del hígado. La supervivencia es reducida debido al edema cerebral mencionado (Vaquero *et al.*, 2003). Entre las múltiples causas posibles, cabe destacar las hepatitis virales agudas, intoxicación por paracetamol, reacciones idiosincrásicas a determinados fármacos o enfermedades autoinmunes (Punzalan y Barry, 2016).
- Tipo B: aparece como consecuencia de derivaciones porto-sistémicas (parte del flujo sanguíneo portal se desvía hacia la circulación sistémica) (Ferenci, 2017), por lo que también se denomina encefalopatía hepática porto-sistémica (PSE, del inglés *portosystemic encephalopathy*) no cirrótica (Watanabe, 2000). Las derivaciones pueden ser espontáneas, como la que aparece por obstrucción de la vena porta extrahepática o mediante intervención quirúrgica como derivaciones portosistémicas intrahepáticas transyugulares (DPIT), en ambos casos sin enfermedad hepatocelular intrínseca. Es una forma de encefalopatía crónica y menos frecuente pero que causa una elevada morbilidad en los pacientes (Saad, 2014; Liere *et al.*, 2017). La EH de tipo B puede deberse también a la ausencia congénita de la vena porta, donde el drenaje venoso intestinal y esplénico pasa por el hígado y drena directamente hacia la circulación sistémica a través de la vena cava inferior, aunque es muy poco habitual (Grazioli *et al.*, 2000; Wojcicki *et al.*, 2004). En este caso la encefalopatía suele desarrollarse en la edad adulta junto con el daño hepático y renal (Wojcicki *et al.*, 2004; Hu *et al.*, 2008).
- Tipo C: EH crónica asociada a cirrosis e hipertensión portal. Es la forma de encefalopatía más común, y la causa puede ser autoinmune, viral o enfermedades de hígado graso, entre otras (Liere *et al.*, 2017). También está relacionada con derivaciones porto-sistémicas debidas a enfermedades hepáticas crónicas, normalmente la propia cirrosis (en este caso hablamos de PSE). Sin embargo, la EH de tipo C más frecuente es la EHM. Normalmente es episódica (clasificación que se menciona más adelante), y los síntomas se manifiestan principalmente en presencia de hiperamonemia, pero pueden intensificarse por otros factores como inflamación, hiponatremia o el uso de benzodiacepinas (Weissenborn, 2014; Liere *et al.*, 2017).

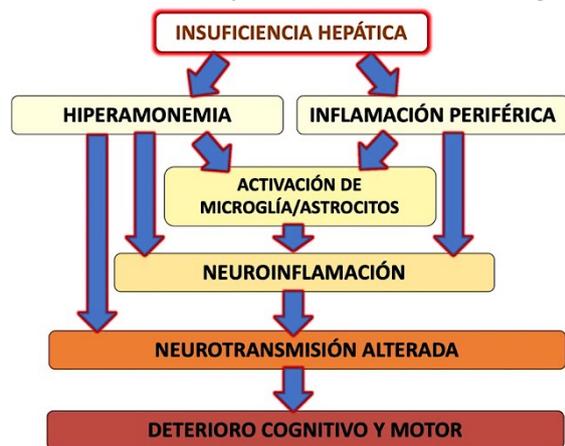
El espectro de gravedad se ha dividido tradicionalmente en grados siguiendo los criterios de West-Haven propuestos en 1977 (Conn *et al.*, 1977). Este sistema propone 4 categorías teniendo en cuenta únicamente aspectos clínicos (Hadjihambi *et al.*, 2018), asignando una categoría u otra en base a las alteraciones en el estado de consciencia, la función intelectual, el comportamiento y anomalías neuromusculares de los pacientes. Cada grado se asocia a una serie de manifestaciones, pero en la práctica clínica no suele verificarse la presencia de todas ellas, sino que la escala se utiliza de forma intuitiva (0 = ausencia de EH; 1 = manifestaciones leves; 2 = manifestaciones moderadas; 3 = manifestaciones graves; 4 = coma). Esto lleva a una valoración subjetiva de la EH, de modo que se generan discrepancias entre evaluadores y se dificulta el desarrollo de los ensayos clínicos. Para superar esta limitación, la escala de West Haven se ha sometido a diversas modificaciones y existen adaptaciones propuestas (Bajaj *et al.*, 2011; Córdoba, 2011; Hadjihambi *et al.*, 2018): la EHM ya aparece como categoría, y recientemente se ha dividido el espectro de EH en dos grandes bloques: EH encubierta (*covert*) y EH clínicamente manifiesta (*overt*). En el primero se incluyen los pacientes con EHM y EH de grado 1, es decir, individuos que no presentan síntomas más allá de un comportamiento anómalo al realizar pruebas psicométricas e individuos con manifestaciones leves, respectivamente (Bajaj *et al.*, 2011; Kappus y Bajaj, 2012; Vilstrup *et al.*, 2014).

En función de cómo se presenta a lo largo del tiempo, la EH puede ser: episódica, con brotes esporádicos de la enfermedad en los que el paciente sufre alteraciones de la consciencia y la función cognitiva; recurrente, si se produce más de un brote en un intervalo de tiempo de 6 meses; o persistente, cuando los síntomas están presentes de forma continua y pueden darse periodos de exacerbaciones agudas (Ferenci, 2017; Swaminathan *et al.*, 2018).

Los episodios, especialmente en pacientes con EH de tipo C, pueden desencadenarse o no debido a factores precipitantes como la ingesta excesiva de proteínas, infecciones, hemorragias gastrointestinales, determinados medicamentos o trastornos electrolíticos (Felipo, 2013; Swaminathan *et al.*, 2018), por lo que puede tratarse de EH precipitada o espontánea, respectivamente (Hadjihambi *et al.*, 2018). Si se eliminan los factores precipitantes, dichos brotes suelen ser reversibles (Córdoba, 2011; Vilstrup *et al.*, 2014). La EH episódica se asocia con una esperanza de vida menor en pacientes cirróticos. Según un estudio, la supervivencia acumulada disminuye hasta un 42% en un año y no supera el 23% a los tres años (Bustamante *et al.*, 1999).

### 1.3 Patogénesis

La EH aparece por una combinación de mecanismos fisiopatológicos derivados del fallo hepático y relacionados entre sí, especialmente el aumento de los niveles de amonio y la inflamación (Jalan *et al.*, 2004; Felipo *et al.*, 2012b), el estrés oxidativo (Montoliu *et al.*, 2011; Bosoi y Rose, 2013), la permeabilidad alterada de la barrera hematoencefálica (BHE), las neurotoxinas y anomalías en la neurotransmisión y el metabolismo energético del cerebro (Rama Rao y Norenberg, 2012;



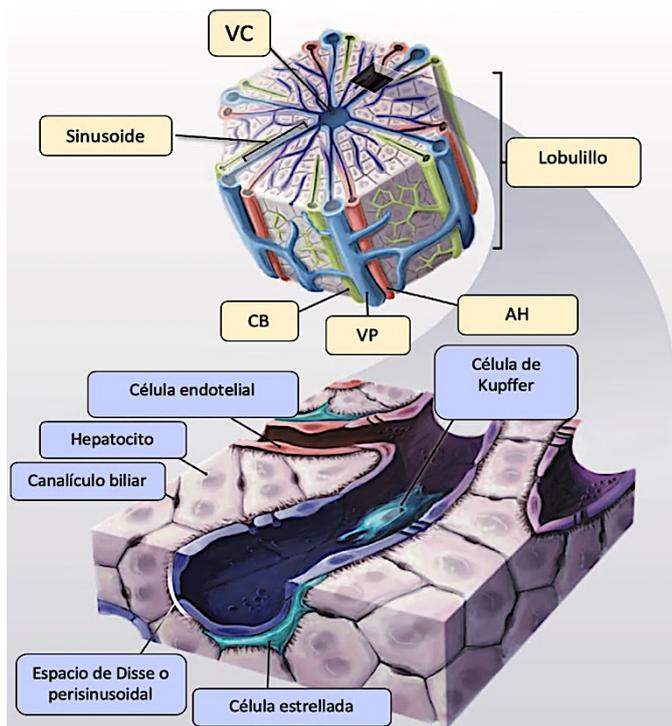
**Figura 1. Patogénesis de la EH.** Se muestra un esquema global de la secuencia de eventos que conducen al desarrollo de la enfermedad, desencadenados a partir de una insuficiencia hepática. Hiperamonemia e inflamación actúan sinérgicamente induciendo neuroinflamación, se altera la neurotransmisión y esto induce la aparición de las alteraciones neurológicas. Figura adaptada de (Montoliu *et al.*, 2015)

Butterworth, 2013), entre otros. Antes se asumía que las causas tanto de la EHM como de los estadios clínicos eran similares, pero una serie de estudios recientes muestran diferencias que sugieren que la EH es una entidad heterogénea (Hadjihambi *et al.*, 2018). La inflamación agrava el deterioro neurológico producido por la hiperamonemia, afirmación respaldada por estudios realizados tanto en humanos como en modelos animales (Montoliu *et al.*, 2015). La hiperamonemia inducida en pacientes con cirrosis disminuye el rendimiento al realizar test psicométricos en presencia de síndrome de

respuesta inflamatoria sistémica, mientras que no se observa deterioro cuando la inflamación se resuelve (Shawcross *et al.*, 2004, 2007). También se ha visto en pacientes cirróticos que las interleuquinas (IL) proinflamatorias IL-6 e IL-18 están aumentados en el grupo con EHM en comparación con el grupo sin EHM, y que existe además una correlación entre los niveles séricos de dichas interleucinas y el grado de deterioro. Los pacientes con niveles mayores muestran EHM más acusada, lo que sugiere que procesos inflamatorios relacionados con la IL-6 y la IL-18 podrían agravar las alteraciones neurológicas, y conocer su concentración puede resultar útil para diferenciar individuos cirróticos con y sin EHM (Montoliu *et al.*, 2009). Incluso en individuos con distintas patologías como esteatohepatitis no alcohólica, se observa un deterioro cognitivo leve en presencia de niveles altos de amonio e inflamación (Felipo *et al.*, 2012b). Por otro lado, en modelos animales hay resultados que muestran cómo la hiperamonemia crónica, tanto en presencia como en ausencia de daño hepático crónico, induce activación de la microglía y la neuroinflamación, produciendo alteraciones cognitivas y motoras que pueden restablecerse administrando antiinflamatorio. Es decir, la sinergia entre el aumento de los niveles de amonio y la inflamación conduce a la neuroinflamación, y esta contribuye al deterioro neurológico en EH y EHM (Figura 1) (Rodrigo *et al.*, 2010).

### 1.3.1 El hígado

El origen de la EH reside en el hígado, por lo que es importante conocer sus características en condiciones fisiológicas y también cuando sufre alteraciones patológicas. Es el órgano más grande del cuerpo humano, con un peso medio de 1500g en un individuo adulto sano (constituye un 2-5% del peso corporal total). Su organización es compleja, con una estructura multicelular repetida (Figura 2) en la que los hepatocitos, componente principal del parénquima hepático, se agrupan formando hileras con microvellosidades abundantes e intercaladas con matriz extracelular (MEC) en el espacio de Disse o perisinusoidal. El espacio entre las cadenas de hepatocitos alberga además una gran cantidad de tipos celulares, como células endoteliales

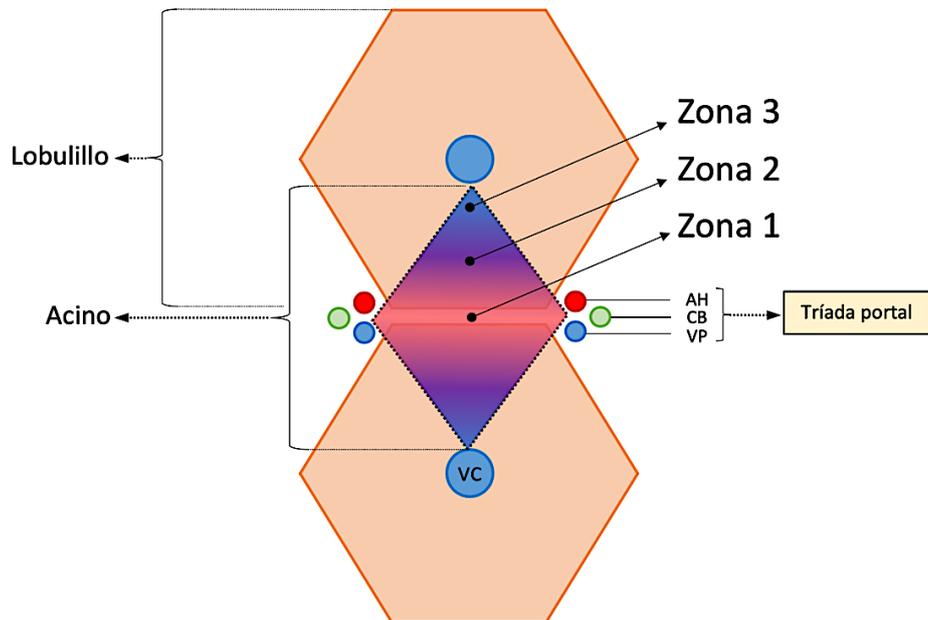


**Figura 2. Estructura del lobulillo hepático.** En la parte inferior se amplía una región de sinusoides en la que confluyen una ramificación arterial con una vena, y se resaltan los distintos tipos celulares, además del canalículo biliar. Pueden apreciarse las microvellosidades de los hepatocitos orientadas hacia el espacio de Disse. VC, vena central; CB, conductillo biliar; VP, vena porta; AH, arteria hepática. Figura adaptada de (Bhatia *et al.*, 2014).

sinusoidales, células de Kupffer (macrófagos), células ductales biliares y células estrelladas (adipocitos hepáticos). Debido a su disposición y a la heterogeneidad celular, los hepatocitos están expuestos a gradientes de nutrientes, hormonas y factores de crecimiento que llegan gracias a un aporte sanguíneo combinado de la vena porta (60-70%) y la arteria hepática (30-40%). Ambos vasos entran en el hígado a través del hilio o porta hepatis, una cisura pequeña y profunda situada en la superficie inferior. Dentro del órgano, las ramificaciones venosas y arteriales discurren en paralelo junto con las vías biliares en los espacios porta o tríadas portales (Bhatia *et al.*, 2014).

La arquitectura hepática puede organizarse en dos modelos principalmente: lobulillar y acinar (Figura 3). El primero considera como unidad mínima estructural el lobulillo, de forma hexagonal y aproximadamente 1 mm de diámetro, cuyos vértices son los espacios porta y el centro la vena terminal hepática o vena central (Ben-moshe e Itzkovitz, 2019). En el segundo, el acino es la unidad mínima funcional en términos de la irrigación sanguínea, de forma romboidal flanqueada por dos tríadas portales y dos venas centrales. Cuando el flujo de sangre arterial se acerca a las venas centrales, su aporte en oxígeno y nutrientes se reduce, diferenciándose tres zonas en cada acino: la zona 1 o

periportal, de mayor calidad nutritiva (en la parte central del acino); la zona 2, intermedia; y la zona 3 o centrilobulillar, con mayor proporción de CO<sub>2</sub> y sustancias de desecho (Kietzmann, 2017).



**Figura 3. Arquitectura microscópica hepática.** Se muestra un esquema de los dos modelos: lobulillar (hexagonal) y acinar (róbico). En el modelo lobulillar, la vena central (VC) se sitúa en el centro de cada lobulillo hepático, mientras que las tríadas portales se localizan en la periferia. En el modelo acinar, se indican las tres zonas que se establecen en función del flujo sanguíneo, siendo la zona 1 la de mayor contenido en oxígeno y nutrientes. La tríada portal se desglosa en una rama de la arteria hepática (AH), una rama de la vena porta (VP) y un conductillo biliar (CB).

La organización zonal es importante como referencia del gradiente de actividad enzimática, concentración de distintas sustancias, expresión génica y distribución de determinados tipos de daño hepático. La histopatología del hígado suele explicarse en base al modelo lobulillar, en el que los hepatocitos se organizan en placas y son irrigados por sinusoides vasculares, capilares en los que confluye la sangre arterial y venosa que circula desde las tríadas portales hacia las venas centrales mencionadas. Todo ello convierte a los hepatocitos en uno de los tipos celulares mejor perfundidos del organismo. Por otra parte, los hepatocitos secretan bilis que fluye a través de los canalículos biliares en dirección opuesta al flujo sanguíneo, es decir, desde la zona central hacia los conductos biliares de las tríadas, y estos la transportan al intestino (Ben-moshe e Itzkovitz, 2019).

El hígado realiza cientos de funciones distintas necesarias para mantener la homeostasis, especialmente metabólicas, pero también de almacenamiento y liberación de nutrientes, inmunológicas y de neutralización y eliminación de la mayoría de toxinas tanto endógenas como exógenas (Ben-moshe e Itzkovitz, 2019). Es por tanto un órgano vital, que cuenta con una capacidad de regeneración única, pudiendo restaurarse en su totalidad aun cuando más de dos tercios de sus células resultan dañadas (Bhatia *et al.*, 2014). Cuando el hígado sufre una patología aguda o crónica, pierde capacidad detoxificadora, las toxinas no son correctamente eliminadas de la sangre y pueden llegar al cerebro (neurotoxinas), dando lugar a las alteraciones cognitivas y motoras características de

la EH (Felipo, 2013; Bhatia *et al.*, 2014).

La posición central del hígado en el metabolismo sistémico conlleva una elevada exposición a agentes nocivos endógenos y exógenos como el alcohol, las infecciones virales y determinados componentes de la dieta (Blachier *et al.*, 2013). A nivel mundial, la esteatosis no alcohólica o enfermedad de hígado graso no alcohólico (EHGNA), las hepatitis víricas, la hepatopatía alcohólica y el carcinoma hepatocelular (CHC) son las enfermedades hepáticas más frecuentes (Muriel, 2017; Asrani *et al.*, 2019). También puede producirse daño como un efecto colateral de enfermedades frecuentes en el ser humano, entre ellas la insuficiencia cardíaca. Además de la capacidad regenerativa del hígado anteriormente mencionada, las respuestas a nivel celular y tisular más frecuentes cuando se produce una lesión son: inflamación, degeneración de los hepatocitos, acumulaciones intracelulares, necrosis, apoptosis y fibrosis.

Para una mejor comprensión de dichas alteraciones, es conveniente conocer no solo el funcionamiento del hígado sano, sino también las distintas fases patológicas que pueden derivar en último término a cirrosis.

#### **1.3.1.1 Esteatosis hepática**

Esta enfermedad puede considerarse la primera fase del daño hepático y presenta una prevalencia elevada en todo el mundo (Lakshman *et al.*, 2015). Se caracteriza por la acumulación intracitoplasmática de triglicéridos en forma de gotas lipídicas de tamaño variable (esteatosis microvesicular o macrovesicular) en los hepatocitos, en ausencia de inflamación y lesión hepática. En la variante macrovesicular, las gotas desplazan el núcleo hacia la periferia, mientras que en la microvesicular los hepatocitos presentan muchas gotas pequeñas pero el núcleo se mantiene en una posición central (Sakhuja, 2014). Tanto la esteatosis de origen alcohólico o enfermedad de hígado graso alcohólico (EHGA) como la EHGNA suelen ser macrovesiculares, aunque puede observarse la forma mixta (macrovesicular y microvesicular) con bastante frecuencia.

Se diagnostica esteatosis cuando la acumulación de grasa intrahepática es de al menos el 5% con respecto al peso total del hígado (Sakhuja, 2014; Nassir *et al.*, 2015). Según el porcentaje de hepatocitos que contienen grasa, la enfermedad se clasifica en grados, desde 0 (hígado sano, <5%) hasta 3 (esteatosis severa, >66%) (Kleiner *et al.*, 2005; Qayyum *et al.*, 2012).

Inicialmente, la síntesis y almacenamiento de triglicéridos son hepatoprotectores, pero un contenido excesivo y prolongado de grasa puede provocar disfunción metabólica, inflamación e incluso ser un factor de riesgo de progresión hacia estadios avanzados de enfermedad hepática como fibrosis,

cirrosis y, en casos extremos, CHC y muerte (Fartoux *et al.*, 2005; Lakshman *et al.*, 2015). Mientras que la EHGNA se relaciona con obesidad, dislipidemia, hipertensión, resistencia a la insulina, diabetes mellitus de tipo 2 y el síndrome metabólico, la EHGA se asocia al abuso crónico de alcohol (ingesta de 20-30 g/día), que puede o no estar superpuesto a los factores de riesgo anteriores. Existe un tercer grupo donde se engloban aquellos cuadros de esteatosis debidos a trastornos genéticos, infecciones virales o el uso de medicamentos esteatogénicos (Lakshman *et al.*, 2015; Sanyal, 2019). Hay varios mecanismos involucrados en la acumulación de grasa intrahepática, que se resumen en un desequilibrio entre la síntesis y la degradación de los lípidos: el aumento del flujo de ácidos grasos en el hígado y de la lipogénesis de novo, la disminución del catabolismo lipídico (incluida la  $\beta$ -oxidación de los ácido grasos), y la alteración en la secreción de lipoproteínas de muy baja densidad. (Nassir *et al.*, 2015; Gluchowski *et al.*, 2017). Además, se produce un aumento en los niveles de ciertas citoquinas proinflamatorias (especialmente el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ , del inglés *tumoral necrosis factor alpha*), IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-8) y en la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS, del inglés *reactive oxygen species*). Este último se debe principalmente a un incremento en la oxidación de lípidos hepáticos en varios orgánulos como las mitocondrias, los peroxisomas y el retículo endoplasmático en el caso de la EHGNA, y al metabolismo del etanol en el caso de la EHGA (Tilg y Diehl, 2000; Chalasani *et al.*, 2003; Lakshman *et al.*, 2015; Sanyal, 2019).

### **1.3.1.2 Esteatohepatitis**

La esteatosis hepática resulta inocua en su forma leve, normalmente no progresiva y se revierte mediante cambios en el estilo de vida, como la actividad física o la dieta (Nassir *et al.*, 2015). Sin embargo, cuando el agente causal no se resuelve sino que persiste y se agrava, puede progresar a esteatohepatitis alcohólica (ASH, del inglés *alcoholic steatohepatitis*) o no alcohólica (NASH, del inglés *non-alcoholic steatohepatitis*) (Scaglioni *et al.*, 2011). Si bien en ambos casos los procesos implicados y la histopatología son similares, presentan una patogenia y epidemiología diferentes (Ratziu *et al.*, 2010).

Se considera que un paciente sufre esteatohepatitis (SH, del inglés *steatohepatitis*) cuando la esteatosis coexiste con lesión celular e inflamación. Ya que las lesiones que se producen en ASH y NASH son parecidas, la característica clave para diferenciarlas es el consumo de etanol, pues la primera se asocia con una ingesta excesiva del mismo (mencionada en el apartado anterior). La esteatohepatitis involucra varios mecanismos a diferentes niveles metabólicos, muchos de ellos comunes con el estadio anterior: síntesis de lípidos aumentada, degradación disminuida y alteraciones en el transporte de las grasas. La persistencia del estrés oxidativo y las citoquinas proinflamatorias junto con la endotoxina

producidas por bacterias intestinales parecen ser relevantes en el desarrollo de la inflamación y la lesión del parénquima hepático (Bird *et al.*, 1990; Scaglioni *et al.*, 2011). Sin embargo, el factor desencadenante puede estar relacionado con la rotura y muerte de los hepatocitos con grasa intracelular. Cuando se produce rotura hepatocítica, se liberan ácidos grasos que promueven apoptosis en otras células parenquimáticas, especialmente la vía extrínseca mediada por Fas/Fas-L, que se correlaciona además con el factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras *kappa* de las células B activadas (NF- $\kappa$ B, del inglés *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) (Zou *et al.*, 2007).

Lo que se observa a nivel histológico cuando se realiza una biopsia es acumulación de grasa con características necroinflamatorias que incluyen el hinchamiento de los hepatocitos, células apoptóticas, inflamación lobular, cuerpos de Mallory-Denk, colestasis aguda, activación de las células estrelladas infiltración de macrófagos y células inflamatorias y fibrosis perisinusoidal, entre otros (Neuman *et al.*, 2016).

La esteatohepatitis engloba un amplio espectro de alteraciones tisulares. Para diagnosticar el estadio de los pacientes y optar por el tratamiento más adecuado, Brunt estableció un sistema de clasificación semicuantitativo, posteriormente refinado por Kleiner, que únicamente requiere las tinciones de hematoxilina-eosina y la tricrómica de Masson y considera cinco categorías de características histológicas: esteatosis, inflamación, lesión hepatocelular, fibrosis y otras características. Mediante la suma no ponderada de la puntuación obtenida en las tres primeras se establecen tres grados de esteatohepatitis: SH1 (leve); SH2 (moderada); y SH3 (severa) (Brunt *et al.*, 1999; Kleiner *et al.*, 2005; Takahashi y Fukusato, 2014).

### **1.3.1.3 Regeneración hepatocelular, fibrogénesis y progresión a cirrosis**

La cirrosis hepática es el estadio final y más grave de daño en el hígado. Las causas, al igual que en los puntos anteriores, son diversas, pero existen ciertos rasgos patológicos característicos de todos los cuadros de cirrosis, incluida la degeneración y necrosis de los hepatocitos, la sustitución del parénquima hepático por tejido fibrótico y nódulos regenerativos, y pérdida de la función hepática. El proceso fundamental por el que las enfermedades hepáticas crónicas progresan a cirrosis es la fibrosis, que se desarrolla por una mayor producción de MEC, sobre todo colágeno de tipo 1. La respuesta fibrogénica se inicia, según el modelo acinar, en la zona 3 y a nivel perisinusoidal, perivenular (alrededor de las venas centrales) y pericelular. Si se expande, los septos fibrosos pueden alcanzar las tríadas portales (Puche *et al.*, 2013; Zhou *et al.*, 2014). Tanto los hepatocitos como distintos tipos celulares no parenquimáticos (células estrelladas, células endoteliales sinusoidales y células de

Kupffer) están implicadas, a través de distintas vías, en el inicio y la progresión de la fibrosis y la cirrosis (Zhou *et al.*, 2014).

Ante la exposición continuada a señales inflamatorias derivadas del daño parenquimático, como el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF, del inglés *platelet derived growth factor*), el factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ , del inglés *transforming growth factor beta*), el TNF- $\alpha$  y la IL-1, las células estrelladas se activan y sufren una transdiferenciación hacia células similares a miofibroblastos. Este es el evento más importante para desencadenar la fibrogénesis. Al activarse, las células estrelladas pierden sus reservas lipídicas, comienzan a proliferar, se vuelven contráctiles, migran hacia las zonas dañadas y generan grandes cantidades de colágeno y otros componentes de la MEC, lo que finalmente conduce a la fibrosis (He *et al.*, 2012; Lakner *et al.*, 2012; Jung y Yim, 2017).

Durante el proceso fibrogénico, el sistema microvascular hepático también se altera. Disminuyen notablemente tanto el número como el tamaño de los orificios o fenestraciones en las células endoteliales sinusoidales (defenestración) y se forma una membrana basal subyacente, por lo que se pierde la discontinuidad de los capilares y por consiguiente se altera el intercambio de moléculas entre la sangre y el parénquima. Tanto la defenestración como la membrana basal son rasgos frecuentes del hígado cirrótico (Yokomori *et al.*, 2012; Bocca *et al.*, 2015). Ambos fenómenos, que alteran el metabolismo del retinol, junto con la secreción de IL-33 por parte de las células endoteliales sinusoidales, son factores que promueven la activación de las células estrelladas y por tanto la fibrosis (Marvie *et al.*, 2010).

Las células de Kupffer también pueden activarse por distintos agentes perjudiciales para el hígado como infecciones virales, el alcohol o dietas ricas en grasa. Cuando están activas, producen mediadores inflamatorios solubles que promueven la destrucción hepatocítica (Kolios *et al.*, 2006). Las células de Kupffer también están implicadas en la activación de las células estrelladas gracias a moléculas como como el PDGF, el TGF- $\beta$ 1 o la gelatinasa, luego agravan tanto la lesión hepática como la fibrosis (Zhou *et al.*, 2014).

Las enfermedades hepáticas crónicas promueven el daño y la apoptosis, que a su vez pueden ser estímulos mitogénicos desencadenantes de la regeneración compensatoria de los hepatocitos. Las células nuevas tienden a acumular cada vez menos lípidos (Schattenberg *et al.*, 2012). Cuando los hepatocitos son dañados, liberan ROS y mediadores fibrogénicos, inducen la activación de las células estrelladas y las acciones fibrogénicas de los miofibroblastos (Bataller y Brenner, 2005). La apoptosis hepatocítica es un mecanismo habitual en la lesión hepática, contribuyendo a la inflamación, la fibrogénesis y el desarrollo de la cirrosis.

Como se puede observar, la cirrosis hepática está orquestada por una compleja red de vías de

señalización mediadas por citoquinas que regulan la activación de las células estrelladas y la fibrogénesis, entre las que cabe destacar: el PDGF, el mitógeno más fuerte de todos los factores de crecimiento para las células estrelladas; el TGF- $\beta$ , potente inductor de la fibrogénesis que se sintetiza principalmente en los cuatro tipos celulares mencionados en este apartado; el TNF- $\alpha$ , producido sobre todo por monocitos, macrófagos, células estrelladas y células de Kupffer, que tiene actividad proinflamatoria y efectos citotóxicos; las interleucinas profibrogénicas como la IL-1 o la IL-17, y antifibrogénicas como la IL-10, IL-22 e IL-6 (Zhou *et al.*, 2014; Jung y Yim, 2017).

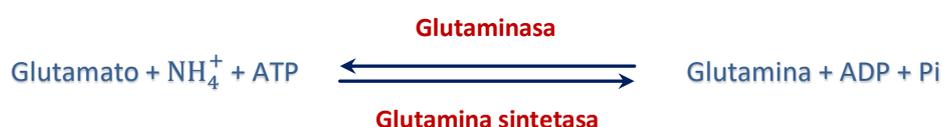
### 1.3.2 Hiperamonemia

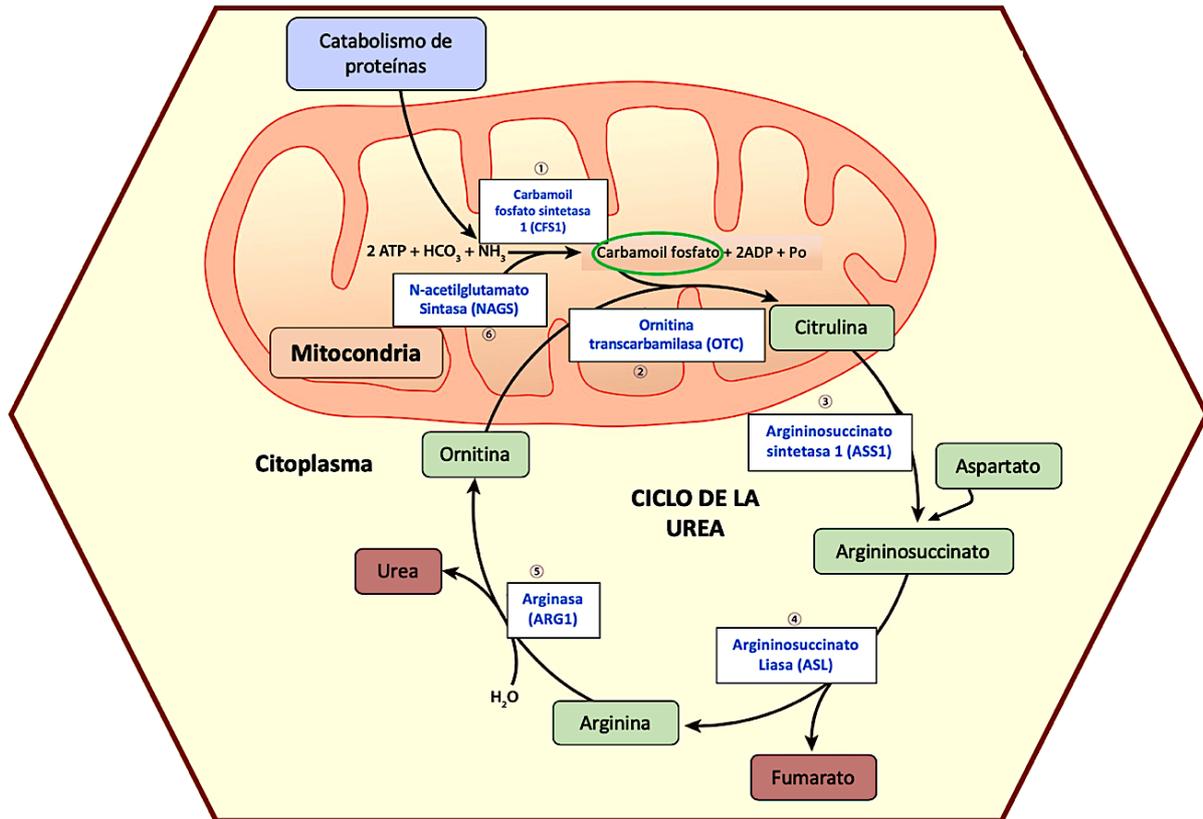
El amonio es la neurotoxina relacionada con la EH que mejor se ha caracterizado (Ferenci, 2017). Se trata de uno de los productos principales del metabolismo del nitrógeno, resultado de la degradación de nucleótidos, aminoácidos y otras sustancias (Gutiérrez-de-Juan *et al.*, 2017). Se genera por tanto en todas las células del organismo, si bien son dos las fuentes principales de esta molécula en el sistema portal: la degradación bacteriana de distintos compuestos nitrogenados en el lumen del colon, y la desaminación de la glutamina en la obtención de energía en el intestino delgado (Romero-Gómez *et al.*, 2004; Mullen y Prakash, 2010). En solución acuosa, el amoniaco se convierte en ion amonio en mayor o menor grado dependiendo de su concentración y del pH de dicha solución. A pH fisiológico, la reacción se desplaza hacia la formación del ion:



El amonio viaja hasta el hígado para convertirse en urea mediante el ciclo de la urea (Figura 4), principal vía de eliminación. La urea es soluble en agua e inocua para el organismo y finalmente se excreta vía renal con la orina (Adeva *et al.*, 2012; Gutiérrez-de-Juan *et al.*, 2017).

Para mantener la homeostasis el amonio resulta esencial, participando en la síntesis de compuestos importantes. En mamíferos se genera principalmente por la acción de 3 enzimas: la glutamato deshidrogenasa; enzimas del ciclo de los nucleótidos de purina; y la glutaminasa, que cataliza la hidrólisis de la glutamina para formar glutamato y amonio. Por otra parte, la glutamina sintetasa es una enzima presente en varios tejidos que cataliza la conversión de amonio y glutamato en glutamina, es decir, actúa de forma opuesta a la glutaminasa (Fiati Kenston *et al.*, 2019):





**Figura 4.** Ciclo de la urea. Las seis enzimas que participan en la vía están numeradas 1-6, con el gen que codifica para cada una de ellas entre paréntesis. El fumarato que se libera puede reconvertirse en oxalacetato a través del ciclo de Krebs y regenerar aspartato. La ruptura de la arginina da lugar a ornitina y urea. La primera se regenera para comenzar un nuevo ciclo en la mitocondria, mientras que la urea es secretada del hígado a la sangre y eliminada en la orina. Figura adaptada de (Blair *et al.*, 2015).

El amoníaco se comporta como ácido o base, y ante un daño hepático la capacidad del cuerpo para eliminarlo disminuye. Además, se ha visto en pacientes cirróticos que esta consecuencia se acentúa a medida que progresan una serie de alteraciones en la microbiota intestinal (Bajaj, 2014). En condiciones fisiológicas, los niveles de amoníaco en sangre son muy bajos (aproximadamente 100  $\mu\text{M}$  en humanos) y están sometidos a un control riguroso gracias a las reacciones mencionadas anteriormente, que mantienen el equilibrio entre la degradación y la formación (Felipo y Butterworth, 2002; Fiati Kenston *et al.*, 2019).

Cuando el hígado falla, la hiperamonemia activa la síntesis de glutamina en tejidos extrahepáticos, especialmente en los músculos esqueléticos (Dam *et al.*, 2013). Es decir, la detoxificación recae principalmente sobre la glutamina sintetasa, presente en casi todos los tipos celulares. El aumento de glutamina en sangre tiende a activar su degradación en intestino y riñones, lo que nuevamente lleva al incremento en los niveles de amoníaco. Los riñones pueden excretarlo por la orina, pero este proceso termina saturándose (Holecsek, 2014; Fiati Kenston *et al.*, 2019).

En el sistema nervioso central (SNC) esta enzima se localiza en microglía y astrocitos. Cuando se

produce glutamina en ausencia de enfermedad hepática, una parte se transporta desde los astrocitos hacia las neuronas, y en ellas la glutaminasa vuelve a convertirla en amonio y glutamato. De este modo se mantienen niveles de glutamato adecuados, que actúa como neurotransmisor. La glutamina también se libera al torrente sanguíneo, lo que permite dirigir el amonio en forma molecular no tóxica desde estos tejidos hasta el hígado. Allí es escindida por la glutaminasa y el amonio puede eliminarse mediante el ciclo de la urea. Ante un daño hepático, la detoxificación defectuosa se traduce en acumulación de amonio en sangre y SNC. El exceso de amonio en el cerebro puede conducir también a un exceso de glutamina, lo que a su vez puede promover el deterioro de la función cerebral. Distintos estudios indican que la hiperamonemia es el principal factor responsable de las alteraciones neurológicas características de la EH y el desarrollo de la enfermedad (Felipo y Butterworth, 2002; Mullen y Prakash, 2010; Holecek, 2014; Fiati Kenston *et al.*, 2019).

### **1.3.3 Inflamación periférica y neuroinflamación**

La inflamación sistémica es un fenómeno habitual cuando se produce infección y/o muerte hepatocítica, y tanto en casos de fallo hepático agudo como crónico parece ser un factor predictivo importante de EH, correlacionándose con la presencia y gravedad del deterioro cognitivo y motor (Butterworth, 2013; Ochoa-Sanchez y Rose, 2018). Como ya se mencionó anteriormente, existe además un efecto sinérgico entre la hiperamonemia y la inflamación que promueve dicho deterioro (Shawcross *et al.*, 2004, 2007; Felipo *et al.*, 2012b). La inflamación periférica derivada de enfermedad hepática se caracteriza por un aumento en los niveles séricos de varias citoquinas proinflamatorias que incluyen la IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-12, y TNF- $\alpha$  (Aldridge *et al.*, 2015), y de hecho en pacientes cirróticos con deterioro cognitivo leve (EHM) se aprecia un aumento en los niveles de IL-6 e IL-18 con respecto a individuos sin EHM (Montoliu *et al.*, 2009). A raíz de este estudio se han caracterizado en un trabajo posterior los cambios en el sistema inmune innato y adaptativo de pacientes cirróticos con y sin EHM. Los pacientes con EHM muestran un aumento de monocitos intermedios proinflamatorios y linfocitos T autorreactivos, ambiente proinflamatorio que se refleja en niveles séricos aumentados de citoquinas como las interleuquinas IL-6, IL-21, IL-10, IL-17, IL-18, TNF- $\alpha$ , IL-15 e IL-22, el INF- $\gamma$  y las quimioquinas (citoquinas quimiotácticas o quimioatrayentes) CCL20 (del inglés (*C-C motif*) *ligand* 20), CXCL13 (del inglés (*C-X-C motif*) *ligand* 13) y CX3CL1 (del inglés (*C-X3-C motif*) *ligand* 1). El aumento de estas citoquinas se reflejó tanto en el grupo sin EHM como con EHM con respecto al grupo control, si bien resultó ser más acusado en los pacientes con deterioro neurológico. El marcador de activación temprana CD69 también está aumentado en los linfocitos T CD4<sup>+</sup> y B de los sujetos con EHM pero no en el grupo sin EHM, lo que indica una activación selectiva de ambos tipos celulares. Los resultados apoyan la activación y expansión de los linfocitos B y ciertas subpoblaciones de linfocitos T CD4<sup>+</sup> en

pacientes con EHM (Mangas-Losada *et al.*, 2017). El cambio en la activación del sistema inmune podría alterar la función cerebral al promover la infiltración de células T y B en el cerebro. Los niveles aumentados de CCL20, IL-15, CX3CL1 y CXCL13 podrían contribuir a ello, induciendo inflamación en el cerebro (neuroinflamación) y el desarrollo de alteraciones cognitivas y motoras (Mangas-Losada *et al.*, 2017).

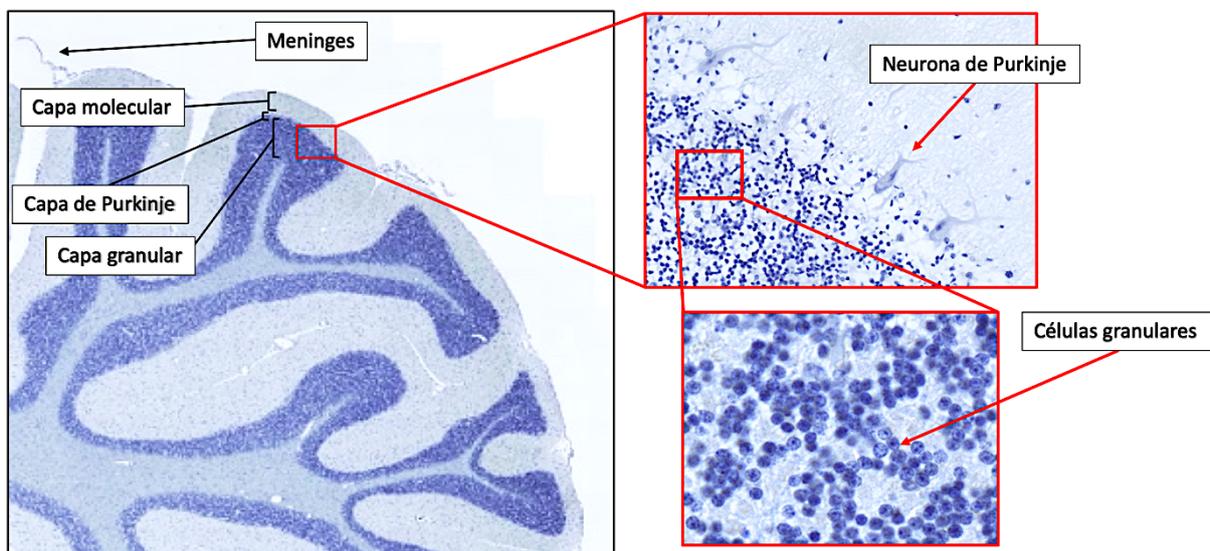
Numerosos estudios indican que la neuroinflamación tiene un papel importante en las alteraciones neurológicas de patologías neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer o la EH. La primera evidencia directa de la existencia de neuroinflamación en enfermedad hepática es la activación de la microglía junto con niveles aumentados de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , e IL-6 en tejido cerebral (Butterworth, 2013). Un estudio realizado en un modelo de rata con derivación portocava muestra la presencia de deterioro neurológico y factores proinflamatorios en el cerebro de los animales, incluyendo el aumento de IL-6. Mediante un tratamiento con ibuprofeno se logró revertir los niveles de dichos factores a valores normales (Cauli *et al.*, 2007). En ratas con hiperamonemia crónica inducida sin fallo hepático, otro modelo de EH, se observó la activación de la microglía y neuroinflamación, contribuyendo al deterioro en la función cognitiva y motora de los animales. El tratamiento con ibuprofeno también tuvo efectos positivos, reduciendo la activación microglial y las alteraciones neurológicas (Rodrigo *et al.*, 2010).

Las células microgliales constituyen uno de los tipos celulares de la glía (células no excitables del SNC organizadas en poblaciones heterogéneas que regulan procesos cerebrales importantes), concretamente macrófagos residentes del cerebro capaces de reconocer un amplio rango de alteraciones homeostáticas. Cuando esto ocurre se produce la 'activación microglial': las células sufren cambios morfológicos graduales pasando de un aspecto ramificado (reposo) a ameboide (activo), cambian la expresión de diversas enzimas y receptores y liberan numerosas citoquinas con propiedades proinflamatorias y antiinflamatorias (Hanisch y Kettenmann, 2007; Butterworth, 2013).

Se considera que la microglía, junto con los astrocitos, son los principales promotores de la neuroinflamación en múltiples condiciones patológicas, entre las que se incluye la EH y la hiperamonemia crónica (Hernández-Rabaza *et al.*, 2016a, 2016b). Este hecho está respaldado por estudios realizados tanto en modelos animales como en pacientes. En ratas con fallo hepático agudo y EH, se ha observado activación de células de la glía (astrocitos y microglía) así como un incremento en la expresión de los genes que codifican para las citoquinas TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , e IL-6 (Jiang *et al.*, 2009). Por otra parte, se ha visto activación microglial en la corteza cerebral de pacientes con cirrosis y EH clínicamente manifiesta pero no en individuos cirróticos sin EH aparente. Este fenómeno se detectó por la elevada expresión de Iba-1, un marcador de activación microglial (Zemtsova *et al.*, 2011).

## 1.4 Alteraciones neurológicas de la EH: papel del cerebelo

El cerebelo es una región del encéfalo localizada en la fosa craneal posterior y conectada directa o indirectamente con otras estructuras como el tronco encefálico, la columna vertebral y distintas zonas corticales y subcorticales del cerebro. Consta de 2 hemisferios laterales y una estructura central estrecha en forma de gusano denominada vermis, y su superficie presenta un gran número de pliegues transversales (folia). El cerebelo consiste en una capa externa de sustancia gris (corteza cerebelosa) que envuelve una capa de sustancia blanca con numerosas ramificaciones, y esta a su vez contiene tres pares de núcleos cerebelosos profundos embebidos en el centro. Tanto la citoarquitectura como los microcircuitos de la corteza cerebelosa parecen ser idénticos independientemente de la zona, y pueden distinguirse tres capas (Figura 5). La más profunda es la capa granular, con un gran número de células granulares junto con interneuronas (principalmente células de Golgi). En el medio se encuentra la capa de Purkinje, una zona estrecha compuesta por los cuerpos celulares de las neuronas de Purkinje y glía de Bergmann, un tipo especializado de astrocito. Por encima de esta se localiza la capa más superficial o capa molecular, formada por árboles dendríticos aplanados de las neuronas de Purkinje y los axones de las células granulares. La capa molecular también tiene 2 tipos de interneuronas inhibitorias: células estrelladas y células en cesta (Roostaei *et al.*, 2014). Por encima de la capa molecular se encuentran las meninges, que siguen el contorno del cerebelo al igual que del resto del encéfalo.



**Figura 5.** Corte histológico de cerebelo humano teñido con hematoxilina. Se señalan las meninges y las distintas capas de la corteza del cerebelo, resaltando por ampliación las neuronas de Purkinje y granulares (recuadros y flechas rojas).

El cerebelo contiene casi el 80% de las neuronas encefálicas (Herculano-Houzel, 2010) y es el principal encargado de regular la función y la coordinación motoras. Sin embargo, numerosas evidencias procedentes de estudios anatómicos, clínicos, de neuroimagen y comportamiento indican que no solo está involucrado en el control motor sino también en funciones cognitivas y afectivas. Del

mismo modo que regula la frecuencia, la fuerza, el ritmo y la precisión de los movimientos, también modula la velocidad, capacidad, consistencia y adecuación de los procesos mentales o cognitivos, que incluyen la atención visoespacial, mecanismos de aprendizaje o la modulación de la función verbal, entre otros (Timmann *et al.*, 2010; Guell *et al.*, 2018).

Las alteraciones en la coordinación bimanual y visomotora son eventos que tienen lugar en estadios tempranos de enfermedad hepática, antes de que se detecten alteraciones con la batería PHES. Utilizando *Arterial Spin Labelling*, un método no invasivo de resonancia magnética, se ha observado también un aumento de flujo sanguíneo en cerebelo en pacientes cirróticos con EHM, detectando la patología incluso antes que los test psicométricos. Dicho flujo está aumentado en los hemisferios cerebelosos en los pacientes cirróticos con y sin EHM. (Felipo *et al.*, 2014). También se ha demostrado que la ataxia, los temblores y el enlentecimiento motor aparecen antes de que el resto de alteraciones sean detectables con el PHES (Butz *et al.*, 2010). Estudios con modelos animales también han aportado resultados interesantes. En ratas con hiperamonemia y EH, la neuroinflamación reduce la capacidad de aprendizaje espacial y se observa incoordinación motora. Dicha neuroinflamación es además más intensa en cerebelo que en otras partes del encéfalo (Rodrigo *et al.*, 2010; Hernández-Rabaza *et al.*, 2016a). Estos datos sugieren que el cerebelo es la región más sensible y por consiguiente una de las primeras en alterarse, contribuyendo a las alteraciones neurológicas tempranas de la EHM.

El neurotransmisor ácido gamma-aminobutírico (GABA, del inglés *gamma-aminobutyric acid*) y el glutamato extracelular son los principales responsables de regular la coordinación motora en el cerebelo (Boix *et al.*, 2010). El aumento GABA extracelular y del tono GABAérgico (aumento en la activación de los receptores GABA<sub>A</sub>) en cerebelo se correlaciona con incoordinación motora en ratas con hiperamonemia, la cual se revierte cuando los niveles del neurotransmisor se normalizan (Gonzalez-Usano *et al.*, 2014).

Por otra parte, el factor de transcripción NF-κB participa en la que se considera como una de las vías de señalización proinflamatoria prototípicas. Dicha vía se caracteriza por la activación de NF-κB gracias a citoquinas proinflamatorias como IL-1 y TNF-α, lo que promueve la expresión de otros genes que codifican para proteínas también proinflamatorias, como diversas citoquinas (incluido el TNF-α) y moléculas de adhesión. Cuando aumentan los niveles de las citoquinas mencionadas, NF-κB se transloca al núcleo y activa la transcripción (Lawrence, 2009). Estudios realizados en un modelo de rata con hiperamonemia crónica demuestran que el aumento en los niveles de amonio induce la activación de microglía y astrocitos en el cerebelo de los animales, lo que conlleva a su vez un incremento tanto de TNF-α como de uno de sus receptor receptores (TNFR1, del inglés *tumor necrosis factor receptor 1*) en las membranas. Esto promueve la activación de dichos receptores e induce la translocación de la subunidad p50 de NF-κB al núcleo, que se asocia con un aumento en la expresión de glutaminasa. La

glutaminasa favorece la liberación de glutamato y se incrementan los niveles de GABA extracelular. Se piensa que el glutamato extracelular promueve la activación de los transportadores de glutamato en los astrocitos activados, haciendo que aumente el sodio intracelular. El ion podría estar invirtiendo la función del transportador de GABA GAT3 en estas células, de manera que en lugar de favorecer la entrada del neurotransmisor aumenta su liberación al medio extracelular y esto lleva al deterioro de la coordinación motora (Cabrera-Pastor *et al.*, 2018) . En muestras de cerebelo de pacientes con distintos grados de enfermedad hepática se ha observado activación de microglía, infiltración linfocitaria y una pérdida neuronal significativa (Balzano *et al.*, 2018b).

## 2 HIPÓTESIS

Los pacientes cirróticos clasificados como 'sin EHM' ya pueden presentar ciertos déficits neurológicos, entre ellos de coordinación motora, que no llegan a detectarse con el PHES.

El cerebelo es el principal encargado de regular la función y la coordinación motoras, y en muestras de tejido cerebeloso de pacientes con distintos grados de enfermedad hepática se ha observado activación de microglía, infiltración linfocitaria y una pérdida neuronal significativa (Balzano *et al.*, 2018b). Sin embargo, aún no se conocen en detalle muchos de los mecanismos moleculares implicados. El TNF $\alpha$  y la glutaminasa son factores directa o indirectamente implicados en procesos inflamatorios observados tanto a nivel periférico como en el SNC, luego se esperaría un aumento de los mismos en las distintas capas del cerebelo. La infiltración linfocitaria en esta región podría estar mediada, entre otros factores, por CCL20, quimioatrayente de linfocitos T y B que es inducida en células mononucleares de sangre periférica (PBMC, del inglés *peripheral blood mononuclear cell*) y células endoteliales por el TNF $\alpha$  y la IL-6 (Liao *et al.*, 1999, Krzysiek *et al.*, 2000). Los pacientes con y sin EHM presentan además niveles aumentados de CCL20, TNF $\alpha$  y IL-6 y en suero (Mangas-Losada, *et al.*, 2017), que podrían estar promoviendo infiltración linfocitaria en cerebelo, neuroinflamación y por tanto contribuyendo al desarrollo de alteraciones motoras.

Además, dado que la infiltración linfocitaria y la neuroinflamación en cerebelo ya se detecta en estadios anteriores a la cirrosis (Balzano *et al.*, 2018b), y que pacientes con esteatohepatitis pueden llegar a presentar alteraciones neurológicas si los niveles de amonio e inflamación en sangre son lo suficientemente elevados (Felipo *et al.*, 2012b), se espera que los mecanismos moleculares implicados en dichos estadios presenten mediadores inflamatorios comunes a los que están actuando en pacientes con cirrosis y EHM.

### 3 OBJETIVOS

En base a todo lo comentado anteriormente, los objetivos generales que se plantean en el presente Trabajo Fin de Máster son:

1. Evaluar la sensibilidad de la batería PHES para detectar el deterioro de la función motora en pacientes cirróticos y relacionarlo con los niveles de amonio en sangre. Para ello se plantean a su vez los siguientes objetivos concretos:
  - Clasificar los pacientes del estudio en función de la ausencia o presencia de EHM mediante la batería de test psicométricos PHES.
  - Estudiar, en base a la clasificación obtenida con el PHES, las alteraciones en la función motora de los pacientes utilizando test psicométricos de coordinación complementarios y en los niveles de amonio en sangre periférica.
2. Caracterizar la neuroinflamación en muestras post mórtem de cerebelo de pacientes con distintos grados de daño hepático mediante el análisis de mediadores de la inflamación en las capas granular y de Purkinje. Para ello se estudiará:
  - El contenido de la enzima glutaminasa.
  - El contenido de la citoquina proinflamatoria TNF- $\alpha$ .
3. Elucidar algún mecanismo mediante el cual la enfermedad hepática induce la infiltración linfocitaria y la neuroinflamación en cerebelo. Se llevará a cabo el análisis de:
  - La presencia de la quimioquina CCL20 en células de meninges.

El desarrollo de estos objetivos podría ayudar a entender mejor la patogénesis de las alteraciones motoras asociadas a la enfermedad hepática.

## 4 MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1 Estudio en pacientes cirróticos

Para este trabajo se seleccionaron 31 pacientes con cirrosis hepática diagnosticada mediante biopsia hepática previa o combinación de criterios radiológicos, clínicos y analíticos procedentes del Servicio de Digestivo del Hospital Clínico Universitario de Valencia. En el estudio también se incluyó un grupo control constituido por 14 individuos sanos. Todos los participantes firmaron un consentimiento informado antes de someterse a las distintas pruebas. Además, el proyecto en el que se encuadra el trabajo se desarrolló de acuerdo con la Declaración de Helsinki de 1975 y fue previamente aprobado por el Comité Ético de Investigación del Hospital Clínico de Valencia. Para seleccionar los pacientes se establecieron los siguientes criterios de exclusión:

- Presencia de deterioro cognitivo debido a otro trastorno neuropsiquiátrico.
- Consumo de alcohol en los 6 meses previos al estudio.
- EH clínica.
- Hepatocarcinoma u otra enfermedad con una supervivencia aproximada de menos de 3 meses.
- DPIT o peritonitis bacteriana espontánea.

En el caso del grupo control, se descartó previamente la presencia de cualquier enfermedad hepática. En la Tabla 1 se muestra la composición de los diferentes grupos incluidos en el estudio. En primer lugar se revisó la historia clínica de los pacientes, y se anotaron una serie de variables para su posterior evaluación:

- Datos demográficos: sexo, edad y nivel de estudios.
- Causa de la cirrosis (alcohol, infección viral, etc.).
- Presencia de otra u otras enfermedades como diabetes, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), cáncer, insuficiencia renal, etc.
- Descompensaciones: presencia de varices esofágicas, episodios anteriores de EH, ascitis, hipertensión portal.
- Niveles séricos de distintas moléculas como enzimas indicadoras de la función hepática, bilirrubina y la albúmina, entre otras.
- Índices de la función hepática MELD (del inglés *Model for End-stage Liver Disease*) y Child-Pugh.
- Tratamientos farmacológicos recibidos y hábitos dietéticos.

Posteriormente se fue citando a pacientes y controles para que acudieran en ayunas. En un mismo día se llevan a cabo las pruebas psicométricas y la extracción de sangre para la determinación de los niveles de amonio, todo ello descrito en los apartados siguientes.

**Tabla 1. Composición de los diferentes grupos incluidos en el estudio.** Todos los pacientes presentan cirrosis alcohólica. Para cada grupo se indica, de arriba hacia abajo: distribución por sexo, media de edad  $\pm$  EEM, etiología de la enfermedad hepática, distribución por la escala Child-Pugh y puntuación media de la escala MELD  $\pm$  EEM.

	Controles	Pacientes	
		Sin EHM	Con EHM
<b>Nº de individuos</b>	14	17	14
<b>Sexo (H/M)</b>	8/6	9/8	11/3
<b>Edad</b>	56 $\pm$ 1	61 $\pm$ 2	64 $\pm$ 2
<b>Alcohol</b>	-	17	14
<b>Escala Child-Pugh A/B/C*</b>	-	10/7/0	6/5/3
<b>Escala MELD<sup>a</sup></b>	-	8 $\pm$ 3	10 $\pm$ 4

\*La puntuación de la escala Child Pugh Score se obtiene valorando entre 1 y 3 la gravedad de la ascitis, la EH, el INR, y los niveles de albúmina y bilirrubina en sangre. Cuanto más alta es la puntuación de cada parámetro, más grave se considera el daño. De la suma de los cinco valores se obtiene la puntuación total, y se representa como A, B o C, donde C implica un peor pronóstico; <sup>a</sup> El sistema de puntuación MELD considera los valores séricos de bilirrubina, creatinina y el INR para predecir la supervivencia de los pacientes en un período de 3 meses.

#### 4.1.1 Determinación de los niveles de amonio en sangre

Para llevar a cabo la medición de amonio en sangre se empleó el aparato Ammonia Checker II o PocketChem BA (Arkray Factory, Inc), que utiliza como reactivo el kit Ammonia Test Kit II (Arkray Factory, Inc). Este aparato, basado en el método de la microdifusión, es capaz de cuantificar (previamente calibrado) los niveles de amonio a partir de una muestra de 20  $\mu$ L de sangre. La ventaja de esta medición reside en su sencillez, rapidez y exactitud. El ensayo debe realizarse con prontitud, ya que la concentración de amonio en la muestra de sangre aumenta conforme transcurre el tiempo desde su extracción.

El kit consiste en unas tiras reactivas que presentan en una de sus caras un espaciador con una capa receptora de muestra con ácido bórico (42,6 mg) e hidróxido sódico (18,7 mg) en uno de sus extremos, así como una capa indicadora con verde de bromocresol (4 mg) debajo. La muestra se aplica sobre la capa receptora con ayuda de una micropipeta sin tocar la superficie con la punta ni con los dedos. Al hacerlo, el agente amortiguador de pH (tampón borato) se disuelve y la muestra se vuelve alcalina. Los iones amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) presentes en la sangre pasan, debido al pH alcalino, a estado gaseoso ( $\text{NH}_3$ ), y atraviesa los poros de la capa receptora hasta la indicadora, produciendo color. La intensidad de la coloración es proporcional a la cantidad de  $\text{NH}_3$  generada, de modo que el aparato es capaz de

determinar cuantitativamente el nivel de amonio en la muestra de sangre midiendo el color desarrollado.

Para cada muestra se siguió el mismo protocolo. Se depositaron 20  $\mu\text{L}$  de sangre total recién extraída del paciente sobre la capa receptora. Tras 180 segundos (tiempo de reacción) se retiró el espaciador y se colocó la tira reactiva en la unidad óptica del aparato, con la mancha coloreada de la capa indicadora mirando hacia abajo. Se cierra la tapa del dispositivo y el nivel de amonio aparece en la pantalla, expresado en  $\mu\text{mol/L}$ . Se repitió la medición de cada muestra tres veces para asegurar un resultado fiable. Esta técnica permite detectar niveles de amonio en un rango de 7-286  $\mu\text{mol/L}$ . Los valores esperados en individuos adultos sanos oscilan entre 11 y 32  $\mu\text{mol/L}$ .

#### **4.1.2 Clasificación de pacientes mediante la batería PHES**

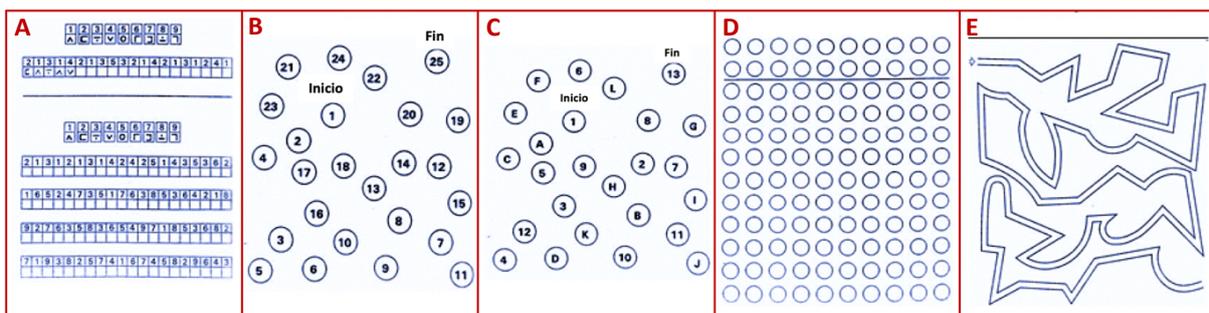
Las pruebas psicométricas se llevaron a cabo tras la extracción de sangre y la determinación del amonio. En primer lugar, los participantes realizan la batería PHES, descrita a continuación, para poder clasificar a los pacientes en 2 subgrupos: con EHM y sin EHM.

El PHES permite detectar la presencia de deterioro neurológico y se considera el '*gold standard*' en el diagnóstico de EHM (Weissenborn *et al.*, 2001; Ferenci *et al.*, 2002). La batería se realizó en papel, con un rotulador, controlando los tiempos con un cronómetro e individualmente en una sala reservada, favoreciendo un entorno tranquilo para los participantes. Consiste en 5 pruebas psicométricas, 4 de ellas con una fase de entrenamiento o pre-test sin puntuación ni anotación de tiempo:

1. Test de dígitos y símbolos (TDS): evalúa la memoria de trabajo así como la velocidad de procesamiento. Se basa en una clave de números en la que cada dígito, del 1 al 9, se corresponde con un símbolo distinto. Se facilita una plantilla con filas de 20 números, cada uno asociado a una casilla inferior en blanco. El pre-test consiste en una fila con las cinco primeras casillas y se deben completar las restantes, una tras otra y de izquierda a derecha, con el símbolo correspondiente. En la fase de test hay 4 filas más de números, y el sujeto debe completar en 90 segundos el máximo número de casillas del mismo modo que en el pre-test. El ejercicio se puntúa teniendo en cuenta el número de aciertos en el tiempo indicado.
2. Test de conexión numérica A (TCN-A): evalúa la velocidad de procesamiento y la atención. Consiste en una serie de números (1-25) encerrados en círculos y distribuidos de manera desordenada en una hoja. El objetivo es unir dichos números de menor a mayor trazando líneas, sin levantar el rotulador del papel y siempre por el camino más corto. La fase de entrenamiento y de test son

iguales, pero en la segunda los números se encuentran en posiciones diferentes. La prueba se puntúa con el tiempo empleado en completar la tarea.

3. Test de conexión numérica B (TCN-B): evalúa las mismas capacidades y se puntúa igual que la prueba anterior, pero con un grado de dificultad mayor. No hay pre-test, sino que el ejercicio se realiza inmediatamente después del TCN-A. En este caso hay números (1-13) y letras (A-L) en círculos y distribuidos nuevamente de forma desordenada. El sujeto debe unir números y letras de forma alterna (1-A-2-B...-L-13) con líneas, sin levantar el rotulador del papel y siempre por el camino más corto. La prueba se puntúa con el tiempo empleado en completar la secuencia.
4. Test de puntos seriados (TPS): evalúa la coordinación visoespacial. Consiste en una plantilla de círculos y el sujeto debe marcar en ellos, un punto con el rotulador lo más centrado posible. Como entrenamiento han de completarse las dos primeras filas de la plantilla, y en la fase de test el resto. Cada fila de círculos debe rellenarse de izquierda a derecha. El ejercicio se puntúa con el tiempo que tarda el individuo en marcar todos los círculos.
5. Test de la línea quebrada (TLQ): evalúa también la coordinación visoespacial. El objetivo es recorrer con el rotulador un laberinto de extremos abiertos que presenta tramos curvos y rectos, completando el recorrido lo más rápido posible, intentando no salirse ni tocar las líneas, sin levantar la punta del rotulador y sin mover la hoja. El pre-test consiste en un laberinto más sencillo. Para obtener la puntuación de la prueba se suman los segundos empleados. Por cada fallo cometido se añaden segundos de penalización, y dependen de la longitud y la gravedad del error.



**Figura 6. Batería de test psicométricos PHES. A:** test de dígitos y símbolos; **B:** test de conexión numérica A; **C:** test de conexión numérica B; **D:** test de puntos seriados; **E:** test de la línea quebrada.

#### Cálculo del PHES:

La puntuación numérica total de la batería PHES se obtiene a través de una aplicación informática, utilizando tablas con los valores de referencia establecidos por la Red Encefalopatía Hepática (RedEH) para la población española (Romero-Gómez *et al.*, 2007). Se puede acceder a dicha aplicación a través del enlace web <http://www.redeh.org>. Han de introducirse los siguientes datos: edad del sujeto; nivel de estudios (años cursados); puntuación de cada prueba, siendo en el TDS el

número de aciertos y en el resto de ejercicios el tiempo empleado en segundos. El programa ajusta los resultados a la edad y el nivel de estudios de acuerdo con las tablas de normalidad de individuos sanos, y devuelve un número entero por cada test que puede ser positivo o negativo. La suma de los cinco valores da la puntuación global del PHES. Se considera que un paciente presenta EHM cuando la puntuación global es igual o menor a -4 (Weissenborn *et al.*, 2001).

#### **4.1.3 Estudio de las alteraciones motoras: test de coordinación**

Para caracterizar con mayor detalle las alteraciones en la función motora que se desarrollan a raíz del daño hepático, se escogieron dos test sencillos y de corta duración: test de coordinación bimanual y test de coordinación visomotora.

##### **4.1.3.1 Test de coordinación bimanual**

Esta prueba se realizó con un tablero perforado con dos matrices de 4 filas y 10 orificios fila colocado delante del paciente (Figura 7A). En una de las matrices han de colocarse previamente 40 clavijas metálicas. El ejercicio consiste en pasar las clavijas desde su posición inicial hasta la otra matriz del tablero. Con cada mano se coge una clavija, empezando por los extremos exteriores de la fila más cercana al centro del tablero, y han de pasarse con ambas manos simultánea y simétricamente hasta sus posiciones equivalente de la otra matriz. Es decir, se van trasladando las 40 clavijas por filas y de fuera hacia dentro. Esta tarea se repite dos veces en cada dirección (matriz inferior → matriz superior; matriz superior → matriz inferior; matriz inferior → matriz superior; matriz superior → matriz inferior) y se puntúa cada una con el tiempo que tarda el sujeto en trasladar las 40 clavijas. Después se suman los minutos de los cuatro intentos y utilizando una tabla estandarizada para el test se asigna a cada paciente un valor de percentil en función del tiempo de realización. Dicha tabla considera el sexo del individuo, pues la tipificación del test mostró que las mujeres requieren más tiempo para completar el ejercicio.

#### 4.1.3.2 Test de coordinación visomotora

Para realizar esta prueba se utilizó una caja-tablero que contiene en una de sus caras una placa metálica con 36 huecos cuadrados distribuidos en filas de 6 x 6 con diferentes orientaciones. En los huecos han de utilizarse 36 prismas metálicos iguales, de uno en uno, completando los 6 de cada fila de izquierda a derecha y cada fila de arriba hacia abajo. Los prismas están colocados de forma desordenada en el espacio de la otra mitad de la caja, y el objetivo es colocarlos con la mayor rapidez y precisión en los movimientos utilizando únicamente la mano dominante. Todas las piezas caben en cualquiera de los agujeros, siempre y cuando se coloquen en la orientación correcta. El test se realiza dos veces y se puntúa con el tiempo que se emplea en colocar los 36 prismas. Al igual que en el test anterior, se suma el tiempo en minutos de ambos intentos y mediante una tabla estandarizada se da un valor de percentil al resultado, teniendo en cuenta el sexo del sujeto por el mismo motivo.

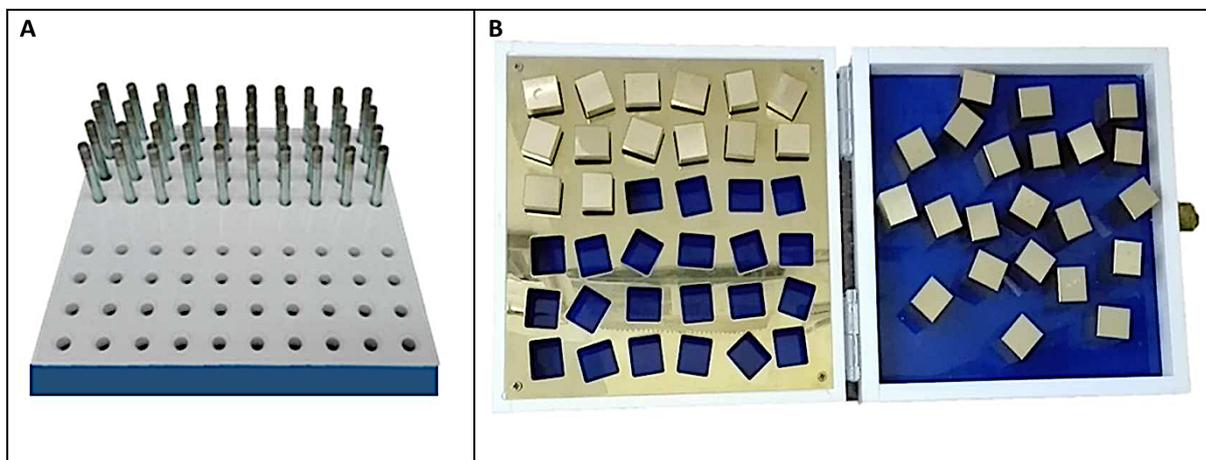


Figura 7. Test de coordinación motora. A: coordinación bimanual; B: coordinación visomotora.

## 4.2 Análisis post mórtem de muestras de cerebelo humano

Las muestras de cerebelos humanos utilizadas en este trabajo se obtuvieron de distintos centros:

- Instituto de Medicina Legal y Ciencias Forenses de Valencia (IML y CCFF de Valencia o IMLV).
- Biobanco del Hospital Universitario Fundación Alarcón (HUFA).
- Biobanco hospitalario A Coruña.

Se extrajeron secciones de cerebelo de sujetos fallecidos control (personas sin daño hepático ni neurodegenerativo) y con distintos grados de enfermedad hepática crónica, haciendo un total de tres categorías: control, esteatohepatitis y cirrosis (Tabla 2). El grupo de esteatohepatitis fue evaluado previamente por expertos hepatólogos, que analizaron cortes histológicos del hígado de los pacientes y aplicaron una versión simplificada del sistema de puntuación propuesta por el Instituto Nacional de

Diabetes y Enfermedades Digestivas y Renales (Kleiner *et al.*, 2005) De este modo se subdividió dicha categoría en tres subgrupos (SH1, SH2 y SH3) en función de la gravedad. En cada caso se obtuvo previamente la autorización que permite la recogida de las muestras y su uso en la investigación.

Las secciones extraídas fueron fijadas en formol al 10% durante 96 a 4 °C. Una vez transcurrido este tiempo, se colocaron en *cassettes* para histología (Leica Biosystems) y fueron tratadas utilizando un procesador de tejidos inteligente Leica ASP 300 (Leica Microsystems).

**Tabla 2.** Resumen de los sujetos fallecidos analizados. De izquierda a derecha se indica: código de cada individuo, grado de enfermedad hepática, sexo, edad, causa de la muerte y procedencia de la muestra. HUVA, Hospital Universitario Fundación Alarcón; IMLV, Instituto de Medicina Legal y Ciencias Forenses de Valencia; n.d., no disponible.

CÓDIGO	GRADO	SEXO	EDAD	CAUSA DE LA MUERTE	BIOBANCO
CASO 11	Control	M	56	n.d.	n.d.
CASO 13	Control	H	49	n.d.	n.d.
CASO 14	Control	H	45	n.d.	HUFA
CASO 16	Control	H	79	n.d.	HUFA
CASO 18	Control	H	76	n.d.	HUFA
CASO 19	Control	H	76	n.d.	HUFA
CASO 20	Control	H	62	Isquemia mesentérica	HUFA
CASO 21	Control	H	72	n.d.	HUFA
CASO 22	Control	H	60	Broncoaspiración	HUFA
CASO 23	Control	H	67	n.d.	HUFA
CASO 1	SH1	H	46	Cardiopatía isquémica	IMLV
CASO 2	SH1	H	49	Cardiopatía isquémica	IMLV
CASO 7	SH1	H	36	Asfixia por ahorcamiento	IMLV
CASO 69	SH1	H	46	Muerte súbita cardíaca	IMLV
CASO 70	SH1	H	50	Muerte súbita cardíaca	IMLV
CASO 71	SH1	H	53	Muerte súbita cardíaca	IMLV
CASO 72	SH1	M	47	Muerte súbita cardíaca	IMLV
CASO 73	SH1	H	45	Muerte súbita cardíaca	IMLV
CASO 78	SH1	H	51	Muerte súbita cardíaca	IMLV
CASO 3	SH2	M	70	Hemorragia gastrointestinal	IMLV
CASO 24	SH2	H	40	n.d.	IMLV
CASO 68	SH2	H	55	Muerte súbita cardíaca	IMLV
CASO 74	SH2	H	48	Muerte súbita cardíaca	IMLV
CASO 75	SH2	H	30	Muerte súbita cardíaca	IMLV
CASO 76	SH2	H	45	Muerte súbita cardíaca	IMLV
CASO 5	SH3	H	49	Cardiopatía isquémica severa	IMLV
CASO 9	SH3	H	44	Reacción adversa alcohol-medicamento	IMLV
CASO 10	SH3	H	49	n.d.	IMLV
CASO 77	SH3	H	47	Muerte súbita cardíaca	IMLV
CASO 97	SH3	n.d.	n.d.	n.d.	IMLV
CASO 4	Cirrosis	H	53	Hemorragia gastrointestinal	IMLV
CASO 8	Cirrosis	H	69	Hemorragia gastrointestinal	IMLV
CASO 15A51	Cirrosis	n.d.	n.d.	Sepsis intraabdominal	Biobanco A Coruña
CASO 98	Cirrosis	n.d.	n.d.	n.d.	IMLV
CASO 13A37	Cirrosis	H	54	Coma metabólico	Biobanco A Coruña

### 4.2.1 Inmunohistoquímica

Para realizar los experimentos de inmunohistoquímica en cerebelo de humanos, las muestras fueron incluidas en parafina y posteriormente se realizaron cortes horizontales (1 o 2 por cada sujeto y molécula a analizar, dependiendo de la disponibilidad de muestra de un solo hemisferio cerebeloso o de ambos) de 5µm de grosor empleando un micrótopo de rotación semi-automático (Tecnylab, C.B.) que se depositaron en un baño termostático y con la ayuda de unas pinzas y se ‘pescaron’ sobre portaobjetos gelatinizados (Thermo Fisher Scientific Inc.).

Para eliminar la parafina de los cortes, los portaobjetos se colocan en una cestilla y se incuban las muestras en estufa (BINDER GmbH) durante 1 hora a 62 °C. Una vez transcurrido ese tiempo se lleva a cabo la hidratación del tejido con *Autostainer* Leica (Leica Biosystems), sumergiendo los cortes en soluciones con concentraciones decrecientes de alcoholes: dos pases en xileno de 10 minutos cada uno; dos pases en etanol absoluto de 5 minutos cada uno; tres pases en etanol al 95%, 70% y 50% respectivamente de 5 minutos cada uno. Entre cada pase se eliminó el exceso de líquido. Por último se lavaron los portas en agua destilada.

Tras la hidratación se llevó a cabo la recuperación antigénica por calor, proceso en el que se eliminan los enlaces covalentes con los antígenos que se forman durante la fijación y el proceso de inclusión y que dificultarían su reconocimiento posterior por parte de los anticuerpos primarios. En función del anticuerpo primario utilizado, los cortes se sumergen en cubetas con una solución *HIGH* (tampón de citrato de sodio) (Heat Retriever, FLEX TRS High) o *LOW* (Heat Retriever, FLEX TRS Low). En este trabajo se utilizó la segunda. Mediante un tratamiento con calor a 92-97°C durante 20 minutos se consigue romper dichos enlaces y aumentar así la efectividad de los anticuerpos.

Para llevar a cabo la inmunohistoquímica se empleó un equipo de tinción automatizada *Autostainer* Link 48 (Dako Diagnostics Ltd., Agilent Technologies Inc.). En primer lugar se lavan los cortes con un tampón fosfatos o PB (*phosphate buffered*) 0,1M y posteriormente se incuban con Endogenous Enzyme Block (FLEX peroxidase-Blocking Reagent, DM841) durante 5 minutos, solución para bloquear la peroxidasa endógena. Se lavan los cortes con fosfotransacetilasa o PTA (*phosphotransacetylase*) y se incuban con el anticuerpo primario correspondiente diluido en solución de bloqueo con suero de cabra (NGS, del inglés *normal goat serum*) (Thermo Fisher Scientific Inc.) durante 1 hora. En este trabajo se utilizaron anticuerpos primarios para detectar TNF- $\alpha$ , glutaminasa y CCL20, cuyas características se recogen en la Tabla 3. Se repite el lavado con PTA para eliminar los restos de anticuerpo que no se hayan unido al antígeno correspondiente en el tejido, y a continuación se repite la incubación en la solución de bloqueo. El revelado de las muestras se consigue utilizando una solución ya preparada de anticuerpos secundarios de cabra (Dako, Agilent Technologies Inc.)

conjugados con peroxidasa de rábano (HRP por sus siglas en inglés *Horseradish Peroxidase*). Esta enzima reacciona con un sustrato que se genera cuando la diaminobencidina (DAB) reacciona con agua oxigenada (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). La incubación con el anticuerpo secundario es de 20 minutos, y la fracción que no se une al primario se elimina con 3 lavados en PB 0,1M. Para revelar se incuban las muestras 10 minutos con la mezcla que contiene DAB, se lavan de nuevo con PB 0,1M y se tratan con hematoxilina durante 2 minutos para contrateñir los núcleos y localizar fácilmente las capas a analizar del cerebelo. Por último los cortes se lavan con agua para eliminar el exceso de hematoxilina y se deshidratan en cubetas con concentraciones crecientes de alcoholes: etanol al 70%, 96% y 100% durante 5, 5 y 10 minutos respectivamente. A continuación se mantienen en xileno durante al menos 10 minutos y finalmente se montan con (liquido) y cubreobjetos (Thermo Fisher Scientific Inc.).

**Tabla 3.** Anticuerpos primarios utilizados en los experimentos de inmunohistoquímica.

Anticuerpo	Especie	Casa comercial	Ref. Catálogo	Dilución	Recuperación antigénica	Tiempo de incubación (min)
Anti-TNF $\alpha$	Conejo	Abcam	Ab66579	1:200	Low	Overnight
Anti-glutaminasa	Conejo	NOVUS	NBP2-29940	1:100	Low	Overnight
Anti-CCL20	Conejo	Abcam	Ab9829	1.200	Low	Overnight

Una vez secas las preparaciones, se escanearon con los escáneres Pannoramic 250 Flash III (3DHISTECH Ltd.) o Aperio VERSA (Leica Biosystems Inc.), y las imágenes obtenidas fueron analizadas con los programas *Pannoramic Viewer* (3DHISTECH Ltd.) y *Aperio ImageScope* (Leica Biosystems Imaging Inc.) respectivamente. Ambos programas permiten tomar capturas a diferentes aumentos de las regiones de interés.

## 4.2.2 Análisis de las imágenes de inmunohistoquímica

### 4.2.2.1 Contenido de TNF- $\alpha$ y glutaminasa en corteza cerebelosa

Se cuantificó el contenido de cada molécula en las capas de Purkinje y granular de los cortes de cerebelo. Para ello se realizaron, por sujeto, entre 10 y 15 capturas (repartidas por los cortes) de cada capa y para cada molécula analizada utilizando los programas *Pannoramic Viewer* y *Aperio ImageScope* anteriormente mencionados. Las capturas de la capa de Purkinje se tomaron a un aumento de 20x (incluyendo una zona de capa molecular), y las de la capa granular a un aumento de 56x.

Para analizar las células de Purkinje de cada captura se utilizó el programa de análisis de imagen *ImageJ*. Con la herramienta *ROI Manager* se delimitaron manualmente el área total y nuclear de cada

célula, y se empleó la función *XOR* para obtener la diferencia entre ambas, es decir, la zona correspondiente al citoplasma. Además, se seleccionaron 4 rectángulos en las regiones más uniformes de capa molecular, que se utilizaron como fondo para calcular el contraste entre esta y las células de Purkinje, garantizando una cuantificación más equitativa entre las distintas imágenes. Se midió el valor medio de la intensidad de gris (MGV, del inglés *Mean gray value*), empleando el modo *Invert* para evitar valores negativos. Se calculó el promedio de la intensidad media de las regiones de fondo, y se restó dicho valor a la intensidad media de cada área celular dibujada. De este modo se obtuvieron tres valores enteros positivos por cada neurona de Purkinje: intensidad media total, nuclear y citoplásmica.

Para el análisis de la capa granular se empleó el programa Image-Pro-Plus (Media Cybernetics Inc.). Se seleccionaron manualmente las regiones con marca de la molécula a cuantificar, y se utilizaron los parámetros densidad media (MD, del inglés *mean density*) y *Per area (Object/Total)* para determinar la intensidad media de la marca y el área ocupada por esta, respectivamente. Por cada captura de capa granular se realizó otra adicional (con el mismo aumento) de una región de capa molecular adyacente que se utilizó como fondo en cada caso. Restando a la intensidad media de la marca (capa granular) la intensidad media del fondo (capa molecular) se consiguió una corrección similar a la realizada en la cuantificación de las neuronas de Purkinje. El área marcada no fue corregida y se expresó como porcentaje.

Además de la corrección con la capa molecular, se llevó a cabo una segunda corrección empleando cortes de cerebelo humano seleccionados como controles negativos, que únicamente fueron teñidos con hematoxilina. Se utilizaron 5 cortes de cinco sujetos diferentes, y de cada uno se tomaron 5 capturas por cada capa. El análisis se realizó de la misma manera en el caso de las neuronas de Purkinje, pero para la capa granular se determinó la MD de toda el área excluyendo los núcleos celulares, y el parámetro *Per area (Object/Total)* no se tuvo en cuenta (se asume que no hay marca de TNF- $\alpha$  ni de glutaminasa en los controles negativos, solo hematoxilina). De este modo pudo estimarse la intensidad que la hematoxilina aporta al tejido. Para cada capa se calculó el promedio de las 25 capturas y este se restó a las intensidades medias ya corregidas con la capa molecular.

#### **4.2.2.2 Cuantificación de nucléolos con marca de TNF- $\alpha$**

Además de la cuantificación del contenido relativo de TNF- $\alpha$  en neuronas de Purkinje, se contó manualmente en cada captura el número de células con presencia de dicha molécula en el nucléolo utilizando el programa *ImageJ*. Dicho valor se dividió entre el número de células totales y se expresó como porcentaje.

#### 4.2.2.3 Análisis de CCL20 en meninges

Para evaluar la presencia de células CCL20<sup>+</sup> se realizaron entre 10 y 15 campos de la región meníngea por sujeto (de forma repartida por los cortes) utilizando los programas *Pannoramic Viewer* y *Aperio ImageScope*, y se cuantificaron mediante el programa de análisis de imagen *ImageJ*. Con la herramienta *ROI Manager* se delimitaron manualmente las zonas a analizar, cuantificando el área total. Los valores fueron convertidos a  $\mu\text{m}$  ajustando la escala, pues por defecto el programa genera los datos en píxeles. Se contaron las células CCL20<sup>+</sup> de las zonas seleccionadas en cada imagen y se expresó el resultado por unidad de área (células CCL20<sup>+</sup>/mm<sup>2</sup>).

### 4.3 Análisis estadístico

Los resultados se representaron como media  $\pm$  EEM (error estándar de la media o SEM, del inglés *standard error of the mean*) del número de sujetos en cada grupo en el caso del estudio en pacientes cirróticos, y del número de capturas en cada estadio de daño hepático en el caso del estudio de muestras post mórtem. Ya que en este trabajo todos los estudios estadísticos incluyen más de dos grupos de datos a comparar, se optó en cada gráfica por un análisis de varianza (ANOVA, del inglés *Analysis of variance*) de una vía seguido del test de comparaciones múltiples de Tukey para comparar las medias de las columnas entre sí por parejas. Se consideró como significativo un p-valor  $< 0,05$ .

La normalidad en la distribución de los datos en los distintos grupos fue evaluada mediante el test de D'Agostino & Pearson. Una vez ajustada dicha normalidad, se comprobó en los ANOVA si la diferencia entre las desviaciones estándar (SD, del inglés *standard deviation*) era significativamente diferente, y en caso afirmativo se realizó la prueba de Brown-Forsythe y Welch.

Todos los análisis estadísticos de este trabajo se llevaron a cabo con el programa *Prism 8* (GraphPad Software Inc.).

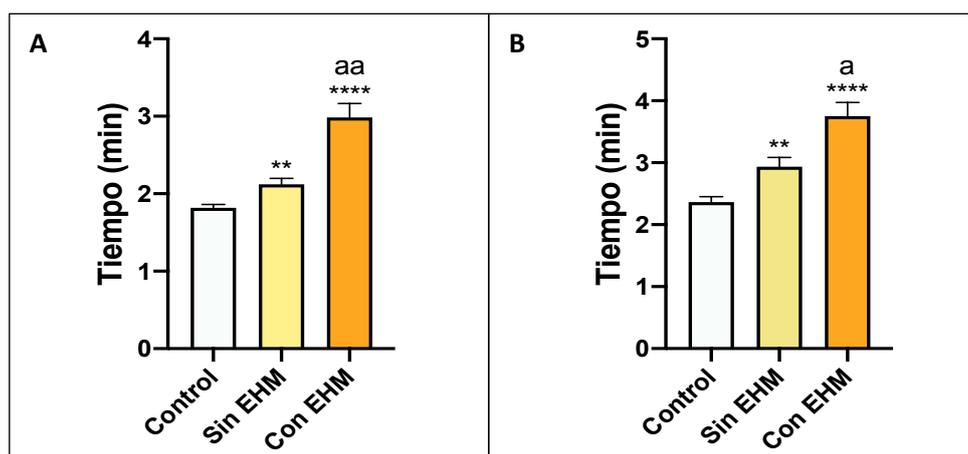
## 5 RESULTADOS

### 5.1 Alteraciones neurológicas en pacientes cirróticos

Para clasificar a los sujetos que participaron en el estudio, se empleó la batería PHES. En la Tabla 1 se muestran los tres grupos experimentales (controles, pacientes cirróticos sin EHM y pacientes cirróticos con EHM). No existen diferencias significativas entre los tres grupos en cuanto a sexo ni edad.

#### 5.1.1 La batería PHES no detecta todos los pacientes con déficits motores tempranos

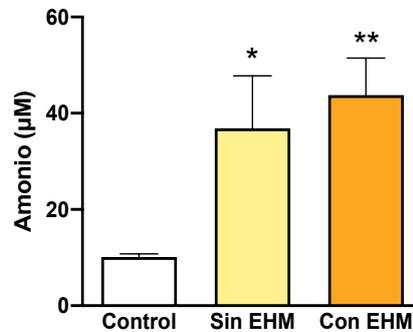
Para estudiar la sensibilidad de las pruebas psicométricas PHES, se evaluó la función motora empleando dos test psicomotores complementarios: de coordinación bimanual y visomotora. Como cabía esperar, los pacientes con cirrosis y con deterioro neurológico leve diagnosticado necesitaron más tiempo para completar la primera prueba ( $2,99 \pm 0,18$  min;  $p$ -valor  $< 0,0001$ ) (Figura 8A) con respecto a los individuos sanos ( $1,82 \pm 0,04$  min), pero también se observó un aumento significativo en el grupo sin EHM ( $2,12 \pm 0,08$  min;  $p$ -valor  $< 0,01$ ) y entre ambos tipos de pacientes ( $p$ -valor  $< 0,01$ ). En el test de coordinación visomotora se obtuvieron resultados similares (Figura 8B). El tiempo empleado aumentó desde  $2,37 \pm 0,09$  min en los controles hasta  $2,94 \pm 0,15$  min en los pacientes sin EHM ( $p$ -valor  $< 0,01$ ) y alcanzó su máximo en el grupo con EHM ( $3,75 \pm 0,22$  min;  $p$ -valor  $< 0,0001$ ). Ambos tipos de pacientes cirróticos difieren significativamente entre sí, aunque de manera menos pronunciada ( $p$ -valor  $< 0,05$ ).



**Figura 8. Resultados de los test de coordinación.** A: test de coordinación bimanual. B: test de coordinación visomotora. Los pacientes cirróticos requieren más tiempo para realizar las pruebas, especialmente el grupo con deterioro neurológico. De izquierda a derecha, los valores representan la media  $\pm$  EEM de 14 individuos en el grupo control, 17 pacientes sin EHM y 14 pacientes con EHM. Los asteriscos indican diferencia significativa respecto al grupo control (\*\*,  $p$ -valor  $< 0,01$ ; \*\*\*\*,  $p$ -valor  $< 0,0001$ ) y "a" respecto al grupo sin EHM (a,  $p$ -valor  $< 0,05$ ; aa,  $p$ -valor  $< 0,01$ ). EHM, encefalopatía hepática mínima.

### 5.1.2 Los niveles de amonio aumentan en los pacientes cirróticos

En el presente trabajo se analizaron los niveles de amonio en sangre periférica de todos los sujetos, ya que este es uno de los principales factores que promueven el desarrollo de las alteraciones neurológicas en la EH, como ya se ha comentado.



**Figura 9. Concentración de amonio en sangre periférica.** Los niveles de amonio aumentan en los pacientes con cirrosis. De izquierda a derecha, los valores representan la media  $\pm$  EEM de 14 individuos en el grupo control, 17 pacientes sin EHM y 14 pacientes con EHM. Los asteriscos indican diferencia significativa respecto al grupo control (\*, p-valor < 0,05; \*\*, p-valor < 0,01). EHM, encefalopatía hepática mínima.

Los resultados (Figura 9) mostraron un incremento significativo tanto del grupo de pacientes con EHM ( $43,80 \pm 7,68 \mu\text{mol/L}$ ; p-valor < 0,01) como del grupo sin EHM ( $36,88 \pm 10,89 \mu\text{mol/L}$ ; p-valor < 0,05) con respecto al grupo control ( $10,12 \pm 0,68 \mu\text{mol/L}$ ), lo cual era esperable. Al comparar ambos grupos de pacientes cirróticos, los niveles de amonio tienden a aumentar en los individuos clasificados por el PHES con deterioro neurológico leve, si bien no se alcanza una diferencia estadísticamente relevante.

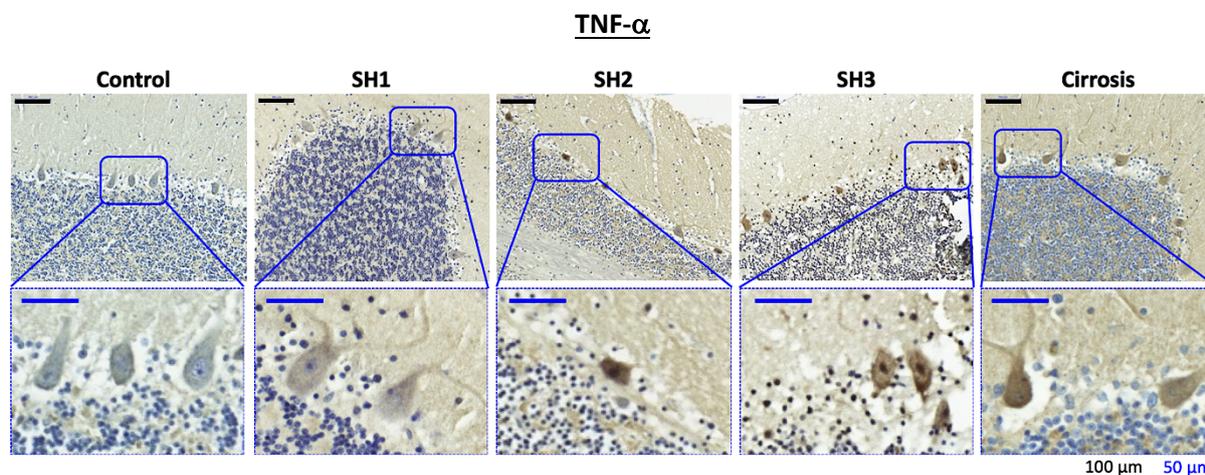
### 5.2 Estudio en muestras post mórtem de cerebelo de pacientes con distintos grados de enfermedad hepática

Para llevar a cabo las distintas pruebas se han empleado muestras de cerebelo de pacientes control (n=3-6), con esteatohepatitis leve (SH1; n=3-7), esteatohepatitis moderada (SH2; n=3-5), esteatohepatitis severa (SH3; n=3-5) y cirrosis (n=3-4). Los datos de los sujetos incluidos en el estudio se detallan en la Tabla 2 del apartado 3.2 de Materiales y métodos.

Para estudiar la neuroinflamación se analizó el contenido de la citoquina TNF- $\alpha$  y la enzima glutaminasa (moléculas implicadas directa o indirectamente en procesos inflamatorios) en los distintos estadios de daño hepático, analizando las capas granular y de Purkinje de la corteza del cerebelo.

### 5.2.1 El contenido de TNF- $\alpha$ en cerebelo aumenta ya en esteatohepatitis leve

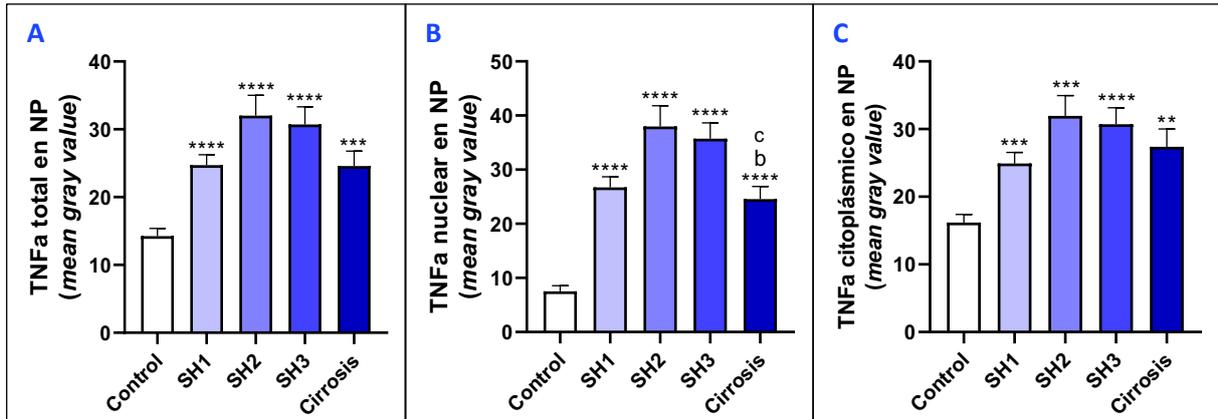
En análisis del TNF- $\alpha$  en la capa de Purkinje, muestra un aumento de esta citoquina ya en los estadios tempranos de enfermedad hepática (Figura 10).



**Figura 10. Contenido de TNF- $\alpha$  en capa de Purkinje de cerebelo.** Imágenes representativas (20x) de neuronas de Purkinje teñidas con hematoxilina y marcadas con el anticuerpo anti-TNF- $\alpha$  (fila superior) y ampliación (40x) (fila inferior). Los pacientes con distintos grados de daño hepático muestran un aumento del contenido de TNF- $\alpha$ . SH1, esteatohepatitis de grado 1; SH2, esteatohepatitis de grado 2; SH3, esteatohepatitis de grado 3.

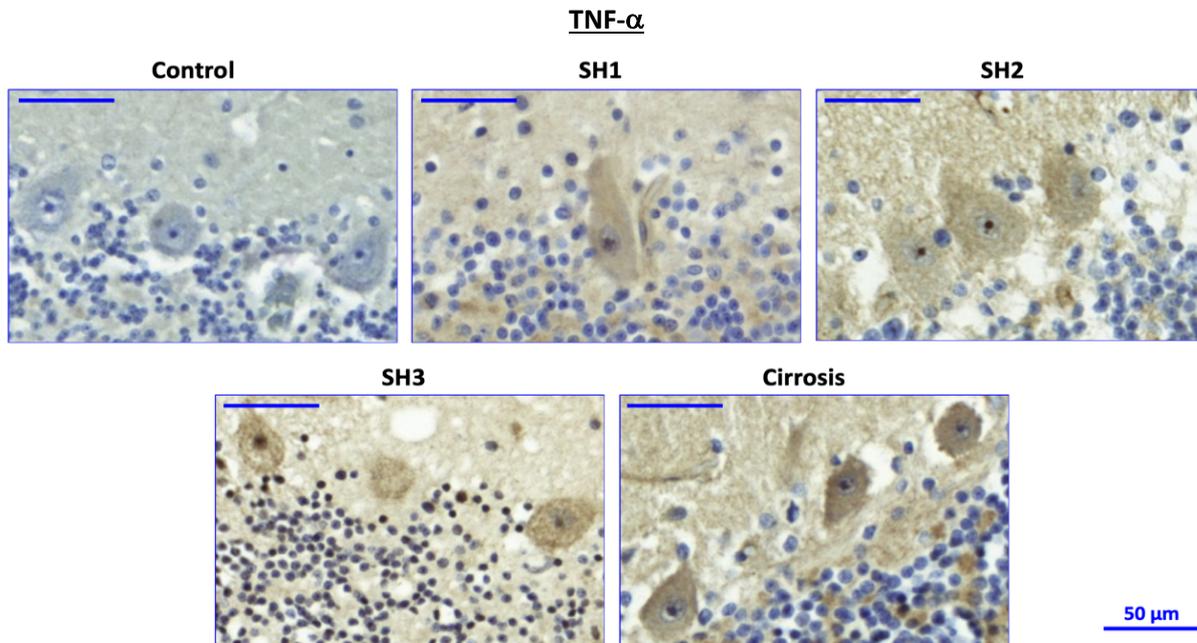
Se observó un aumento significativo del contenido total de TNF- $\alpha$  (intensidad sobre área celular total) en los tres grados de esteatohepatitis con respecto al grupo control ( $14,24 \text{ MGV} \pm 1,15$ ), siendo: SH1 ( $24,70 \pm 1,54 \text{ MGV}$ ; p-valor  $< 0,0001$ ), SH2 ( $32,02 \pm 2,99 \text{ MGV}$ ; p-valor  $< 0,0001$ ) y SH3 ( $30,70 \pm 2,62 \text{ MGV}$ ; p-valor  $< 0,0001$ ). El grupo de cirrosis mostró un incremento menor pero también significativo ( $24,60 \pm 2,19 \text{ MGV}$ ; p-valor  $< 0,001$ ) con respecto al grupo control (Figura 11A). El análisis subcelular del TNF- $\alpha$  (Figura 11B) mostró un aumento significativo y más acusado del contenido de la citoquina en el núcleo en los cuatro estadios de daño hepático con respecto a los controles ( $7,52 \pm 1,06 \text{ MGV}$ ), siendo: SH1 ( $26,73 \pm 1,95 \text{ MGV}$ ; p-valor  $< 0,0001$ ), SH2 ( $37,96 \pm 3,84 \text{ MGV}$ ; p-valor  $< 0,0001$ ), SH3 ( $35,73 \pm 2,94 \text{ MGV}$ ; p-valor  $< 0,0001$ ) y cirrosis ( $24,56 \pm 2,35 \text{ MGV}$ ; p-valor  $< 0,0001$ ). Este último grupo mostró además una disminución significativa con respecto a los pacientes con esteatohepatitis moderada y severa (p-valor  $< 0,05$ ). Por último, los resultados referentes al contenido de TNF- $\alpha$  citoplásmico mostraron una tendencia similar a al contenido total, con un aumento significativo en los pacientes con SH1 ( $24,91 \pm 1,64 \text{ MGV}$ ; p-valor  $< 0,001$ ) con respecto al grupo control ( $16,19 \pm 1,17 \text{ MGV}$ ) que se acentúa en SH2 ( $31,94 \pm 2,99 \text{ MGV}$ ; p-valor  $< 0,001$ ) y SH3 ( $30,71 \pm 2,43 \text{ MGV}$ ; p-valor  $< 0,0001$ ), para volver a descender en los pacientes cirróticos ( $27,40 \pm 2,61 \text{ MGV}$ ; p-valor  $< 0,01$ ) (Figura 11C).

### TNF- $\alpha$



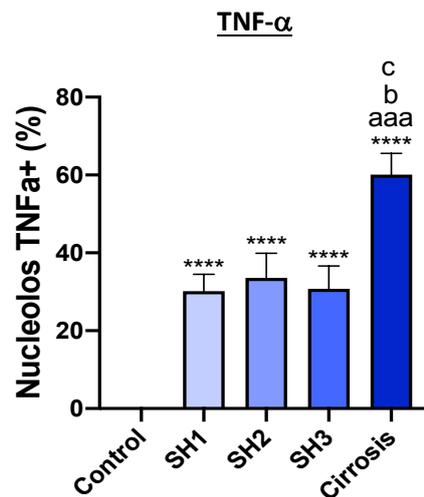
**Figura 11. Intensidad promedio de TNF- $\alpha$  en neuronas de Purkinje.** Resultados del análisis de las imágenes de inmunohistoquímica en el grupo control y en los distintos grados de enfermedad hepática para el área celular total (A), nuclear (B) y citoplásmica (C). Los pacientes con esteatohepatitis muestran un aumento progresivo del contenido de TNF- $\alpha$  que se revierte ligeramente en el estadio de cirrosis. Los valores son la media  $\pm$  EEM de 4-7 individuos por cada grupo. Los asteriscos indican diferencia significativa respecto al grupo control (\*\*, p-valor < 0,01; \*\*\*, p-valor < 0,001; \*\*\*\* p-valor < 0,0001), "b" respecto al grupo SH2 (b, p-valor < 0,05) y "c" respecto al grupo SH3 (c, p-valor < 0,05). NP, neurona de Purkinje; SH1, esteatohepatitis de grado 1; SH2, esteatohepatitis de grado 2; SH3, esteatohepatitis de grado 3.

Además de la intensidad media en las tres regiones celulares mencionadas, se observaron diferencias de marca a nivel de nucleolo entre los distintos grupos, por lo que se llevó a cabo la cuantificación del número de neuronas de Purkinje con presencia de TNF- $\alpha$  en esta región. El número de nucleolos que expresan la citoquina proinflamatoria aumenta en presencia de daño hepático (Figura 12).



**Figura 12. Presencia de TNF- $\alpha$  en nucleolo de neuronas de Purkinje de cerebelo.** Imágenes representativas (40x) de la tinción con hematoxilina y el marcaje con el anticuerpo anti- TNF- $\alpha$  de la capa de Purkinje. Las muestras correspondientes a los cuatro estadios de daño hepático muestran localización nucleolar de la citoquina. SH1, esteatohepatitis de grado 1; SH2, esteatohepatitis de grado 2; SH3, esteatohepatitis de grado 3.

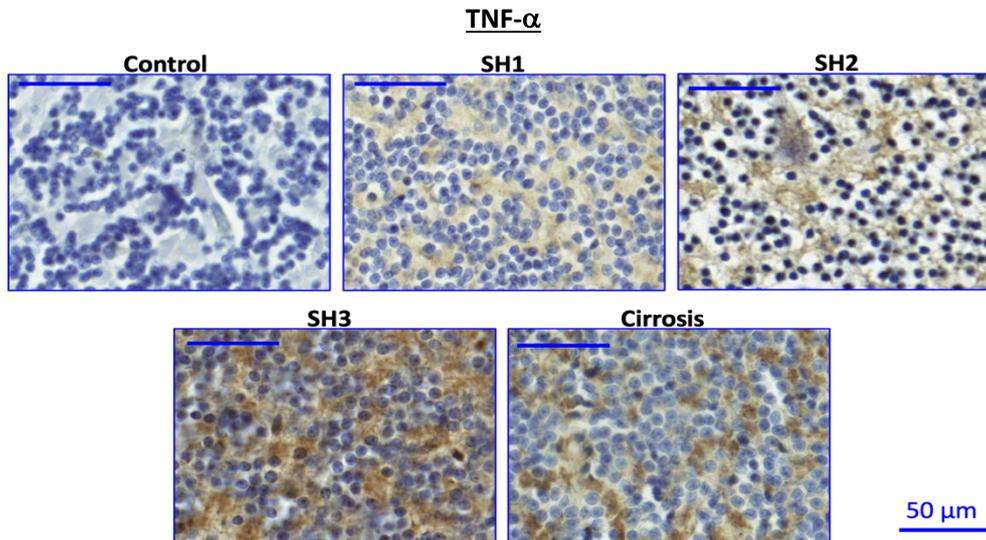
Los resultados obtenidos de dicho conteo muestran un aumento significativo del porcentaje de nucléolos marcados en los cuatro grupos de pacientes ( $p$ -valor  $< 0,0001$ ) con respecto a los sujetos control ( $0 \pm 0 \%$ ) (Figura 13). En los tres grados de esteatohepatitis el porcentaje es similar (SH1:  $30,15 \pm 4,35 \%$ ; SH2:  $33,58 \pm 6,65 \%$ ; y SH3:  $30,74 \pm 5,87 \%$ ), y en los pacientes cirróticos ( $60,11 \pm 5,46 \%$ ) es significativamente mayor con respecto a todos ellos ( $p$ -valor  $< 0,001$ ,  $p$ -valor  $< 0,05$  y  $p$ -valor  $< 0,05$ , respectivamente).



**Figura 13. Porcentaje de nucléolos marcados con TNF- $\alpha$ .** El número de nucléolos con TNF- $\alpha$  aumenta significativamente en presencia de daño hepático, especialmente en el grupo de pacientes cirróticos. Los valores son la media  $\pm$  EEM de 4-7 individuos por cada grupo. Los asteriscos indican diferencia significativa respecto al grupo control (\*\*\*\*  $p$ -valor  $< 0,0001$ ), “a” respecto al grupo SH1 (aaa,  $p$ -valor  $< 0,001$ ), “b” respecto al grupo SH2 (b,  $p$ -valor  $< 0,05$ ) y “c” respecto al grupo SH3 (c,  $p$ -valor  $< 0,05$ ). SH1, esteatohepatitis de grado 1; SH2, esteatohepatitis de grado 2; SH3, esteatohepatitis de grado 3.

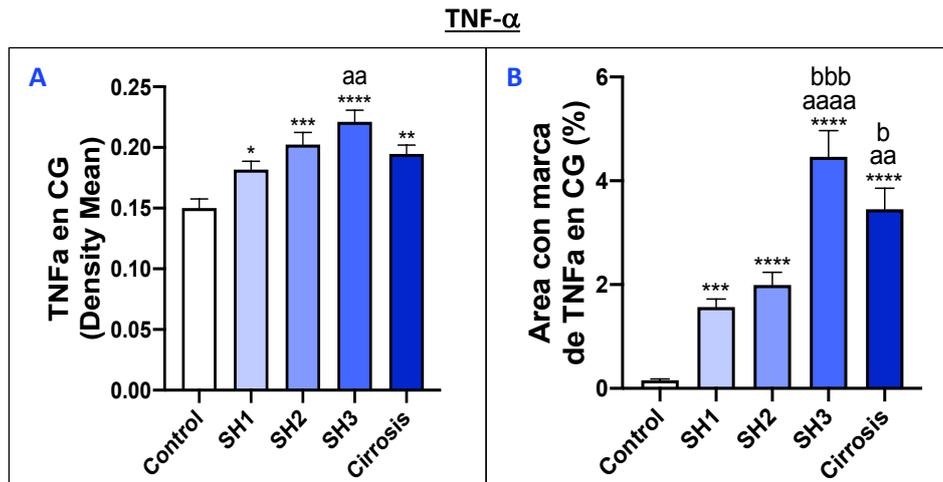
Esta tendencia parece contraria a las anteriores, donde se aprecia una disminución en el grupo de cirrosis. Sin embargo, ha de tenerse en cuenta que el parámetro analizado no es intensidad de la marca en la región nucleolar, sino número de nucléolos positivos para TNF- $\alpha$ , es decir, los pacientes cirróticos presentan mayor número de nucléolos marcados pero el contenido promedio de la citoquina en los núcleos desciende.

El análisis de la capa granular también mostró un claro aumento en el contenido de la citoquina proinflamatoria en comparación con los sujetos sin enfermedad hepática, que puede apreciarse en las imágenes de inmunohistoquímica de la Figura 14. A diferencia de lo que se observa en las neuronas de Purkinje, los niveles de TNF- $\alpha$  alcanzan su pico más tarde, en el estadio más avanzado de esteatohepatitis (SH3).



**Figura 14. Contenido de TNF- $\alpha$  en capa granular de cerebelo.** Imágenes representativas (56x) de la tinción con hematoxilina y el marcaje con el anticuerpo anti-TNF- $\alpha$ . Los pacientes con esteatohepatitis y cirrosis muestran un aumento del contenido de TNF- $\alpha$ , que se acentúa cuanto mayor es la gravedad del daño hepático. SH1, esteatohepatitis de grado 1; SH2, esteatohepatitis de grado 2; SH3, esteatohepatitis de grado 3.

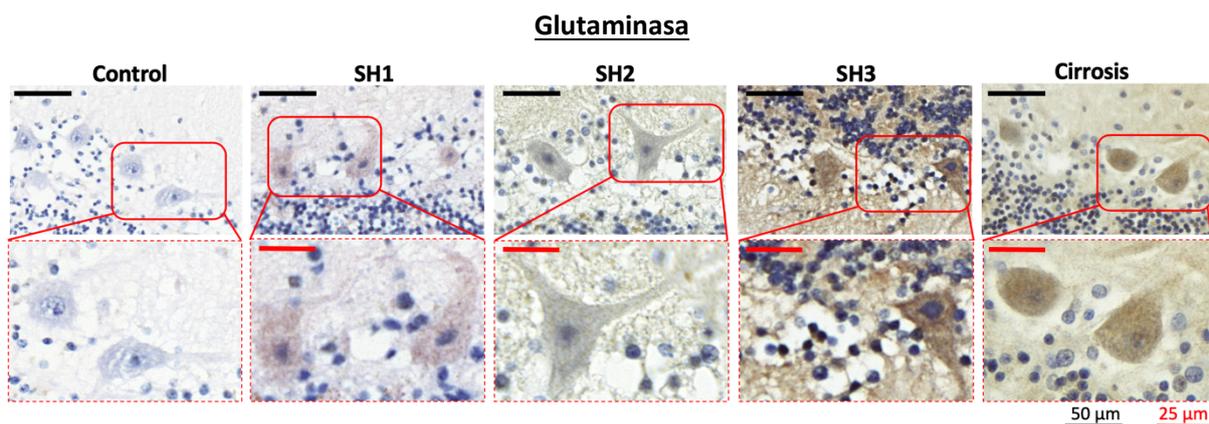
La cuantificación muestra un incremento en la intensidad promedio de la marca (Figura 15A) que comienza a ser significativo con respecto al grupo control ( $0,15 \pm 0,01$  MD) ya en los pacientes con SH1 ( $0,18 \pm 0,01$  MD; p-valor < 0,05). La diferencia se acentúa para los grupos SH2 ( $0,20 \pm 0,01$  MD; p-valor < 0,001) y SH3 ( $0,22 \pm 0,01$  MD; p-valor < 0,0001), mientras que desciende ligeramente en el grupo de pacientes cirróticos ( $0,19 \pm 0,01$  MD; p-valor < 0,01). En el estadio más avanzado de esteatohepatitis la intensidad también difiere significativamente del más leve (p-valor < 0,01). El porcentaje de área con TNF- $\alpha$  (Figura 15B), muy reducido en ausencia de daño de daño hepático ( $0,16 \pm 0,02$  MD), sufre un crecimiento brusco en SH1 ( $1,57 \pm 0,15$  MD; p-valor < 0,001) que continúa en SH2 ( $1,99 \pm 0,24$  MD; p-valor < 0,0001) y alcanza su máximo en SH3 ( $4,46 \pm 0,50$  MD; p-valor < 0,001). El área marcada sufre se reduce de nuevo en el grupo de cirrosis, si bien se mantiene elevado con respecto al control ( $3,45 \pm 0,41$  MD; p-valor < 0,001). En los dos grados de enfermedad hepática más graves (SH3 y cirrosis) las diferencias en el porcentaje son también significativas si se comparan con el grupo de SH1 (p-valor < 0,0001 y p-valor < 0,01, respectivamente) y SH2 (p-valor < 0,001 y p-valor < 0,05, respectivamente).



**Figura 15.** Estudio del contenido de TNF- $\alpha$  en capa granular. Resultados del análisis de las imágenes de inmunohistoquímica en sujetos control y pacientes con distintos grados de enfermedad hepática, expresado en intensidad de marca de TNF- $\alpha$  (A) y porcentaje de área marcada (B). El daño hepático induce un aumento en los niveles de TNF- $\alpha$  en la capa granular. Dicho aumento progresa en los tres grados de esteatohepatitis y revierte parcialmente en los pacientes cirróticos. Los valores son la media  $\pm$  EEM de 4-7 individuos por cada grupo. Los asteriscos indican diferencia significativa respecto al grupo control (\*, p-valor < 0,05; \*\*, p-valor < 0,01; \*\*\*, p-valor < 0,001; \*\*\*\* p-valor < 0,0001), "a" respecto al grupo SH1 (aa, p-valor < 0,01; aaaa, p-valor < 0,0001), y "b" respecto al grupo SH2 (b, p-valor < 0,05; bbb, p-valor < 0,001). CG, capa granular; SH1, esteatohepatitis de grado 1; SH2, esteatohepatitis de grado 2; SH3, esteatohepatitis de grado 3.

### 5.2.1.1 El contenido de glutaminasa aumenta en estadios más avanzados de la enfermedad hepática

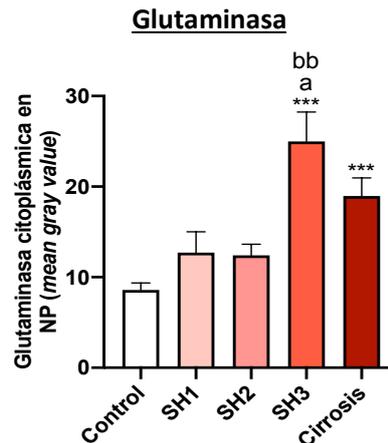
En la capa de Purkinje, el aumento de la glutaminasa parece ocurrir más tarde y de forma menos acusada que el observado para TNF- $\alpha$  (Figura 16).



**Figura 16.** Contenido de glutaminasa en capa de Purkinje de cerebelo. Imágenes representativas (40x) de neuronas de Purkinje teñidas con hematoxilina y marcadas con el anticuerpo anti-glutaminasa (fila superior) y ampliación (80x) (fila inferior). En presencia de daño hepático aumentan progresivamente los niveles de glutaminasa en el citoplasma. SH1, esteatohepatitis de grado 1; SH2, esteatohepatitis de grado 2; SH3, esteatohepatitis de grado 3.

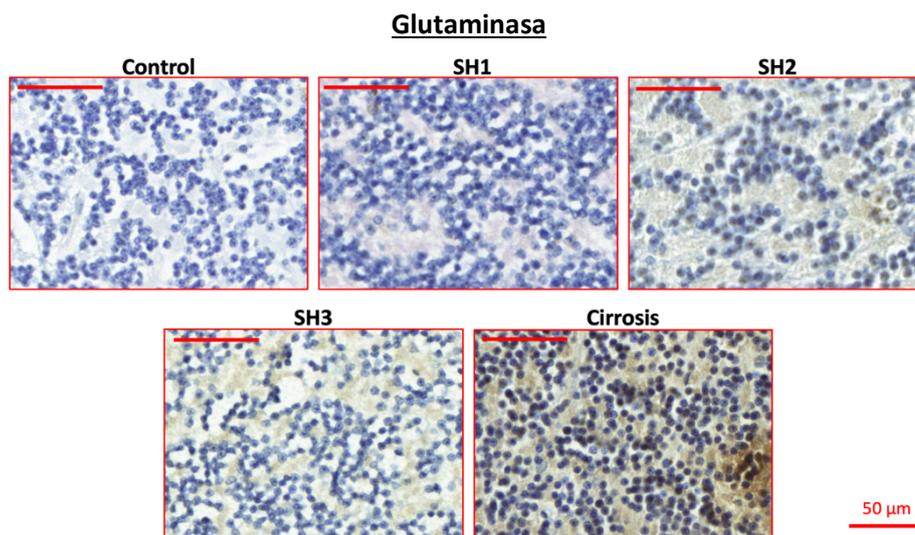
En este caso no se observó marca en los núcleos celulares, por lo que únicamente se representa el contenido citoplásmico (expresado como media de intensidad) de la enzima para los distintos grados

de enfermedad hepática (Figura 17). En los pacientes con esteatohepatitis leve y moderada se aprecia una tendencia positiva, pero el aumento de la intensidad promedio (SH1:  $12,71 \pm 2,32$  MGv; SH2:  $12,42 \pm 1,23$  MGv) no llegó a ser significativo con respecto al grupo control ( $8,59 \pm 0,77$  MGv). Sí se observó dicho incremento para los sujetos con SH3 ( $24,98 \pm 3,25$  MGv; p-valor < 0,001) y cirrosis ( $18,97 \pm 1,99$  MGv; p-valor < 0,001). En el grupo de SH3 la diferencia de intensidad promedio también es significativa con respecto a los pacientes con SH1 (p-valor < 0,01) y SH2 (p-valor < 0,05), y de nuevo se aprecia una disminución en la fase más severa del daño hepático.



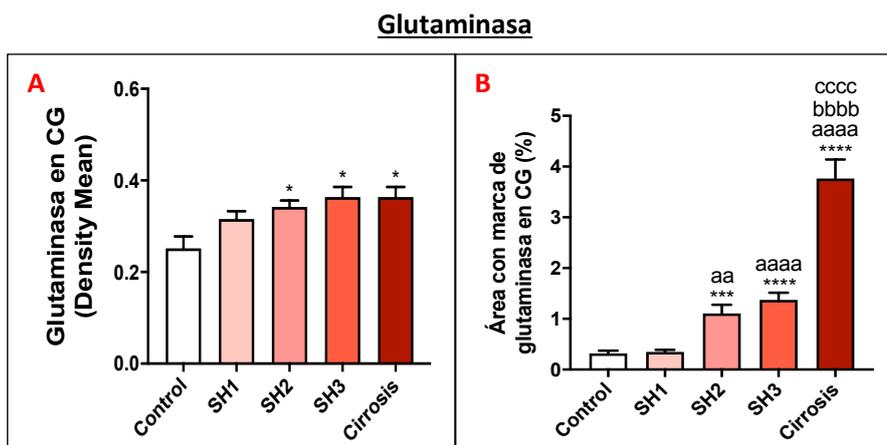
**Figura 17. Intensidad promedio de glutaminasa en neuronas de Purkinje.** Resultados del análisis de las imágenes de inmunohistoquímica en el grupo control y en los distintos grados de enfermedad hepática. El daño hepático promueve un aumento del contenido de glutaminasa en la región citoplasmática neuronal, que se traduce en intensidades promedio mayores para los dos estadios más severos. Los valores son la media  $\pm$  EEM de 3-5 individuos por cada grupo. Los asteriscos indican diferencia significativa respecto al grupo control (\*\*\*, p-valor < 0,001; \*\*\*\* p-valor < 0,0001), "a" respecto al grupo SH1 (a, p-valor < 0,05) y "b" respecto al grupo SH2 (bb, p-valor < 0,01). NP, neurona de Purkinje; SH1, esteatohepatitis de grado 1; SH2, esteatohepatitis de grado 2; SH3, esteatohepatitis de grado 3.

Tras el análisis de la capa granular se observa un fenómeno similar, la marca coloreada indicadora de la presencia glutaminasa va aumentando ante un daño hepático mayor, pero lo hace de forma más tardía que el TNF- $\alpha$  (Figura 18).



**Figura 18. Contenido de glutaminasa en capa granular de cerebelo.** Imágenes representativas (56x) de la tinción con hematoxilina y el marcaje con el anticuerpo anti-glutaminasa. Los pacientes con esteatohepatitis y cirrosis muestran un aumento del contenido de TNF- $\alpha$ , que se acentúa cuanto mayor es la gravedad del daño hepático. SH1, esteatohepatitis de grado 1; SH2, esteatohepatitis de grado 2; SH3, esteatohepatitis de grado 3.

La intensidad de la marca de glutaminasa (Figura 19A) comenzó a aumentar significativamente en el grupo de pacientes con SH2 ( $0,34 \pm 0,01$  MD; p-valor < 0,05) con respecto al grupo control ( $0,25 \pm 0,03$ ) y alcanzó el valor máximo en SH3 ( $0,36 \pm 0,02$  MD; p-valor < 0,05) y cirrosis ( $0,36 \pm 0,02$  MD; p-valor < 0,05). No se observó incremento en el grupo de esteatohepatitis leve ( $0,31 \pm 0,02$  MD). El porcentaje de área con glutaminasa (Figura 19B) sufrió un incremento desde  $0,32 \pm 0,05$  % en los sujetos sin daño hepático hasta  $1,11 \pm 0,17$  % (p-valor < 0,001) en SH2, que continuó acentuándose en SH3 con un  $1,37 \pm 0,37$  % (p-valor < 0,0001). Ambos grados de esteatohepatitis difieren además con

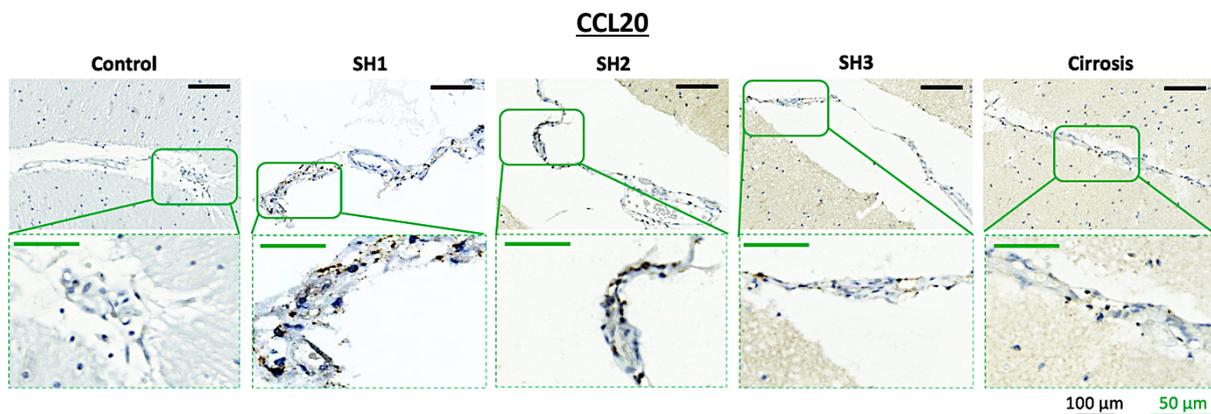


**Figura 19. Estudio del contenido de glutaminasa en capa granular.** Resultados del análisis de las imágenes de inmunohistoquímica en sujetos control y pacientes con distintos grados de enfermedad hepática, expresado en intensidad de la marca de glutaminasa (A) y porcentaje de área marcada (B). Los niveles de glutaminasa en la capa granular de pacientes con SH2, SH3 y cirrosis. Los valores son la media  $\pm$  EEM de 3-8 individuos por cada grupo. Los asteriscos indican diferencia significativa respecto al grupo control (\*, p-valor < 0,05; \*\*\*, p-valor < 0,001; \*\*\*\* p-valor < 0,0001), "a" respecto al grupo SH1 (aa, p-valor < 0,01; aaaa, p-valor < 0,0001), "b" respecto al grupo SH2 (bbbb, p-valor < 0,0001) y "c" respecto al grupo SH3 (cccc, p-valor < 0,0001). CG, capa granular; SH1, esteatohepatitis de grado 1; SH2, esteatohepatitis de grado 2; SH3, esteatohepatitis de grado 3.

respecto al estadio SH1 ( $0,35 \pm 0,04 \%$ ; p-valor  $< 0,01$  y p-valor  $< 0,0001$  respectivamente). En este caso se aprecia un máximo evidente en el grupo de cirrosis, con una diferencia significativa con respecto al resto de grupos (p-valor  $< 0,0001$ ).

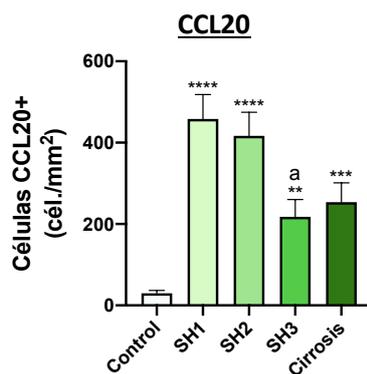
### 5.2.2 La expresión de CCL20 aumenta drásticamente en esteatohepatitis leve y moderada

Con el fin de proponer algún mecanismo mediante el cual el fallo hepático induzca la infiltración linfocitaria y promover la neuroinflamación, se llevó a cabo el análisis de la presencia de la quimioquina CCL20 en las meninges cerebelosas. Las imágenes obtenidas tras la inmunohistoquímica mostraron un aumento del número de células con expresión y secreción de CCL20 (CCL20<sup>+</sup>) en todas las fases de daño hepático incluidas en el estudio (Figura 20).



**Figura 20. Presencia de CCL20 en meninges de cerebelo.** Imágenes representativas (20x) de las meninges teñidas con hematoxilina y marcadas con el anticuerpo anti-CCL20 (fila superior) y ampliación (40x) (fila inferior). Se aprecia un incremento de CCL20 intracelular y extracelular ya en pacientes con SH1. SH1, esteatohepatitis de grado 1; SH2, esteatohepatitis de grado 2; SH3, esteatohepatitis de grado 3.

En el análisis estadístico (Figura 21) se observa que el incremento más acusado del número de células CCL20<sup>+</sup> con respecto al grupo control ( $30 \pm 7$  cél./mm<sup>2</sup>) corresponde a los estadios de esteatohepatitis leve ( $458 \pm 60$  cél./mm<sup>2</sup>; p-valor  $< 0,0001$ ) y moderada ( $417 \pm 58$  cél./mm<sup>2</sup>; p-valor  $< 0,0001$ ), en lo cuales además puede apreciarse un aumento de la presencia de CCL20 en el medio extracelular. En los pacientes con SH3 ( $218 \pm 43$  cél./mm<sup>2</sup>) y cirrosis ( $253 \pm 47$  cél./mm<sup>2</sup>) el número de células por unidad de área se reduce considerablemente, si bien mantienen una diferencia significativa al compararse con los sujetos sin daño hepático (p-valor  $< 0,01$  y p-valor  $< 0,001$  respectivamente).



**Figura 21. Células con marca de CCL20 en meninges.** El número de células positivas aumenta significativamente desde el primer estadio de esteatohepatitis y se reduce en los pacientes con SH3 y cirrosis. Los valores son la media  $\pm$  EEM de 3 individuos por cada grupo. Los asteriscos indican diferencia significativa respecto al grupo control (\*\*, p-valor < 0,01; \*\*\*, p-valor < 0,001; \*\*\*\* p-valor < 0,0001), y "a" respecto al grupo SH1 (a, p-valor < 0,05). SH1, esteatohepatitis de grado 1; SH2, esteatohepatitis de grado 2; SH3, esteatohepatitis de grado 3.

## 6 DISCUSIÓN

La batería de test psicométricos PHES se ha establecido desde hace décadas como ‘*gold estándar*’ para detectar el deterioro neurológico leve que sufren los pacientes con cirrosis, resultando especialmente útil en la unificación de los métodos de diagnóstico entre hospitales. Sin embargo, distintos estudios en los últimos años sugieren que estas pruebas no son suficientemente sensibles para detectar las alteraciones neurológicas más tempranas, lo que conduce al infradiagnóstico de una proporción relevante de los pacientes (Felipo *et al.*, 2014; Giménez-Garzó *et al.*, 2017).

En el presente trabajo ha podido corroborarse dicha falta de precisión. Los pacientes cirróticos excluidos del grupo con deterioro neurológico mostraron un peor rendimiento en ambos test psicomotores. Esto concuerda además con los resultados obtenidos en otro estudio, que muestran deterioro de la coordinación en presencia de cirrosis hepática acompañada o no de EHM, manifestado sobre todo en forma de ataxia, temblores y enlentecimiento (Butz *et al.*, 2010). Las alteraciones de la función motora parecen ser una de las primeras en aparecer. Por otro lado se ha observado el aumento del flujo sanguíneo en el cerebelo de pacientes cirróticos, lo que sugiere una mayor sensibilidad ante el daño hepático con respecto a otras regiones encefálicas (Felipo *et al.*, 2014). Esto concuerda con los resultados obtenidos en la prueba de coordinación visomotora y bimanual, ya que como se ha comentado anteriormente, el cerebelo tiene un papel fundamental en el correcto funcionamiento del aparato locomotor.

Los resultados del estudio en pacientes muestran además un aumento significativo de los niveles de amonio en sangre periférica de los sujetos cirróticos sin y con EHM. La hiperamonemia es una de las principales y primeras consecuencias de la insuficiencia hepática. Cuando el número de hepatocitos dañados aumenta, la eficiencia de estos para llevar a cabo el ciclo de la urea disminuye, lo que propicia la acumulación sistémica de amonio (Shawcross *et al.*, 2007; Aldridge *et al.*, 2015). La estrecha relación entre la hiperamonemia y la aparición del deterioro cognitivo y motor ha sido ampliamente demostrada en la literatura, tanto en modelos animales (Hernández-Rabaza *et al.*, 2016b; Cabrera-Pastor *et al.*, 2018) como en pacientes (Felipo *et al.*, 2012a).

El análisis de la neuroinflamación en cerebelo muestra una serie de resultados interesantes. Se ha observado un incremento de la citoquina proinflamatoria TNF- $\alpha$  en la corteza ya en los pacientes con esteatohepatitis leve. Este fenómeno podría tener una causalidad múltiple. Se ha descrito en distintos trabajos cómo la esteatosis y la esteatohepatitis tanto de origen alcohólico como no alcohólico se caracterizan por una expresión y secreción exacerbadas de distintas citoquinas proinflamatorias, entre las que se incluye el TNF- $\alpha$ . Prácticamente todos los tipos celulares que forman parte del hígado, como hepatocitos, macrófagos, células endoteliales o adipocitos, generan esta

citoquina en presencia de estrés oxidativo, que a su vez promueve más oxidación, apoptosis, así como la expresión de IL-8 y otras quimioquinas que atraen diversas células inflamatorias hacia el hígado (Lakshman *et al.*, 2015). Se han observado además niveles aumentados de TNF- $\alpha$  en sangre periférica de pacientes cirróticos con y sin deterioro neurológico (Mangas-Losada *et al.*, 2017). Por otra parte, estudios realizados *in vitro* e *in vivo* han demostrado que la exposición a citoquinas proinflamatorias como TNF- $\alpha$  así como el amonio promueven un aumento en la permeabilidad de la barrera hematoencefálica (BHE). Estos hallazgos sugieren que un estado de inflamación sistémica e hiperamonemia, característicos de la insuficiencia hepática, resultaría en alteraciones de dicha barrera, facilitando el paso hacia el SNC de pequeñas moléculas como agua y el propio amonio (Butterworth, 2013; Fan y Liu, 2018). Se ha observado en modelos animales que el TNF- $\alpha$  también es capaz de cruzar la barrera, y actúa sobre la microglía induciendo neuroinflamación, lo que a su vez provoca la liberación de más TNF- $\alpha$  (Erickson y Banks, 2018).

El aumento observado de TNF- $\alpha$  en corteza cerebelosa en los cuatro estadios de enfermedad hepática que se han estudiado en este trabajo podría ser por tanto de origen sistémico y haber atravesado la BHE, alcanzando dicha región. Esta citoquina media su actividad biológica gracias a la interacción con sus receptores TNFR1 y TNFR2 (del inglés *tumor necrosis factor receptor 2*). Mientras que TNFR2 es normalmente inducible y se expresa preferentemente en células endoteliales y hematopoyéticas, TNFR1 se sintetiza constitutivamente en prácticamente todos los tipos celulares nucleados (Mitoma *et al.*, 2018). Se ha observado en modelos animales y pacientes que la hiperamonemia promueve la activación de microglía y astrocitos, e incrementa el contenido de TNF- $\alpha$  y el número de receptores TNFR1 en la membrana. Esto desencadena la activación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B e inicia una de las vías prototípicas de señalización proinflamatoria. (Rodrigo *et al.*, 2010; Zemtsova *et al.*, 2011; Hernández-Rabaza *et al.*, 2016b; Balzano *et al.*, 2018a). Mediante esta vía el TNF- $\alpha$  autoinduce su propia expresión y liberación, por lo que se incrementan aún más los niveles extracelulares de la molécula.

En un modelo de rata se ha descrito además la capacidad de la microglía para interactuar con las neuronas de Purkinje por medio de distintas citoquinas proinflamatorias, que incluyen el TNF- $\alpha$  y la IL-1 $\beta$ . La expresión exacerbada de ambas moléculas va seguida de un incremento de sus receptores (TNFR1 e IL1R1) en las neuronas de Purkinje a nivel de membrana (Kaur *et al.*, 2014).

La detección de TNF- $\alpha$  en núcleo y nucleolo es quizá uno de los resultados más interesantes de este trabajo. La vía de activación de NF- $\kappa$ B y su implicación en los procesos inflamatorios han sido ampliamente descritos en la literatura (Lawrence, 2009), pero en todos estos casos la citoquina proinflamatoria actúa desde el exterior por medio del TNFR1. El análisis de las imágenes de

inmunohistoquímica muestra un fenómeno de translocación creciente al núcleo que, al no observarse en el grupo de individuos control, parece ir ligado a la presencia de daño hepático.

El TNF- $\alpha$  se sintetiza en forma de una molécula precursora llamada TNF transmembrana o TNF<sub>tm</sub>, un polipéptido de 233 aminoácidos que se localiza en la superficie celular y está presente en macrófagos activados, linfocitos así como otros tipos celulares. Dicho precursor sufre una escisión por parte de metaloproteinasas entre las que se encuentra la enzima convertidora de TNF- $\alpha$  (TACE, del inglés *tumor necrosis factor-alpha converting enzyme*), dando lugar a la forma madura de la citoquina, de 157 aminoácidos, también denominada TNF soluble (TNFs). El TNF<sub>tm</sub> es, al igual que la forma soluble, capaz de unirse a TNFR1 y TNFR2, pero su actividad biológica parece estar mediada fundamentalmente por su interacción con el segundo. Se sabe además que puede actuar no solo como ligando sino también como receptor, transmitiendo señales desde el exterior hacia el citoplasma a través del contacto célula-célula. Distintos estudios proponen que, tras la liberación del TNF- $\alpha$  soluble por acción de la enzima TACE, el dominio citoplásmico residual del TNF<sub>tm</sub> puede sufrir una segunda escisión por parte de homólogos de la peptidasa señal (SPPL) y migrar hacia el núcleo celular, induciendo la expresión de las citoquinas proinflamatorias IL-1 $\beta$  e IL-12 (Horiuchi *et al.*, 2010; Szondy y Pallai, 2017; Mitoma *et al.*, 2018). A partir de estas evidencias se podría sugerir que lo que en realidad se detectó mediante inmunohistoquímica en el núcleo de las neuronas de Purkinje no era la molécula de TNF- $\alpha$  como tal, sino el dominio intracelular originado tras la escisión del TNF<sub>tm</sub> reconocido por el anticuerpo primario anti-TNF- $\alpha$  empleado. Para confirmar esto sería interesante realizar un estudio sobre la especificidad del anticuerpo por dicho dominio, así como un nuevo análisis del contenido de IL-1 $\beta$  e IL-12 en pacientes con enfermedad hepática que permitiese ver si se producen cambios en la expresión de ambas citoquinas.

Los niveles de TNF- $\alpha$  en la capa granular también aumentan de forma acusada en los cuatro estadios de enfermedad hepática estudiados. La citoquina de origen sistémico, junto la liberada por parte de la microglía y las neuronas de Purkinje activadas, podría estar difundiendo hacia esa capa. Por otra parte, se ha descrito la capacidad de las neuronas de las células granulares para producir TNFR1 y TNFR2 (Becker *et al.*, 2015), lo que sugiere que estas células tendrían también la capacidad de liberar TNF- $\alpha$  por sí mismas de un modo similar al comentado para las neuronas de Purkinje, promoviendo una mayor acumulación en esa zona de la corteza. Otro estudio realizado en un modelo de rata con derivación portosistémica muestra un aumento del contenido de TNF- $\alpha$  en neuronas del hipocampo. Con el fin de dilucidar si este fenómeno se debía a la síntesis de la citoquina en las propias neuronas, se utilizó hibridación *in situ* fluorescente (FISH, del inglés *fluorescent in situ hybridization*) para visualizar ARNm de TNF- $\alpha$ . Se observaron en los animales con derivación portocava niveles de expresión del ARNm elevados, prácticamente inexistentes en las ratas control (Dadsetan *et al.*, 2016b).

En base a estos resultados, podría proponerse la capacidad de las neuronas granulares para expresar la citoquina, igual que las neuronas del hipocampo. Para comprobarlo podría realizarse la técnica FISH en muestras de pacientes con distintos grados de enfermedad hepática y analizar la presencia de ARNm de TNF- $\alpha$ . Para explicar la presencia de la citoquina en la capa granular también se propone que las células gliales son las responsables de liberarla, uniéndose posteriormente a las neuronas.

Se ha demostrado ampliamente en la literatura la expresión de glutaminasa en el SNC por parte de microglía y astrocitos. Esta enzima cataliza la disociación de glutamina en amonio y glutamato, manteniendo niveles adecuados de este último, que actúa como neurotransmisor (Mullen y Prakash, 2010; Holecek, 2014). En presencia de daño hepático, los niveles de amonio en sangre periférica aumentan, y pueden alcanzar el SNC atravesando la BHE, como ya se comentó. La hiperamonemia promueve la síntesis de TNF- $\alpha$  y TNFR1 en microglía y astrocitos, lo que activa al factor de transcripción NF- $\kappa$ B e induce su translocación al núcleo. Una vez allí, dicho factor es capaz de inducir la expresión de distintos genes, entre los que incluye el gen que codifica para la glutaminasa (Cabrera-Pastor *et al.*, 2018). En este trabajo se ha observado, al igual que para el TNF- $\alpha$ , un aumento en los niveles de glutaminasa en la capa granular y de Purkinje de cerebelo de pacientes con enfermedad hepática. Sin embargo, dicho aumento comienza a detectarse en estadios más avanzados con respecto a la citoquina proinflamatoria. Para explicar este resultado, podemos basarnos en el papel que juega la enzima en la ruta mediada por NF- $\kappa$ B.

Se ha observado la presencia de microglía activada en la capa molecular del cerebelo de pacientes con NASH, próxima a las neuronas de Purkinje (Balzano *et al.*, 2018a). Como se ha comentado anteriormente, las células microgliales son capaces de interactuar con dichas neuronas e inducir en ellas la expresión del TNFR1, lo cual podría desencadenar la vía de activación del NF- $\kappa$ B, y justificaría el aumento de los niveles citoplásmicos de glutaminasa en las células de Purkinje. Por otro lado, se ha descrito en un modelo de rata con derivación portocava y deterioro neurológico la presencia de astrocitos activados en la capa granular del cerebelo (Dadsetan *et al.*, 2016a). Como ya se mencionó anteriormente, el TNFR1 puede expresarse en prácticamente todos los tipos celulares nucleados, luego el aumento de la glutaminasa en la capa granular podría tener una explicación similar a la propuesta para la capa de Purkinje. Esto implicaría la capacidad tanto de neuronas de Purkinje y granulares para expresar glutaminasa, por lo que sería interesante llevar a cabo estudios posteriores que traten de demostrar dicha capacidad. Según esta propuesta, la síntesis aumentada de glutaminasa sería además una consecuencia indirecta del aumento de los niveles del TNF- $\alpha$ , lo cual explicaría por qué se produce de manera más tardía. Cabe destacar además que un aumento anómalo de la glutaminasa se relaciona directamente con el desarrollo de incoordinación motora (Cabrera-Pastor *et al.*, 2018). En este trabajo se han detectado alteraciones motoras en los pacientes cirróticos

clasificados como sin EHM, lo que podría relacionarse con el aumento significativo de glutaminasa en cerebelo. En muestras de cerebelo de pacientes con esteatohepatitis (una fase previa a la cirrosis) ya se detecta aumento significativo de glutaminasa, por lo que sería interesante ampliar el estudio y evaluar la función motora en pacientes con distintos grados de esteatohepatitis, para tratar de dilucidar el estadio de daño hepático en el que comienzan a aparecer dichas alteraciones.

Del análisis de CCL20 también se han extraído resultados interesantes en el presente trabajo. Uno de los mecanismos más estudiados de comunicación entre inflamación periférica y encéfalo es la infiltración directa de células sanguíneas en cerebro. Existen varias vías para la entrada de leucocitos en el SNC (Ransohoff *et al.*, 2003). Las meninges representan uno de los portales de ingreso y acumulación de leucocitos en el SNC inflamado. Estudios recientes muestran que se pueden formar agregados de tipo linfocitario dentro de las meninges durante la neuroinflamación sostenida. Esto se observa en encefalitis autoinmune experimental crónica y esclerosis múltiple crónica y esclerosis múltiple progresiva (Corcione *et al.*, 2004; Magliozzi *et al.*, 2004). Distintas poblaciones de leucocitos migran diferencialmente al cerebro en sitios selectivos, dependiendo de la expresión relativa de moléculas de adhesión durante las condiciones neuroinflamatorias (Ransohoff y Engelhardt, 2012).

La expresión del CCL20 se observa en este trabajo significativamente aumentada en los cuatro estadios de enfermedad hepática, si bien el incremento más acusado se observa en los pacientes con esteatohepatitis leve y moderada. Se ha observado que el CCL20 es un quimioatrayente selectivo de PBMCs, especialmente de linfocitos B y T de memoria, gracias a la interacción con CCR6, su receptor de membrana. Se ha observado además que la expresión de CCL20 puede ser fuertemente inducida por moléculas que actúen como un estímulo inflamatorio, como el lipopolisacárido bacteriano o el TNF- $\alpha$ , fenómeno descrito en las propias PBMCs pero también en células endoteliales (Liao *et al.*, 1999; Krzysiek *et al.*, 2000). Los pacientes cirróticos sin EHM ya muestran niveles mayores de CCL20 en sangre periférica con respecto a individuos sin enfermedad hepática. Dicho aumento se acentúa en los sujetos con cirrosis y EHM, que además muestran un mayor número de linfocitos T CD4<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup>, Th22, Th17 y linfocitos B (Mangas-Losada *et al.*, 2017). Por otro lado, un estudio reciente realizado en pacientes con distintos grados de enfermedad hepática demuestra un aumento de la infiltración de linfocitos T, especialmente los subtipos Th17, Th1 y en menor medida CD4<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup>, en el cerebelo a nivel de meninges ya en la fase de esteatohepatitis leve o SH1, y asociado además con activación de microglía, astrocitos y pérdida neuronal en las capas granular y de Purkinje. Dicha infiltración continúa aumentando en SH2, y comienza a reducirse en SH3 y cirrosis (Balzano *et al.*, 2018b). En base a estos datos, el aumento de CCL20 en meninges observado en este trabajo, con una tendencia similar a la que presenta la infiltración de linfocitos en el estudio de Balzano *et al.* (2018) podría explicar la infiltración linfocitaria en el tejido nervioso y por consiguiente el aumento de la neuroinflamación. La

quimioquina podría proceder en parte de la circulación sistémica, donde los niveles aumentados de TNF- $\alpha$  inducirían su expresión en PBMCs y células endoteliales, y viajar desde allí hasta el SNC atravesando la BHE. Por otro lado se propone un origen meníngeo, favorecido por el ambiente proinflamatorio observado en la corteza del cerebelo. Las meninges están altamente vascularizadas, de modo que el CCL20 podría ser sintetizado y liberado por las células endoteliales de dichos vasos y promover allí la infiltración. El aumento en la activación de las células gliales, de la infiltración y del CCL20 sugieren que la neuroinflamación en cerebelo se produce en las primeras etapas de la enfermedad hepática, antes de llegar a cirrosis.

Por último, cabe destacar un fenómeno que se ha observado en las tres moléculas analizadas en este trabajo. En todas ellas, los niveles parecen presentar una tendencia a disminuir o estabilizarse en las muestras de pacientes cirróticos. Se ha demostrado una pérdida significativa de neuronas de Purkinje y granulares en cerebelo de pacientes con esteatohepatitis leve (Balzano *et al.*, 2018b). A medida que el daño hepático progresa, aumenta la degeneración del tejido cerebeloso. Se ha explicado la capacidad de distintos tipos neuronales para inducir la expresión del TNF- $\alpha$  y la glutaminasa cuando son activados, luego una disminución de su funcionalidad explicaría la reducción de los niveles de dichas moléculas. Por otra parte, las células endoteliales de las regiones meníngeas del cerebelo podrían sintetizar cantidades mayores de CCL20 ante estímulos proinflamatorios promovidos por TNF- $\alpha$ , luego la pérdida neuronal podría ser también responsable indirecta de la reducción observada en los niveles de la quimioquina. Esto concuerda además con la infiltración linfocitaria disminuida que se ha observado en pacientes a partir de SH3 (Balzano *et al.*, 2018b).

## 7 CONCLUSIONES

Las conclusiones que pueden extraerse del presente trabajo son

1. La batería PHES no muestra una sensibilidad suficiente para detectar el deterioro en la función motora de los pacientes cirróticos, que aparece de forma más temprana con respecto al resto de alteraciones neurológicas.
2. La detección del deterioro motor ha podido afinarse utilizando test psicomotores complementarios de coordinación bimanual y visomotora. Los pacientes sin EHM ya muestran alteraciones en ambas pruebas, mejorando el diagnóstico.
3. Los pacientes con enfermedades hepáticas muestran neuroinflamación en cerebelo ya en las etapas tempranas: un aumento del contenido de TNF- $\alpha$  se ha observado en neuronas de Purkinje y granulares en pacientes con SH1 y se ha mantenido durante todos los estadios de la esteatohepatitis y en cirrosis. Los pacientes con esteatohepatitis también mostraron un aumento del contenido de glutaminasa en las dos capas analizadas. Este aumento empezó en SH2 y se mantuvo hasta la cirrosis.
4. La neuroinflamación presente en pacientes con esteatohepatitis podría explicar el deterioro cognitivo leve observado en estudios previos en pacientes con esteatohepatitis no alcohólica.
5. Los niveles de CCL20 se muestran aumentados en la región meníngea cerebelosa de pacientes con esteatohepatitis y cirrosis, proponiéndose como mecanismo responsable de la infiltración linfocitaria e indirectamente de la neuroinflamación.
6. El conjunto de resultados mostrados en este trabajo, sugieren que se deberían realizar los test psicométricos para diagnosticar la EHM ya en pacientes con esteatohepatitis. El diagnóstico temprano de la EHM permitiría tratar los pacientes y mejorar, prevenir o retrasar el deterioro neurológico.

## 8 REFERENCIAS

- Adeva, M. M., Souto, G., Blanco, N. y Donapetry, C. (2012) "Ammonium metabolism in humans", *Metabolism*, 61(11), pp. 1495–1511.
- Aldridge, D. R., Tranah, E. J. y Shawcross, D. L. (2015) "Pathogenesis of hepatic encephalopathy: role of ammonia and systemic inflammation", *Journal of clinical and experimental hepatology*, 5(1), pp. 7–20.
- Amodio, P., Montagnese, S., Gatta, A. y Morgan, M. Y. (2004) "Characteristics of minimal hepatic encephalopathy", *Metabolic brain disease*, 19(3–4), pp. 253–267.
- Asrani, S. K., Devarbhavi, H., Eaton, J. y Kamath, P. S. (2019) "Burden of liver diseases in the world", *Journal of hepatology*, 70(1), pp. 151–171.
- Bajaj, J. S. (2014) "The role of microbiota in hepatic encephalopathy", *Gut microbes*, 5(3), pp. 397–403.
- Bajaj, J. S., Cordoba, J., Mullen, K. D., Amodio, P., Shawcross, D. L., Butterworth, R. F. y Morgan, M. Y. (2011) "Review article: the design of clinical trials in hepatic encephalopathy - An International Society for Hepatic Encephalopathy and Nitrogen Metabolism (ISHEN) consensus statement", *Alimentary pharmacology & therapeutics*, 33(7), pp. 739–747.
- Balzano, T., Forteza, J., Borreda, I., Molina, P., Giner, J., Leone, P., Urios, A., Montoliu, C. y Felipo, V. (2018a) "Histological features of cerebellar neuropathology in patients with alcoholic and nonalcoholic steatohepatitis", *Journal of neuropathology and experimental neurology*, 77(9), pp. 837–845.
- Balzano, T., Forteza, J., Molina, P., Giner, J., Monzó, A., Sancho-Jiménez, J., Urios, A., Montoliu, C. y Felipo, V. (2018b) "The cerebellum of patients with steatohepatitis shows lymphocyte infiltration, microglial activation and loss of purkinje and granular neurons", *Scientific reports*, 8(1), pp. 1–12.
- Bataller, R. y Brenner, D. A. (2005) "Liver fibrosis", *Journal of clinical investigation*, 115(2), pp. 209–218.
- Becker, D., Deller, T. y Vlachos, A. (2015) "Tumor necrosis factor (TNF)-receptor 1 and 2 mediate homeostatic synaptic plasticity of denervated mouse dentate granule cells", *Scientific reports*, 5, pp. 1–10.
- Ben-moshe, S. y Itzkovitz, S. (2019) "Spatial heterogeneity in the mammalian liver", *Nature reviews gastroenterology & hepatology*, 16(7), pp. 395–410.
- Bhatia, S. N., Underhill, G. H., Zaret, K. S. y Fox, I. J. (2014) "Cell and tissue engineering for liver disease", *Science translational medicine*, 6(245), pp. 1–21.
- Bird, G. L. A., Sheron, N., John Goka, A. K., Alexander, G. J. y Williams, R. S. (1990) "Increased plasma tumor necrosis factor in severe alcoholic hepatitis", *Annals of internal medicine*, 112(12), pp. 917–920.
- Blachier, M., Leleu, H., Peck-Radosavljevic, M., Valla, D. C. y Roudot-Thoraval, F. (2013) "The burden of liver disease in Europe : a review of available epidemiological data", *Journal of hepatology*, 58(3), pp. 593–608.
- Blair, N. F., Cremer, P. D. y Tchan, M. C. (2015) "Urea cycle disorders : a life-threatening yet treatable cause of metabolic encephalopathy in adults", *Practical neurology*, 15(1), pp. 45–48.

- Bocca, C., Novo, E., Miglietta, A. y Parola, M. (2015) "Angiogenesis and fibrogenesis in chronic liver diseases", *Cellular and molecular gastroenterology and hepatology*, 1(5), pp. 477–488.
- Boix, J., Cauli, O. y Felipo, V. (2010) "Developmental exposure to polychlorinated biphenyls 52, 138 or 180 affects differentially learning or motor coordination in adult rats. Mechanisms involved", *Neuroscience*, 167(4), pp. 994–1003.
- Bosoi, C. R. y Rose, C. F. (2013) "Oxidative stress: a systemic factor implicated in the pathogenesis of hepatic encephalopathy", *Metabolic brain disease*, 28(2), pp. 175–178.
- Brunt, E. M., Janney, C. G., Di Bisceglie, A. M., Neuschwander-Tetri, B. A. y Bacon, B. R. (1999) "Nonalcoholic steatohepatitis : a proposal for grading and staging the histological lesions", *American journal of gastroenterology*, 94(9), pp. 2467–2474.
- Bustamante, J., Rimola, A., Ventura, P. J., Navasa, M., Cirera, I., Reggiardo, V. y Rodés, J. (1999) "Prognostic significance of hepatic encephalopathy in patients with cirrhosis", *Journal of hepatology*, 30(5), pp. 890–895.
- Butterworth, R. F. (2013) "The liver–brain axis in liver failure: neuroinflammation and encephalopathy", *Nature reviews gastroenterology & hepatology*, 10(9), pp. 522–528.
- Butz, M., Timmermann, L., Braun, M., Groiss, S. J., Wojtecki, L., Ostrowski, S., Krause, H., Pollok, B., Südmeyer, M., Kircheis, G., Häussinger, D. y Schnitzler, A. (2010) "Motor impairment in liver cirrhosis without and with minimal hepatic encephalopathy", *Acta neurologica scandinavica*, 122(1), pp. 27–35.
- Cabrera-Pastor, A., Balzano, T., Hernández-Rabaza, V., Malaguarnera, M., Llansola, M. y Felipo, V. (2018) "Increasing extracellular cGMP in cerebellum in vivo reduces neuroinflammation, GABAergic tone and motor in-coordination in hyperammonemic rats", *Brain, behavior, and immunity*, 69, pp. 386–398.
- Cauli, O., Rodrigo, R., Piedrafita, B., Boix, J. y Felipo, V. (2007) "Inflammation and hepatic encephalopathy: ibuprofen restores learning ability in rats with portacaval shunts", *Hepatology*, 46(2), pp. 514–519.
- Chalasanani, N., Gorski, J. C., Asghar, M. S., Asghar, A., Foresman, B., Hall, S. D. y Crabb, D. W. (2003) "Hepatic cytochrome P450 2E1 activity in nondiabetic patients with nonalcoholic steatohepatitis", *Hepatology*, 37(3), pp. 544–550.
- Conn, H. O., Leevy, C. M., Vlahcevic, Z. R., Rodgers, J. B., Maddrey, W. C., Seeff, L. y Levy, L. L. (1977) "Comparison of lactulose and neomycin in the treatment of chronic portal-systemic encephalopathy. A double blind controlled trial", *Gastroenterology*, 72(4), pp. 573–583.
- Corcione, A., Casazza, S., Ferretti, E., Giunti, D., Zappia, E., Pistorio, A., Gambini, C., Mancardi, G. L., Uccelli, A. y Pistoia, V. (2004) "Recapitulation of B cell differentiation in the central nervous system of patients with multiple sclerosis", *Proceedings of the national academy of sciences*, 101(30), pp. 11064–11069.
- Córdoba, J. (2011) "New assessment of hepatic encephalopathy", *Journal of hepatology*, 54(5), pp. 1030–1040.
- Dadsetan, S., Balzano, T., Forteza, J., Agusti, A., Cabrera-Pastor, A., Taoro-Gonzalez, L., Hernandez-Rabaza, V., Gomez-Gimenez, B., ElMlili, N., Llansola, M. y Felipo, V. (2016a) "Infliximab reduces peripheral inflammation, neuroinflammation, and extracellular GABA in the cerebellum and improves

learning and motor coordination in rats with hepatic encephalopathy", *Journal of neuroinflammation*, 13(1), pp. 1–14.

Dadsetan, S., Balzano, T., Forteza, J., Cabrera-Pastor, A., Taoro-Gonzalez, L., Hernandez-Rabaza, V., Gil-Perotín, S., Cubas-Núñez, L., García-Verdugo, J. M., Agusti, A., Llansola, M. y Felipo, V. (2016b) "reducing peripheral inflammation with infliximab reduces neuroinflammation and improves cognition in rats with hepatic encephalopathy", *Frontiers in molecular neuroscience*, 9, pp. 1–16.

Dam, G., Ott, P., Aagaard, N. K. y Vilstrup, H. (2013) "Branched-chain amino acids and muscle ammonia detoxification in cirrhosis", *Metabolic brain disease*, 28(2), pp. 217–220.

Erickson, M. A. y Banks, W. A. (2018) "Neuroimmune axes of the blood–brain barriers and blood–brain Interfaces: bases for physiological regulation, disease states, and pharmacological interventions", *Pharmacological reviews*, 70(2), pp. 278–314.

Fan, Y. y Liu, X. (2018) "Alterations in expression and function of ABC family transporters at blood-brain barrier under liver failure and their clinical significances", *Pharmaceutics*, 10(3), pp. 1–14.

Fartoux, L., Chazouillères, O., Wendum, D., Poupon, R. y Serfaty, L. (2005) "Impact of steatosis on progression of fibrosis in patients with mild hepatitis C", *Hepatology*, 41(1), pp. 82–87.

Felipo, V. (2013) "Hepatic encephalopathy: effects of liver failure on brain function", *Nature reviews neuroscience*, 14(12), pp. 851–858.

Felipo, V. y Butterworth, R. F. (2002) "Neurobiology of ammonia", *Progress in neurobiology*, 67(4), pp. 259–279.

Felipo, V., Ordoño, J. F., Urios, A., El Mlili, N., Giménez-Garzó, C., Aguado, C., González-Lopez, O., Giner-Duran, R., Serra, M. A., Wassel, A., Rodrigo, J. M., Salazar, J. y Montoliu, C. (2012a) "Patients with minimal hepatic encephalopathy show impaired mismatch negativity correlating with reduced performance in attention tests", *Hepatology*, 55(2), pp. 530–539.

Felipo, V., Urios, A., Giménez-Garzó, C., Cauli, O., Andrés-Costa, M.-J., González, O., Serra, M. A., Sánchez-González, J., Aliaga, R., Giner-Durán, R., Belloch, V. y Montoliu, C. (2014) "Non invasive blood flow measurement in cerebellum detects minimal hepatic encephalopathy earlier than psychometric tests", *World journal of gastroenterology*, 20(33), pp. 11815–11825.

Felipo, V., Urios, A., Montesinos, E., Molina, I., García-Torres, M. L., Civera, M., Del Olmo, J. A., Ortega, J., Martínez-Valls, J., Serra, M. A., Cassinello, N., Wassel, A., Jordá, E. y Montoliu, C. (2012b) "Contribution of hyperammonemia and inflammatory factors to cognitive impairment in minimal hepatic encephalopathy", *Metabolic brain disease*, 27(1), pp. 51–58.

Ferenci, P. (2017) "Hepatic encephalopathy", *Gastroenterology report*, 5(2), pp. 138–147.

Ferenci, P., Lockwood, A., Mullen, K., Tarter, R., Weissenborn, K. y Blei, A. T. (2002) "Hepatic encephalopathy--Definition, nomenclature, diagnosis, and quantification: final report of the working party at the 11th World Congresses of Gastroenterology, Vienna, 1998", *Hepatology*, 35(3), pp. 716–721.

Fiati Kenston, S. S., Song, X., Li, Z. y Zhao, J. (2019) "Mechanistic insight, diagnosis, and treatment of ammonia-induced hepatic encephalopathy", *Journal of gastroenterology and hepatology*, 34(1), pp. 31–39.

Giménez-Garzó, C., Garcés, J. J., Urios, A., Mangas-Losada, A., García-García, R., González-López, O., Giner-Durán, R., Escudero-García, D., Serra, M. A., Soria, E., Felipo, V. y Montoliu, C. (2017) "The PHES battery does not detect all cirrhotic patients with early neurological deficits, which are different in different patients", *PLoS ONE*, 12(2), pp. 1–18.

Gluchowski, N. L., Becuwe, M., Walther, T. C. y Farese Jr, R. V. (2017) "Lipid droplets and liver disease: from basic biology to clinical implications", *Nature reviews gastroenterology & hepatology*, 14(6), pp. 343–355.

Gonzalez-Usano, A., Cauli, O., Agusti, A. y Felipo, V. (2014) "Pregnenolone sulfate restores the glutamate-nitric-oxide-cGMP pathway and extracellular GABA in cerebellum and learning and motor coordination in hyperammonemic rats", *ACS chemical neuroscience*, 5(2), pp. 100–105.

Grazioli, L., Alberti, D., Olivetti, L., Rigamonti, W., Codazzi, F., Matricardi, L., Fugazzola, C. y Chiesa, A. (2000) "Congenital absence of portal vein with nodular regenerative hyperplasia of the liver", *European radiology*, 10(5), pp. 820–825.

Guell, X., Gabrieli, J. D. E. y Schmahmann, J. D. (2018) "Triple representation of language, working memory, social and emotion processing in the cerebellum: convergent evidence from task and seed-based resting-state fMRI analyses in a single large cohort", *Neuroimage*, 172, pp. 437–449.

Gutiérrez-de-Juan, V., López de Davalillo, S., Fernández-Ramos, D., Barbier-Torres, L., Zubiete-Franco, I., Fernández-Tussy, P., Simon, J., Lopitz-Otsoa, F., de las Heras, J., Iruzubieta, P., Arias-Loste, M. T., Villa, E., Crespo, J., Andrade, R., Lucena, M. I., Varela-Rey, M., Lu, S. C., Mato, J. M., Cardoso Delgado, T. y Martínez-Chantar, M. L. (2017) "A morphological method for ammonia detection in liver", *PLoS ONE*, 12(3), pp. 1–13.

Hadjihambi, A., Arias, N., Sheikh, M. y Jalan, R. (2018) "Hepatic encephalopathy: a critical current review", *Hepatology international*, 12(1), pp. 135–147.

Hanisch, U. K. y Kettenmann, H. (2007) "Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain", *Nature neuroscience*, 10(11), pp. 1387–1394.

He, Y., Huang, C., Zhang, S., Sun, X., Long, X. y Li, J. (2012) "The potential of microRNAs in liver fibrosis", *Cellular signalling*, 24(12), pp. 2268–2272.

Herculano-Houzel, S. (2010) "Coordinated scaling of cortical and cerebellar numbers of neurons", *Frontiers in neuroanatomy*, 4(12), pp. 1–8.

Hernández-Rabaza, V., Cabrera-Pastor, A., Taoro-González, L., González-Usano, A., Agustí, A., Balzano, T., Llansola, M. y Felipo, V. (2016a) "Neuroinflammation increases GABAergic tone and impairs cognitive and motor function in hyperammonemia by increasing GAT-3 membrane expression. Reversal by sulforaphane by promoting M2 polarization of microglia", *Journal of neuroinflammation*, 13(1), pp. 1–13.

Hernández-Rabaza, V., Cabrera-Pastor, A., Taoro-González, L., Malaguarnera, M., Agustí, A., Llansola, M. y Felipo, V. (2016b) "Hyperammonemia induces glial activation, neuroinflammation and alters neurotransmitter receptors in hippocampus, impairing spatial learning: reversal by sulforaphane", *Journal of neuroinflammation*, 13(1), pp. 1–11.

Holecek, M. (2014) "Evidence of a vicious cycle in glutamine synthesis and breakdown in pathogenesis of hepatic encephalopathy – therapeutic perspectives", *Metabolic brain disease*, 29(1), pp. 9–17.

Horiuchi, T., Mitoma, H., Harashima, S. I., Tsukamoto, H. y Shimoda, T. (2010) "Transmembrane TNF- $\alpha$ : structure, function and interaction with anti-TNF agents", *Rheumatology*, 49(7), pp. 1215–1228.

Hu, G. H., Shen, L. G., Yang, J., Mei, J. H. y Zhu, Y. F. (2008) "Insight into congenital absence of the portal vein: Is it rare ?", *World journal of gastroenterology*, 14(39), pp. 5969–5979.

Jalan, R., Olde Damink, S. W. M., Hayes, P. C., Deutz, N. E. P. y Lee, A. (2004) "Pathogenesis of intracranial hypertension in acute liver failure : inflammation , ammonia and cerebral blood flow", *Journal of hepatology*, 41(4), pp. 613–620.

Jiang, W., Desjardins, P. y Butterworth, R. F. (2009) "Cerebral inflammation contributes to encephalopathy and brain edema in acute liver failure: protective effect of minocycline", *Journal of neurochemistry*, 109(2), pp. 485–493.

Jung, Y. K. y Yim, H. J. (2017) "Reversal of liver cirrhosis: current evidence and expectations", *The Korean journal of internal medicine*, 32(2), pp. 213–228.

Kappus, M. R. y Bajaj, J. S. (2012) "Covert hepatic encephalopathy: not as minimal as you might think", *Clinical gastroenterology and hepatology*, 10(11), pp. 1208–1219.

Kaur, C., Sivakumar, V., Zou, Z. y Ling, E. A. (2014) "Microglia-derived proinflammatory cytokines tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1beta induce Purkinje neuronal apoptosis via their receptors in hypoxic neonatal rat brain", *Brain structure and function*, 219(1), pp. 151–170.

Kietzmann, T. (2017) "Redox biology metabolic zonation of the liver: the oxygen gradient revisited", *Redox biology*, 11, pp. 622–630.

Kleiner, D. E., Brunt, E. M., Van Natta, M., Behling, C., Contos, M. J., Cummings, O. W., Ferrell, L. D., Liu, Y., Torbenson, M. S., Unalp-Arida, A., Yeh, M., Mccullough, A. J. y Sanyal, A. J. (2005) "Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease", *Hepatology*, 41(6), pp. 1313–1321.

Kolios, G., Valatas, V. y Kouroumalis, E. (2006) "Role of Kupffer cells in the pathogenesis of liver disease", *World journal of gastroenterology*, 12(46), pp. 7413–7420.

Krzysiek, R., Lefevre, E. A., Bernard, J., Foussat, A., Galanaud, P., Louache, F. y Richard, Y. (2000) "Regulation of CCR6 chemokine receptor expression and responsiveness to macrophage inflammatory protein-3alpha/CCL20 in human B cells.", *Blood*, 96(7), pp. 2338–45.

Lakner, A. M., Steuerwald, N. M., Walling, T. L., Ghosh, S., Li, T., Mckillop, I. H., Russo, M. W., Bonkovsky, H. L. y Schrum, L. W. (2012) "Inhibitory effects of microRNA 19b in hepatic stellate cell-mediated fibrogenesis", *Hepatology*, 56(1), pp. 300–310.

Lakshman, R., Shah, R., Reyes-Gordillo, K. y Varatharajalu, R. (2015) "Synergy between NAFLD and AFLD and potential biomarkers", *Clinics and research in hepatology and gastroenterology*, 39(1), pp. 29–34.

Lawrence, T. (2009) "The nuclear factor NF- $\kappa$ B pathway in inflammation", *Cold spring harbor perspectives in biology*, 1(6), pp. 1–10.

Liao, F., Rabin, R. L., Smith, C. S., Sharma, G., Nutman, T. B. y Farber, J. M. (1999) "CC-chemokine receptor 6 is expressed on diverse memory subsets of T cells and determines responsiveness to macrophage inflammatory protein 3 alpha.", *Journal of immunology*, 162(1), pp. 186–94.

Liere, V., Sandhu, G. y DeMorrow, S. (2017) "Recent advances in hepatic encephalopathy [version 1; peer review: 4 approved]", *F1000Research*, 6, pp. 1–14.

Magliozzi, R., Columba-Cabezas, S., Serafini, B. y Aloisi, F. (2004) "Intracerebral expression of CXCL13 and BAFF is accompanied by formation of lymphoid follicle-like structures in the meninges of mice with relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis", *Journal of neuroimmunology*, 148(1–2), pp. 11–23.

Mangas-Losada, A., García-García, R., Urios, A., Escudero-García, D., Tosca, J., Giner-Durán, R., Serra, M. A., Montoliu, C. y Felipo, V. (2017) "Minimal hepatic encephalopathy is associated with expansion of CD4+CD28-, Th22 and Tfh and B lymphocytes", *Scientific reports*, 7(6683), pp. 1–13.

Marvie, P., Lisbonne, M., L'Helgoualc'h, A., Rauch, M., Turlin, B., Preisser, L., Bourd-Boittin, K., Théret, N., Gascan, H., Piquet-Pellorce, C. y Samson, M. (2010) "Interleukin-33 overexpression is associated with liver fibrosis in mice and humans", *Journal of cellular and molecular medicine*, 14(6B), pp. 1726–1739.

Mitoma, H., Horiuchi, T., Tsukamoto, H. y Ueda, N. (2018) "Molecular mechanisms of action of anti-TNF- $\alpha$  agents – Comparison among therapeutic TNF- $\alpha$  antagonists", *Cytokine*, 101, pp. 56–63.

Montoliu, C., Cauli, O., Urios, A., ElMlili, N., Serra, M. A., Giner-Duran, R., González-Lopez, O., Del Olmo, J. A., Wassel, A., Rodrigo, J. M. y Felipo, V. (2011) "3-Nitro-tyrosine as a peripheral biomarker of minimal hepatic encephalopathy in patients with liver cirrhosis", *The American journal of gastroenterology*, 106(9), pp. 1629–1637.

Montoliu, C., Llansola, M. y Felipo, V. (2015) "Neuroinflammation and neurological alterations in chronic liver diseases", *Neuroimmunology and neuroinflammation*, 2(3), pp. 138–144.

Montoliu, C., Piedrafita, B., Serra, M. A., Del Olmo, J. A., Urios, A., Rodrigo, J. M. y 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), pp. 272–279.

Mullen, K. y Prakash, R. (2010) "Rifaximin for the treatment of hepatic encephalopathy", *Expert review of gastroenterology & hepatology*, 4(6), pp. 665–677.

Muriel, P. (2017) "The Liver: general aspects and epidemiology", in Muriel, P. (ed.) *Liver pathophysiology: therapies and antioxidants*. 1st edn. Ciudad de México: Elsevier Inc., pp. 3–22.

Nassir, F., Rector, R. S., Hammoud, G. M. y Ibdah, J. A. (2015) "Pathogenesis and prevention of hepatic steatosis", *Gastroenterology & hepatology*, 11(3), pp. 167–175.

Neuman, M. G., Voiculescu, M., Nanau, R. M., Maor, Y., Melzer, E., Cohen, L. B., Opris, M. y Malnick, S. (2016) "Non-alcoholic steatohepatitis: clinical and translational research", *Journal of pharmacy and pharmaceutical sciences*, 19(1), pp. 8–24.

Ochoa-Sanchez, R. y Rose, C. F. (2018) "Pathogenesis of hepatic encephalopathy in chronic liver disease", *Journal of clinical and experimental hepatology*, 8(3), pp. 262–271.

Parsons-Smith, B. G., Summerskill, W. H. J., Dawson, A. M. y Sherlock, S. (1957) "The electroencephalograph in liver disease", *Lancet*, 273(7001), pp. 867–871.

Patidar, K. R. y Bajaj, J. S. (2015) "Covert an overt hepatic encephalopathy: diagnosis and management", *Clinical gastroenterology and hepatology*, 13(12), pp. 2048–2061.

- Prakash, R. K. y D. Mullen, K. (2011) "Is poor quality of life always present with minimal hepatic encephalopathy?", *Liver international*, 31(7), pp. 908–910.
- Puche, J. E., Saiman, Y. y Friedman, S. L. (2013) "Hepatic stellate cells and liver fibrosis", *Comprehensive physiology*, 3(4), pp. 1473–1492.
- Punzalan, C. S. y Barry, C. T. (2016) "Acute liver failure: diagnosis and management", *Journal of intensive care medicine*, 31(10), pp. 642–653.
- Qayyum, A., Nystrom, M., Noworolski, S. M., Chu, P., Mohanty, A. y Merriman, R. (2012) "MRI steatosis grading: development and initial validation of a color mapping system", *American journal of roentgenology*, 198(3), pp. 582–588.
- Rama Rao, K. V. y Norenberg, M. D. (2012) "Brain energy metabolism and mitochondrial dysfunction in acute and chronic hepatic encephalopathy", *Neurochemistry international*, 60(7), pp. 697–706.
- Ransohoff, R. M. y Engelhardt, B. (2012) "The anatomical and cellular basis of immune surveillance in the central nervous system", *Nature reviews immunology*, 12(9), pp. 623–635.
- Ransohoff, R. M., Kivisaäkk, P. y Kidd, G. (2003) "Three or more routes for leukocyte migration into the central nervous system", *Nature reviews immunology*, 3(7), pp. 569–581.
- Ratziu, V., Bellentani, S., Cortez-Pinto, H., Day, C. y Marchesini, G. (2010) "A position statement on NAFLD/NASH based on the EASL 2009 special conference", *Journal of hepatology*, 53(2), pp. 372–384.
- Rodrigo, R., Cauli, O., Gomez-Pinedo, U., Agusti, A., Hernandez-Rabaza, V., Garcia-Verdugo, J. M. y Felipo, V. (2010) "Hyperammonemia Induces Neuroinflammation That Contributes to Cognitive Impairment in Rats With Hepatic Encephalopathy", *Gastroenterology*, 139(2), pp. 675–684.
- Román, E., Córdoba, J., Torrens, M., Torras, X., Villanueva, C., Vargas, V., Guarner, C. y Soriano, G. (2011) "Minimal hepatic encephalopathy is associated with falls", *The American journal of gastroenterology*, 106(3), pp. 476–82.
- Romero-Gómez, M., Boza, F., García-Valdecasas, M. S., García, E. y Aguilar-Reina, J. (2001) "Subclinical hepatic encephalopathy predicts the development of overt hepatic encephalopathy", *American journal of gastroenterology*, 96(9), pp. 2718–2723.
- Romero-Gómez, M., Córdoba, J., Jover, R., Del Olmo, J. A., Ramírez, M., Rey, R., De Madaria, E., Montoliu, C., Nuñez, D., Flavia, M., Compañy, L., Rodrigo, J. M. y Felipo, V. (2007) "Value of the critical flicker frequency in patients with minimal hepatic encephalopathy", *Hepatology*, 45(4), pp. 879–885.
- Romero-Gómez, M., Ramos-Guerrero, R., Grande, L., Collantes de Terán, L., Corpas, R., Camacho, I. y Bautista, J. D. (2004) "Intestinal glutaminase activity is increased in liver cirrhosis and correlates with minimal hepatic encephalopathy", *Journal of hepatology*, 41(1), pp. 49–54.
- Roostaei, T., Nazeri, A., Sahraian, M. A. y Minagar, A. (2014) "The human cerebellum: a review of physiologic neuroanatomy", *Neurologic clinics*, 32(4), pp. 859–869.
- Saad, W. E. (2014) "Portosystemic shunt syndrome and endovascular management of hepatic encephalopathy", *Seminars in interventional radiology*, 31(3), pp. 262–265.
- Sakhuja, P. (2014) "Pathology of alcoholic liver disease, can it be differentiated from nonalcoholic steatohepatitis?", *World journal of gastroenterology*, 20(44), pp. 16474–16479.

- Sanyal, A. J. (2019) "Past, present and future perspectives in nonalcoholic fatty liver disease", *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 16(6), pp. 377–386.
- Scaglioni, F., Ciccia, S., Marino, M., Bedogni, G. y Bellentani, S. (2011) "ASH and NASH", *Digestive diseases*, 29(2), pp. 202–210.
- Schattenberg, J. M., Nagel, M., Kim, Y. O., Kohl, T., Wörns, M. A., Zimmermann, T., Schad, A., Longerich, T., Schuppan, D., He, Y., Galle, P. R. y Schuchmann, M. (2012) "Increased hepatic fibrosis and JNK2-dependent liver injury in mice exhibiting hepatocyte-specific deletion of cFLIP", *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*, 303(4), pp. 498–506.
- Schomerus, H. y Hamster, W. (2001) "Quality of life in cirrhotics with minimal hepatic encephalopathy", *Metabolic brain disease*, 16(1–2), pp. 37–41.
- Shawcross, D. L., Davies, N. A., Williams, R. y Jalan, R. (2004) "Systemic inflammatory response exacerbates the neuropsychological effects of induced hyperammonemia in cirrhosis", *Journal of hepatology*, 40(2), pp. 247–254.
- Shawcross, D. L., Wright, G., Olde Damink, S. W. M. y Jalan, R. (2007) "Role of ammonia and inflammation in minimal hepatic encephalopathy", *Metabolic brain disease*, 22(1), pp. 125–138.
- Swaminathan, M., Ellul, M. A. y Cross, T. J. S. (2018) "Hepatic encephalopathy : current challenges and future prospects", *Hepatic medicine: evidence and research*, 10, pp. 1–11.
- Szondy, Z. y Pallai, A. (2017) "Transmembrane TNF-alpha reverse signaling leading to TGF-beta production is selectively activated by TNF targeting molecules: herapeutic implications", *Pharmacological research*, 115, pp. 124–132.
- Takahashi, Y. y Fukusato, T. (2014) "Histopathology of nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis", *World journal of gastroenterology*, 20(42), pp. 15539–15548.
- Tilg, H. y Diehl, A. M. (2000) "Cytokines in alcoholic and nonalcoholic steatohepatitis", *New England journal of medicine*, 343(20), pp. 1467–1476.
- Timmann, D., Drepper, J., Frings, M., Maschke, M., Richter, S., Gerwig, M. y Kolb, F. P. (2010) "The human cerebellum contributes to motor, emotional and cognitive associative learning. A review", *Cortex*, 46(7), pp. 845–857.
- Vaquero, J., Chung, C., Cahill, M. E. y Blei, A. T. (2003) *Pathogenesis of hepatic encephalopathy in acute liver failure*, *Seminars in liver disease*.
- Vilstrup, H., Amodio, P., Bajaj, J., Cordoba, J., Ferenci, P., Mullen, K. D., Weissenborn, K. y Wong, P. (2014) "Hepatic encephalopathy in chronic liver disease: 2014 practice guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases and the European Association for the Study of the Liver", *Hepatology*, 60(2), pp. 715–35.
- Watanabe, A. (2000) "Portal-systemic encephalopathy in non-cirrhotic patients: classification of clinical types, diagnosis and treatment", *Journal of gastroenterology and hepatology*, 15(9), pp. 969–979.
- Weissenborn, K. (2014) "Portosystemic encephalopathy", *Handbook of clinical neurology*, 120(45), pp. 661–674.
- Weissenborn, K., Ennen, J. C., Schomerus, H., Rückert, N. y Hecker, H. (2001) "Neuropsychological

characterization of hepatic encephalopathy", *Journal of hepatology*, 34(5), pp. 768–773.

Wijdicks, E. F. M. (2016) "Hepatic encephalopathy", *The New England journal of medicine*, 375(17), pp. 1660–1670.

Wojcicki, M., Haagsma, E. B., Gouw, A. S. H., Slooff, M. J. H. y Porte, R. J. (2004) "Orthotopic liver transplantation for portosystemic encephalopathy in an adult with congenital absence of the portal vein", *Liver transplantation*, 10(9), pp. 1203–1207.

Yokomori, H., Oda, M., Yoshimura, K. y Hibi, T. (2012) "Recent advances in liver sinusoidal endothelial ultrastructure and fine structure immunocytochemistry", *Micron*, 43(2–3), pp. 129–134.

Zemtsova, I., Görg, B., Keitel, V., Bidmon, H. J., Schrör, K. y Häussinger, D. (2011) "Microglia activation in hepatic encephalopathy in rats and humans", *Hepatology*, 54(1), pp. 204–215.

Zhou, W. C., Zhang, Q. B. and Qiao, L. (2014) "Pathogenesis of liver cirrhosis", *World journal of gastroenterology*, 20(23), pp. 7312–7324.

Zou, C., Ma, J., Wang, X., Guo, L., Zhu, Z., Stoops, J., Eaker, A. E., Johnson, C. J., Strom, S., Michalopoulos, G. K., Defrances, M. C. y Zarnegar, R. (2007) "Lack of Fas antagonism by Met in human fatty liver disease", *Nature medicine*, 13(9), pp. 1078–1085.