

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA



ESTUDIO METABOLÓMICO EN RATAS CON HIPERAMONEMIA CRÓNICA. IMPLICACIONES EN ENCEFALOPATÍA HEPÁTICA MÍNIMA

TRABAJO FIN DE MÁSTER EN BIOTECNOLOGÍA BIOMÉDICA

ALUMNA: Zulema Rodríguez Hernández

DIRECTORA: Sonia Tarazona Campos

CODIRECTORA: Marta Llansola Gil

TUTORA UPV: Maria Pilar López Gresa

Curso Académico: 2020/2021

VALENCIA, MARZO 2021

AGRADECIMIENTOS:

El máster de Biotecnología Biomédica, una nueva etapa diferente a la anterior...

Ellos: Noelia, Cristina y Fernando los responsables de este tan querido comienzo.

Beatriz Olalla mi gran descubrimiento del máster. ¡Cuánto me has ayudado!, amiga.

Sonia, la encargada de que este trabajo haya salido adelante. Su paciencia, sus explicaciones, su perfeccionismo, su implicación... Gracias.

A mi L³ por TODO.

No podría describir lo mucho que me ha aportado este máster, pero sin duda una de ellas es valorar mi “yo” más agro 🌻 🌱

ÍNDICE GENERAL

1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. OBJETIVOS.....	5
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	6
3.1. DISEÑO EXPERIMENTAL	6
3.2. ANÁLISIS METABOLÓMICO	6
3.3. PREPROCESAMIENTO DE DATOS	6
3.4. ACUMULACIÓN DIFERENCIAL DE LOS METABOLITOS.....	7
3.4.1. Modelos lineales.....	7
3.4.2. Análisis Discriminante de Regresión por Mínimos Cuadrados Parciales (PLS-DA).....	7
3.5. ANOTACIÓN FUNCIONAL DE LOS METABOLITOS	9
3.6. ANÁLISIS DE ENRIQUECIMIENTO FUNCIONAL	9
3.6.1. PaintOmics3	9
3.6.2. Gene Set Enrichment Analysis.....	9
3.7. MÉTODOS DE INTEGRACIÓN DE DATOS	10
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	12
4.1. PREPROCESAMIENTO DE DATOS	12
4.2. EFECTO DE LA HA CRÓNICA EN CADA TEJIDO.	13
4.2.1. Acumulación diferencial	13
Glutamina, glutamato y aspartato.....	16
ADMA, citrulina y arginina	18
Glicina y serina.....	20
Aminoácidos de cadena ramificada, triptófano, serotonina y quineurina	21
Histamina	23
DOPA	23
4.2.2. Enriquecimiento funcional	24
4.3. ANÁLISIS TEMPORAL EN PLASMA.....	27
4.4. ANÁLISIS INTEGRATIVO DE CEREBELO Y PLASMA.....	31
5. CONCLUSIONES.....	35
6. REFERENCIAS	37
ANEXOS	

ÍNDICE TABLAS

Tabla 1: Número de metabolitos con cambios significativos en HA con el método PLS-DA....	14
Tabla 2. Rutas metabólicas enriquecidas en los metabolitos con cambios significativos en cada tejido.....	25
Tabla 3. Metabolitos con cambios diferentes entre las 2 y las 4 semanas del tratamiento en Control e HA.....	28

ANEXOS

Tabla Suplementaria 1. Metabolitos con cambios significativos en HA utilizando modelos lineales.....	7
--	---

ÍNDICE FIGURAS

Figura 1. El dogma de la biología molecular y su relación con las ciencias ómicas.....	3
Figura 2. Flujo de trabajo llevado a cabo en este estudio.....	11
Figura 3. Diagramas de caja y bigotes de valores correspondientes a muestras de CBLO.....	12
Figura 4. Gráfico de <i>scores</i> del modelo PLS-DA para las dos primeras componentes.....	13
Figura 5. Mapa de calor de los metabolitos con cambios significativos por tejidos..	16
Figura 6. Esquema del ciclo de la glutamina-glutamato..	17
Figura 7. La HA crónica inhibe la vía NO-cGMP.	19
Figura 8. Gráficos de interacción de A) Isoleucina, B) Dopamina, C) Serotonina, D) Histamina, E) Ornitina y F) Acetilcarnitina entre control e HA y entre 2 y 4 semanas de dieta hiperamonémica.	29
Figura 9. Interacción de la carnitina con el ciclo de la urea.....	31
Figura 10. Modelo PLS entre CBLO y PL4W.....	32
Figura 11. Red de interacción de metabolitos de PL4W y CBLO..	33

ANEXOS

Figura Suplementaria 1. Distribución de valores faltantes.....	4
Figura Suplementaria 2. Diagramas de cajas y bigotes para CX, HP, PL2W y PL4W.....	6
Figura Suplementaria 3. Gráfico de <i>scores</i> del modelo PLS-DA para las dos primeras componentes en CX, HP y PL2W.....	8

ÍNDICE ABREVIATURAS

AAA: Aminoácidos Aromáticos

Acetil-CoA: acetil-Coenzima A

ARNm: ARN mensajero

AST: Aspartato Aminotransferasa

BBB: Barrera Hematoencefálica

BCAA: Aminoácidos de Cadena Ramificada

BDL: Ligadura de los Conductos Biliares

CaMKII: Proteína Quinasa dependiente de Ca^{2+} /Calmodulina II

CBLO: Cerebelo

CHEBI: Chemical Entities of Biological Interest

CM: Calmodulina

CX: Córtex

DDAH-I: Dimetilarginina Dimetilaminohidrolasa

EH: Encefalopatía Hepática

EHM: Encefalopatía Hepática Mínima

EM: Espectrometría de Masas

FC: Fold Change

FIA: Análisis de Inyección de Flujo

HA: Hiperamonemia

HP: Hipocampo

HPLC: Cromatografía Líquida de Alta Resolución

IHA: Insuficiencia Hepática Aguda

IHC: Insuficiencia Hepática Crónica

ID(s): Identificador(es)

KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes

logFC: log Fold Change

LOLA: mezcla de L-ornitina y L-aspartato

MAO: Monoamino Oxidasa

m/z: masa/carga

NMDA: N-metil-D-aspartato

NMDAR: Receptor de NMDA

NO: Óxido Nítrico

NOS: Óxido Nítrico Sintasa

PL2W: Plasma a las dos semanas

PL4W: Plasma a las cuatro semanas

PLS: Regresión por Mínimos Cuadrados Parciales

PLS-DA: Análisis Discriminante de Regresión por Mínimos Cuadrados Parciales

PRMT-1: Proteína-Metil Transferasa

PSS: Derivación Portosistémica

QTRAP: Trampa de Iones Cuadrupolo

RMN: Resonancia Magnética Nuclear

sGC: Guanilil Ciclasa Soluble

SNC: Sistema Nervioso Central

5HIAA: Ácido 5-hidroxiindol-acético

1. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades hepáticas constituyen una de las principales causas de mortalidad y morbilidad en todo el mundo (Byass, 2014). El hígado es un órgano vital, ya que elimina los compuestos tóxicos, tanto endógenos como exógenos, del organismo. Cuando falla, las sustancias dañinas como el amonio, se acumulan y pueden llegar al cerebro afectando la función del Sistema Nervioso Central (SNC) (Felipo, 2013). En concreto, la Encefalopatía Hepática (EH) y la Encefalopatía Hepática Mínima (EHM), etapa inicial de la EH, son alteraciones de la función cerebral como resultado del mal funcionamiento del hígado (Stinton y Jayakumar, 2013). Principalmente, existen tres tipos de EH que se dividen en A, B o C en función de las enfermedades hepáticas que las provoquen (Ferenci *et al.*, 2002; Vilstrup *et al.*, 2014). Por tanto, los síntomas y manifestaciones clínicas de cada EH son diferentes porque también lo es su etiología (Felipo, 2013). La primera de ellas (EH A) está asociada con Insuficiencia Hepática Aguda (IHA), en la que el hígado pierde rápidamente su función (Williams *et al.*, 1993) La IHA, presenta altas tasas de mortalidad a pesar de su baja incidencia siendo las causas más frecuentes la intoxicación por paracetamol o la infección por hepatitis B y/o E (Felipo, 2013). El tipo B es causado por una Derivación Portosistémica (PSS) o también conocida como derivación hepática. Es decir, una conexión anormal del hígado con la circulación sistémica que provoca que la sangre no depurada se mezcle con la depurada que sale del hígado. La PSS puede ser congénita o puede originarse quirúrgicamente en el “*bypass*” portosistémico, utilizado para aliviar la tensión en la vena porta en pacientes con hipertensión portal (Marti *et al.*, 2015). Por último, el tipo C se asocia con Insuficiencia Hepática Crónica (IHC). Las estimaciones mundiales muestran que 844 millones de personas padecen IHC con una tasa de mortalidad de 2 millones de muertes por año (Byass, 2014). Estas cifras superan otros problemas de salud pública relacionados con enfermedades crónicas como la diabetes y enfermedades cardiovasculares padecidas por 422 y 540 millones de personas respectivamente (Byass, 2014). En concreto, la cirrosis, que afecta a 5,5 millones de pacientes en los EE.UU, es la principal causa de EH (Felipo, 2013). De hecho, el 40% de pacientes cirróticos desarrollan EH (Vilstrup *et al.*, 2014).

En Europa, la EH afecta a más de 200.000 personas, aunque se desconoce la incidencia exacta de la enfermedad ya que sigue siendo en gran medida infradiagnosticada (Vilstrup *et al.*, 2014). En cuanto a los síntomas, la gravedad de la EH se clasifica tradicionalmente en cuatro grados siguiendo los criterios de West Haven (Conn *et al.*, 1977). El grado 1 se caracteriza por menor capacidad de atención y dificultad en realizar operaciones matemáticas básicas. Los pacientes de grado 2 muestran letargo o apatía, ligera desorientación en espacio y tiempo, y comportamiento inapropiado. En el grado 3 los síntomas incluyen somnolencia, confusión y fuerte desorientación. Por último, se considera grado 4 cuando el paciente está en coma.

Como se ha comentado anteriormente, el deterioro funcional del hígado favorece la acumulación de sustancias tóxicas, entre ellas el amonio, el cual es un producto del metabolismo proteico que necesita convertirse en urea (un compuesto menos dañino) antes de ser filtrado por los riñones. Esta acumulación de amonio en sangre se conoce como Hiperamonemia (HA) y es común en los pacientes cirróticos y con EH (Felipo, 2013). Además, la HA por si misma es capaz de inducir activación microglial y aumento de marcadores inflamatorios, los cuales agravan los déficits cognitivos (Rodrigo *et al.*, 2010). Las ratas con EHM presentan neuroinflamación y alteraciones cognitivas y motoras que se revierten con antiinflamatorios (Cauli *et al.*, 2007; Cauli *et al.*, 2009a). En el desarrollo de la EH y la HA están involucradas las células gliales, en concreto astrocitos y microglía. Entre las funciones principales de los astrocitos se encuentran, en primer lugar, eliminar el amonio a través de la síntesis de glutamina mediante la glutamina sintetasa (Felipo y Butterworth, 2002). En segundo lugar, se ha observado que en HA se produce un desequilibrio osmótico en los astrocitos por el aumento de glutamina, lo cual hace cambiar su morfología a la llamada “astrocitos de Alzheimer tipo II” (Watson *et al.*, 1985; Shawcross *et al.*,

2004a). No obstante, muchos autores no apoyan el papel de este proceso de los astrocitos en HA crónica (Oria *et al.*, 2010; Felipo, 2013; Cauli *et al.*, 2014). En tercer lugar, los astrocitos también forman parte de la Barrera Hematoencefálica (BBB) de modo que tienen un papel muy importante en la homeostasis de sustancias entre la circulación sanguínea general y la circulación cerebral (Abbott *et al.*, 2006). Varios trabajos han demostrado que la HA altera la permeabilidad y la función de los transportadores en la BBB (Aspinall *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2014; Fan y Liu, 2018) favoreciendo que los factores periféricos, como las citocinas proinflamatorias sanguíneas o las células inmunes plasmáticas, accedan al cerebro a través de las zonas en donde la BBB es más permeable induciendo neuroinflamación (Felipo, 2013).

Por otro lado, los estudios en modelos animales y autopsias cerebrales de pacientes que fallecieron por coma hepático han revelado que la HA crónica perturba la neurotransmisión del SNC (Hazell y Butterworth, 1999) afectando a los sistemas glutamatérgico (Monfort *et al.*, 2002; Cauli *et al.*, 2009b), GABAérgico (Cauli *et al.*, 2009b; Cabrera-Pastor *et al.*, 2019), dopaminérgico, serotoninérgico y colinérgico (Hazell y Butterworth, 1999). Como resultado de la alteración del sistema glutamatérgico, se produce un aumento de glutamato extracelular que altera la activación de los receptores ionotrópicos de glutamato tipo N-metil-D-aspartato (NMDA), responsables de activar la vía glutamato-óxido nítrico-cGMP (Hermenegildo *et al.* 1998; Cabrera-Pastor *et al.* 2016a). La modulación de esta vía es muy importante ya que está implicada en algunos tipos de aprendizaje (Erceg *et al.*, 2005ab; Monfort *et al.*, 2007). En el caso de ratas con HA y EHM, el aumento de glutamato y la alteración de esta ruta produce deterioro cognitivo (Erceg *et al.*, 2005ab). Sin embargo, los efectos de la HA en la neurotransmisión son distintos en las diferentes áreas del encéfalo. Por ejemplo, la HA crónica aumenta el tono GABAérgico en el cerebelo induciendo incoordinación motora en las ratas con HA crónica (González-Usano *et al.*, 2014), pero lo reduce en el córtex (Cauli *et al.*, 2009c).

El encéfalo está formado por el tronco encefálico, el cerebro y el cerebelo (CBLO). Dentro del cerebro se encuentran el Hipocampo (HP) y el Córtex (CX) (Mendoza y Foundas, 2007). Estas tres estructuras, CBLO, CX e HP, han sido estudiadas en EH e HA (Monfort *et al.*, 2007; Cauli *et al.*, 2009c; Cabrera-Pastor *et al.*, 2016a; Czarnecka *et al.*, 2017a; Cabrera-Pastor *et al.*, 2019). El CX o corteza cerebral comprende la región más grande del cerebro y participa en el pensamiento, la conciencia, la percepción, el lenguaje, la imaginación, etc (Mendoza y Foundas, 2007). El HP por su parte, desempeña un papel fundamental en la memoria a largo plazo y en el aprendizaje y/o navegación espacial. Desde hace varios años, el HP ha sido ampliamente estudiado ya que el deterioro de su función está implicado en la enfermedad de Alzheimer, el envejecimiento, la esquizofrenia y la depresión (Small *et al.*, 2011). Por último, el CBLO está íntimamente ligado al sistema motor y sensorial, y entre sus muchas funciones, las más estudiadas son la coordinación del movimiento y el mantenimiento del equilibrio y la posición. Si bien su papel en la ejecución de las habilidades motoras ha sido reconocido durante mucho tiempo, en los últimos años se ha estudiado su contribución en el aprendizaje, procesos cognitivos e incluso las emociones y trastornos psiquiátricos (Buckner, 2013). De esta manera, al ser áreas que tienen funciones y estructuras dispares, es necesario estudiarlos de forma separada. Es sabido que el CBLO se diferencia considerablemente del HP y CX, los cuales tienden a asemejarse en mayor medida. De hecho, en un estudio metabólico, observaron que el HP y el CX tenían una firma metabólica muy similar, a diferencia del CBLO, el cual era significativamente distinto a los otros (Choi *et al.*, 2018).

La metabolómica es la ómica más reciente en el campo de las ciencias biológicas y se define como el análisis cualitativo y cuantitativo del metaboloma (conjunto de metabolitos) de una muestra biológica (Verpoorte *et al.*, 2007). Los metabolitos son compuestos moleculares pequeños (<1,5 kDa) entre los cuales se incluyen los pertenecientes al metabolismo primario como los azúcares,

nucleótidos, aminoácidos, péptidos y algunos lípidos (Issaq *et al.*, 2009). La concentración de cada metabolito depende del estado fisiológico, de desarrollo y patológico de un organismo en respuesta a diferentes influencias genéticas y ambientales (Cambiaghi *et al.*, 2017). Y es que los metabolitos constituyen los productos finales del metabolismo celular, es decir, se encuentran aguas abajo de los sistemas genómico, transcriptómico y proteómico (Figura 1). Por tanto, su estudio puede conducir a una comprensión más profunda de los efectos que producen estos sistemas, condicionados por los factores ambientales, en el fenotipo final en un momento dado, así como permite evaluar los cambios metabolómicos entre salud y enfermedad (Cambiaghi *et al.*, 2017). Existen dos tipos de análisis metabolómico: los análisis dirigidos y los no dirigidos. Con respecto al primero, se analizan un conjunto acotado de metabolitos de interés seleccionados a priori (Dudley *et al.*, 2010). Por el contrario, la metabolómica no dirigida examina simultáneamente todos los metabolitos de una muestra biológica (Vinaixa *et al.*, 2012).

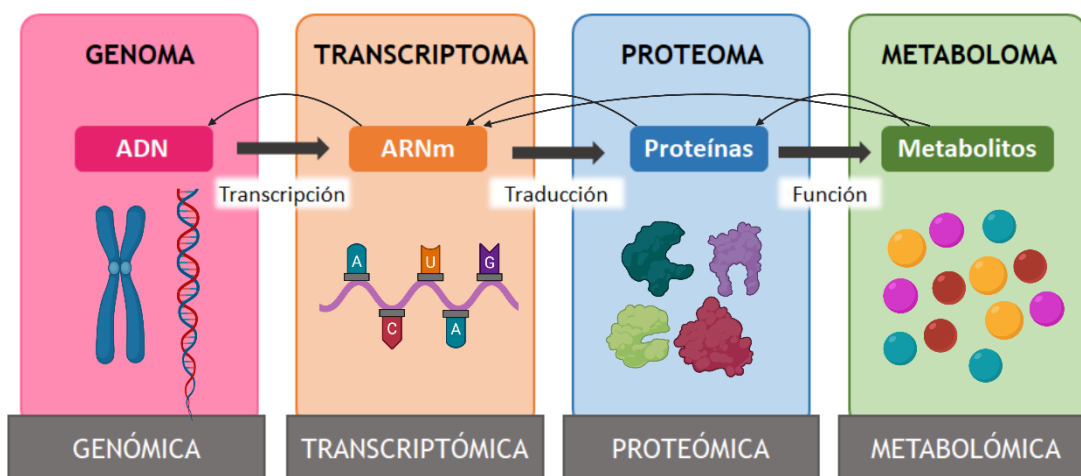


Figura 1. El dogma de la biología molecular y su relación con las ciencias ómicas. La información genética contenida en el ADN se transcribe en ARN mensajero (ARNm), el cual mediante la traducción se convierte en proteínas. Las proteínas son las efectoras de las “órdenes” codificadas por los genes, es decir son las que llevan a cabo las funciones celulares, mediante las que generan o consumen distintos metabolitos. Como indican las flechas delgadas el flujo no es unidireccional, se trata de un sistema de interacciones altamente complejo. Adaptado de Orfao, (2019).

La identificación de metabolitos en muestras biológicas se lleva a cabo mediante Espectrometría de Masas (EM) tras una cromatografía previa o directamente mediante espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear (RMN), si bien el gran crecimiento de la metabolómica en los últimos tiempos se ha debido al desarrollo de la EM (Putri *et al.*, 2013). Entre sus ventajas con respecto a la RMN, se encuentran que tiene una sensibilidad mayor, requiere menor cantidad de muestra y es más económica. Sin embargo, también presenta algunas desventajas ya que es una técnica que destruye la muestra analizada, los resultados son menos reproducibles y es necesario utilizar varias técnicas de ionización para detectar un mayor rango de metabolitos (Putri *et al.*, 2013).

En un análisis metabolómico basado en EM, el flujo de trabajo consiste, en primer lugar, en la homogeneización de la muestra y la posterior separación de los metabolitos (Cambiaghi *et al.*, 2017). Una de las técnicas de separación más utilizadas es la Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC), que consiste en separar las sustancias integrantes de una mezcla por su interacción con una fase estacionaria sólida y una fase móvil líquida de diferentes polaridades (Lopes *et al.*, 2017). El flujo que sale de la HPLC y contiene las moléculas ya separadas se introduce en el espectrómetro de masas. La EM es una técnica analítica utilizada para detectar y

cuantificar iones, basándose en su relación masa/carga (m/z) al aplicar un campo electromagnético (Lindon *et al.*, 2011). Un espectrómetro de masas está formado por 3 componentes principales. 1) Una fuente de ionización que se encarga de convertir el analito en un ión en fase gaseosa. La ionización por electrospray o ESI es una técnica de ionización muy empleada y consiste en aplicar un voltaje alto a las moléculas para obtener un aerosol ionizado (Lindon *et al.*, 2011). 2) El analizador de masas es la parte del equipo que acelera los iones en un campo electromagnético y los separa en función de su relación m/z . Existen diferentes tipos de analizadores de masas: Tiempo de Vuelo o TOF, cuadrupolo, Trampa de Iones Cuadrupolo (QTRAP), etc. El QTRAP permite almacenar, seleccionar y analizar los iones formados en la misma trampa (March, 1997). 3) Finalmente el detector de iones determina la cantidad, la masa y la carga de los iones.

Actualmente, el auge de la metabolómica en la biología de sistemas se ve obstaculizado por la falta de metodologías estandarizadas que garanticen resultados precisos y reproducibles (Vasilopoulou *et al.*, 2016). Además, a pesar de la importancia del metabolismo cerebral para su correcto funcionamiento, los conocimientos aún son escasos tanto en salud como en enfermedad (Gonzalez-Riano *et al.*, 2016). En este contexto, los estudios metabolómicos del SNC se centran en el análisis de fluidos biológicos como plasma sanguíneo y líquido cefalorraquídeo para la mejor comprensión de trastornos neurodegenerativos y psiquiátricos como la esquizofrenia (Holmes *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2013), la depresión (Kaddurah-Daouk *et al.*, 2012), el trastorno bipolar (Yoshimi *et al.*, 2016), etc. También existen un número limitado de trabajos metabolómicos en el cerebro humano post-mortem (Prabakaran *et al.*, 2004; Chan *et al.*, 2011; Graham *et al.*, 2013; Jové *et al.*, 2014). Además, los estudios con modelos animales han permitido trazar una huella metabolómica en los tejidos cerebrales con diferentes enfermedades que afectan al SNC (Salek *et al.*, 2010; Davidovic *et al.*, 2011; Chen *et al.*, 2015a; González-Domínguez *et al.*, 2015). Asimismo, la metabolómica se ha empleado para estudiar los cambios que se producen en el metaboloma durante la cirrosis, la EH o la EHM (Jiménez *et al.*, 2010; Saito *et al.*, 2016) ya que se piensa que podría ser útil para diagnosticar complicaciones, determinar el pronóstico, evaluar la respuesta terapéutica y encontrar nuevas dianas farmacológicas en estas enfermedades (Khan *et al.*, 2018) Esto podría resultar especialmente útil para el diagnóstico de la EHM ya que no existen criterios universales para su diagnóstico y la mayoría de los pacientes permanecen sin diagnosticar y sin tratar (Vilstrup *et al.*, 2014). Por tanto, el diagnóstico y tratamiento precoces de la EHM mejorarían la calidad y la esperanza de vida de estas personas y evitarían la progresión de las deficiencias neurológicas (Felipo, 2013).

Finalmente, son muchos los autores que han investigado la EH y la EHM tanto en pacientes como en modelos animales. Sin embargo, estas enfermedades han sido poco estudiadas empleando técnicas ómicas, en concreto aplicando la metabolómica. Asimismo, la mayoría de trabajos sobre EH y EHM se han centrado en el efecto que tiene la HA en plasma, líquido cefalorraquídeo o alguna de las regiones que conforman el encéfalo. Pero, en ninguno de ellos se ha estudiado simultáneamente los cambios de los metabolitos en varias áreas del SNC. Este trabajo, por tanto, se considera pionero en este campo de estudio, ya que se analizan los cambios en el metaboloma de diferentes regiones del encéfalo (CBLO, CX e HP) simultáneamente, además del plasma de ratas a las que se les ha administrado una dieta rica en amonio. De esta manera, se busca una mejor comprensión de los mecanismos moleculares que se alteran durante la HA y que conducen a los problemas cognitivos y motores propios de la EH y la EHM. Al mismo tiempo, se pretende encontrar metabolitos que pudieran ser potenciales biomarcadores para la EHM. En resumen, con este proyecto esperamos abrir un nuevo campo en la investigación de los efectos de la HA crónica en el metaboloma y los mecanismos y rutas biológicas implicados en su regulación.

2. OBJETIVOS

El objetivo general de este trabajo es conocer los cambios metabólicos que se producen en plasma y en el SNC (CBLO, HP y CX) durante la EHM como consecuencia de la HA crónica, así como identificar posibles biomarcadores que puedan utilizarse para detectar la presencia de alteraciones neurológicas y cognitivas en etapas tempranas de la HA para evitar mayores complicaciones como EH o EHM. Para ello, se dispone de 8 ratas control y 8 ratas a las que se les administra una dieta rica en amonio como modelo animal de HA crónica para posteriormente medir el perfil metabólico del CBLO, HP, CX, y plasma a las dos y a las cuatro semanas de administrar la dieta.

Para lograr el objetivo principal, se definieron los siguientes objetivos específicos:

1. Procesar los datos metabólicos de plasma a las dos (PL2W) y a las cuatro (PL4W) semanas de administración de una dieta rica en amonio y de CBLO, HP y CX, de ratas control y de ratas con HA crónica, para ser utilizados en los análisis estadísticos, realizando los controles de calidad necesarios y normalizando los datos para eliminar posibles sesgos técnicos.
2. Identificar los metabolitos con cambios significativos entre ratas control y ratas con HA en CBLO, HP, CX, PL2W y PL4W, y realizar la interpretación funcional. Para ello, también se estudiará las vías metabólicas que se encuentran enriquecidas en los metabolitos discriminantes en cada tejido.
3. Analizar el perfil temporal de los metabolitos en plasma (PL2W y PL4W) para identificar e interpretar funcionalmente aquellos metabolitos que cambian a lo largo del tiempo, de forma diferente en control e HA.
4. Realizar un análisis integrativo con el fin de encontrar metabolitos en plasma que pudieran servir como potenciales biomarcadores de los cambios metabólicos que se producen en el encéfalo en la HA crónica.

Con este estudio, esperamos proporcionar no solo más conocimientos sobre HA crónica y la EHM, sino también abrir paso a nuevas investigaciones. Esta información resultaría útil en la práctica clínica para adelantar el diagnóstico de la EHM y la EH y mejorar por tanto la calidad de vida de los pacientes.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. DISEÑO EXPERIMENTAL

Los experimentos realizados fueron aprobados por el Comité Ético de Experimentación Animal del Centro de Investigación Príncipe Felipe y por la Conselleria de Agricultura de la Generalitat Valenciana. Asimismo, se realizaron de acuerdo con las directrices de la Directiva de la Comisión Europea (2010/63 / EU) para el cuidado y manejo de animales de experimentación.

Se utilizaron 16 ratas (*Rattus norvegicus*) machos Wistar (Charles River), con un peso comprendido entre 250 y 300 g, las cuales fueron separadas de forma aleatoria en dos grupos de 8 ratas cada uno: Control e HA. Las ratas que constituyen el grupo HA se alimentaron durante 4 semanas con una dieta rica en amonio (30% de acetato de amonio) siguiendo el protocolo descrito por Felipo *et al.*, (1988). Ambos grupos de animales permanecieron durante 4 semanas con las mismas condiciones experimentales (ciclo de 12 h de luz, $55 \pm 5\%$ de humedad y 22°C de temperatura) además de alimentación y bebida *ad libitum*.

Se extrajeron muestras de sangre de la vena safena para obtener plasma (centrifugación a 3000 g durante 5 minutos) a las 2 semanas (PL2W) y a las 4 semanas (PL4W) después de haber empezado la dieta. A las 4 semanas de dieta, las ratas fueron sacrificadas por decapitación y se diseccionaron diferentes áreas del encéfalo: CBLO, HP y CX. Rápidamente, estos tejidos se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C para ser utilizadas posteriormente en el análisis metabólico junto con las muestras de plasma. Finalmente se obtuvieron por cada tejido 16 muestras (8 de ratas control y 8 de HA), a excepción de PL2W que se obtuvieron 12 muestras (6 de ratas Control y 6 de HA).

3.2. ANÁLISIS METABOLÓMICO

Se realizó un análisis metabólico dirigido con el kit *AbsoluteIDQ® p180* de la plataforma BIOCRATES. Para ello, las muestras se homogeneizaron en metanol mediante sonicación (3 x 20 s) y luego se centrifugaron (5 min, 10.000 g). A continuación, se colocaron 10 μL en la placa de BIOCRATES siguiendo las instrucciones del kit. Los azúcares (hexosas) y lípidos (esfingolípidos, glicerofosfolípidos y acilcarnitinas) se analizaron utilizando un espectrómetro de masas QTRAP 4.500 de SCIEX mediante Análisis de Inyección de Flujo (FIA) basado en EM en modo negativo. Los aminoácidos y las amins biogénicas se analizaron utilizando un sistema HPLC-EM conectado al QTRAP con el espectrómetro en modo positivo.

Para obtener las concentraciones de los metabolitos, los datos de FIA se analizaron con el software MetIDQ (BIOCRATES Life Sciences AG). Las concentraciones de aminoácidos y amins biogénicas se calcularon con el software Analyst de SCIEX. Como resultado, se obtuvieron varios archivos Excel, según el tipo de metabolito. Finalmente, se recopilaron todos estos datos en una matriz única que contiene las concentraciones de los 180 metabolitos analizados.

3.3. PREPROCESAMIENTO DE DATOS

Se realizó un filtrado de los datos y se eliminaron aquellos metabolitos que contenían más del 20% de valores faltantes siguiendo la “regla del 80%” (Smilde *et al.*, 2005). Adicionalmente, se decidió mantener en el análisis a la creatinina, tirosina, citrulina y triptófano, pese a tener un porcentaje de valores faltantes mayor que el límite establecido (25%, 37,5%, 31,25% y 31,25% respectivamente), por estar muy relacionados con la enfermedad que se estudia. Los valores faltantes se imputaron con el paquete de R “*mice*”, acrónimo de Multivariate Imputations by Chained Equations (Buuren y Groothuis-Oudshoorn, 2010), utilizando el método “*cart*”, que se basa en árboles de clasificación y regresión para calcular los valores faltantes. El paquete “*mice*” aplica diferentes modelos estadísticos para predecir los valores faltantes a partir de los datos existentes. Este proceso recibe el nombre de imputación. Por cada valor faltante, “*mice*” permite

generar distintas predicciones, que se promedian con el objetivo de obtener un valor más real y disminuir el error de predicción. Una vez aplicado “*mice*”, se constató que la imputación no modificaba sustancialmente la distribución de los datos.

Los datos imputados se transformaron logarítmicamente para reducir asimetrías. Posteriormente, se probaron tres estrategias de normalización diferentes. La normalización por la mediana y la normalización por cuantiles, ambas con la función “*normalizeBetweenArrays*” del paquete de R “*limma*” (Ritchie *et al.*, 2015), que obliga a que los datos tengan la misma mediana y mismos cuantiles, respectivamente. También se aplicó la normalización con el método de estabilización de varianza (VSN) (Huber *et al.*, 2002) con la función “*justvsn*” del paquete “*vsn*”. Este método transforma los datos de tal manera que la varianza se mantiene constante en todos los datos.

3.4. ACUMULACIÓN DIFERENCIAL DE LOS METABOLITOS

Para identificar metabolitos diferencialmente acumulados en cada uno de los 5 tejidos, es decir, metabolitos con cambios significativos entre ambos grupos de ratas (control e HA), se aplicaron dos estrategias diferentes: a) modelos lineales y b) métodos multivariantes de reducción de la dimensión, en concreto el Análisis Discriminante de Regresión por Mínimos Cuadrados Parciales (PLS-DA).

3.4.1. Modelos lineales

El análisis de expresión diferencial mediante modelos lineales se realizó utilizando la librería de R “*limma*” (Ritchie *et al.*, 2015), la cual emplea métodos empíricos bayesianos para mejorar la estimación de la varianza. Para ello, se creó la matriz de diseño, que es una matriz 0-1 que indica el grupo experimental al que pertenece cada muestra (rata, en este caso). Seguidamente, se utilizó la función “*lmFit*” que ajusta un modelo lineal para cada metabolito, donde la variable respuesta son los niveles de dicho metabolito y la variable explicativa el factor grupo (control e HA). Para finalizar, se aplicó la función “*eBayes*” que estima el valor del estadístico *t*, a partir del cual se obtiene el *p*-valor del contraste que, nos indicará si el nivel medio del metabolito presenta un cambio significativo entre los grupos HA y control. Se asumen como metabolitos diferencialmente expresados, aquellos con un *p*-valor igual o inferior a 0,05 y un log fold change (logFC) en valor absoluto superior a 0,2. El logFC se calculó dividiendo, para cada metabolito, su concentración media en ratas con HA entre la concentración media en ratas control. A ese ratio (FC) se le aplica el logaritmo en base 2 para que la medida del cambio entre condiciones sea simétrica respecto al 0.

3.4.2. Análisis Discriminante de Regresión por Mínimos Cuadrados Parciales (PLS-DA).

En esta segunda estrategia se analizó la acumulación diferencial mediante el método PLS-DA. El PLS-DA es una variante del modelo de Regresión por Mínimos Cuadrados Parciales (PLS), por lo que se explicará en primer lugar el modelo PLS.

El objetivo del modelo PLS es predecir o explicar una matriz respuesta **Y** a partir de una matriz predictiva **X**. El PLS es un modelo de regresión multivariante basado en variables latentes. Estas variables latentes (o componentes) son combinación lineal de las variables en **X** e **Y**, y se definen de forma que se maximice la covarianza entre **X** e **Y**. Además, con un número reducido de estas variables latentes o componentes se consigue explicar la relación entre **X** e **Y**, de ahí que el PLS se incluya en los métodos de reducción de la dimensión. Así pues, tanto las variables originales como las observaciones se pueden proyectar sobre el nuevo espacio creado por las variables

latentes. Los *scores* son las proyecciones de las observaciones (en \mathbf{X} o \mathbf{Y}) en este nuevo espacio, mientras que los *loadings* se definen como la contribución de cada variable (en \mathbf{X} o \mathbf{Y}) a las nuevas variables latentes. Además, en el modelo PLS también se calcula una matriz de pesos (*weights*) que representan el grado de relación entre las variables en \mathbf{X} y en \mathbf{Y} . Se obtienen tantos vectores de *scores*, *loadings* y *weights* como componentes se seleccionen en el modelo, y para cada una de las matrices \mathbf{X} e \mathbf{Y} .

La solución al PLS dada por el espacio de variables latentes también puede ser representada como un modelo de regresión (Otto, 2016):

$$\mathbf{Y} = \mathbf{X} \cdot \mathbf{B} + \mathbf{F} \quad (3.1)$$

Siendo \mathbf{B} la matriz que contiene los coeficientes de regresión del modelo y \mathbf{F} la matriz de residuos. \mathbf{B} se calcula a partir de las matrices de pesos en \mathbf{X} e \mathbf{Y} .

Como se ha mencionado anteriormente, el PLS-DA es un caso particular del PLS donde la matriz respuesta \mathbf{Y} es ahora una variable categórica, en nuestro caso un vector indicando el grupo de cada rata (Control o HA) que se convierte en tantos vectores 0-1 como categorías distintas tenga \mathbf{Y} . Así, la nueva matriz compuesta por estos vectores 0-1 ya es una matriz numérica y puede realizarse con ella un análisis PLS. Este análisis se realizó con la función “*opls*” de la librería “*ropls*” (Thevenot *et al.*, 2015) disponible en Bioconductor (Gentleman *et al.*, 2004). En nuestro caso, se aplicó un modelo PLS-DA por cada tejido y la \mathbf{X} de cada modelo eran los datos de metabolómica correspondientes centrados a media cero, es decir, restando a cada variable su media, y escalados a varianza unitaria.

Una vez obtenido el modelo PLS-DA, se utilizaron los coeficientes de regresión (matriz \mathbf{B}) para determinar si un metabolito presentaba un cambio importante debido a la HA. Para obtener la significación estadística de dichos coeficientes, se calculó un pseudo-intervalo de confianza mediante el método de remuestreo Jackknife. El método Jackknife permite construir muestras nuevas a partir de la original eliminando cada vez una observación. Por tanto, se define la muestra *i*-ésima de Jackknife como la muestra formada de eliminar la observación *i*-ésima de la muestra original (Efron, 1982):

$$\mathbf{X}_i = \{\mathbf{X}_1, \mathbf{X}_2, \dots, \mathbf{X}_{i-1}, \mathbf{X}_{i+1}, \dots, \mathbf{X}_n\} \quad (3.2)$$

Después de aplicar esta técnica se consideró que un metabolito presentaba un cambio significativo entre control e HA si no estaba incluido el valor 0 en su intervalo de confianza al 95%.

Por otra parte, el parámetro VIP mide la capacidad de cada variable en \mathbf{X} para predecir la matriz \mathbf{Y} . Es decir, es una puntuación que mide la importancia de cada metabolito en la proyección y se define como:

$$VIP_j^2 = \sum_f w_{jf}^2 \cdot SSY_j \cdot J / (SSY_{tot.expl.} \cdot P) \quad (3.3)$$

Donde w_j es el valor de ponderación del PLS para una variable determinada x_j , J es el número de variables en \mathbf{X} , SSY el porcentaje de varianza explicada en \mathbf{Y} , y P el número de variables latentes del modelo PLS (Wold *et al.*, 1993).

El VIP es un parámetro que varía en un rango fijo, ya que la suma de VIP al cuadrado para todas las variables suma el número de variables. Esto explica porqué es común asumir como umbral un valor VIP mayor que 1 (es decir, mayor que el promedio de los valores VIP al cuadrado), lo que significa que una variable seleccionada tendrá una influencia por encima del promedio (Cocchi *et al.*, 2018).

Para obtener una selección más robusta de los metabolitos diferencialmente expresados, finalmente se seleccionaron aquellos con un VIP >1 y un intervalo de confianza para el coeficiente de regresión que no contuviera el valor 0.

3.5. ANOTACIÓN FUNCIONAL DE LOS METABOLITOS

Para la anotación de los metabolitos se utilizaron dos bases de datos: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, también conocida como KEGG (Kanehisa y Goto, 2000) y Chemical Entities of Biological Interest o CHEBI (Hastings *et al.*, 2016).

Los Identificadores (IDs) de los metabolitos y las rutas metabólicas en las que se encuentran, se descargaron con la API de KEGG. También, se utilizó el conversor de IDs MBROLE v2.0 (López-Ibáñez *et al.*, 2016) para convertir los IDs de KEGG a nomenclatura CHEBI. No obstante, para algunos metabolitos se tuvo que buscar manualmente en las bases de datos el ID de KEGG y de CHEBI correspondiente al ID de Biocrates. Además, se descargaron las rutas metabólicas en las que intervienen los metabolitos a estudiar tanto de la base de datos de KEGG como de Reactome (Jassal *et al.*, 2020), la cual suele utilizar los IDs de CHEBI.

3.6. ANÁLISIS DE ENRIQUECIMIENTO FUNCIONAL

El objetivo de un análisis de enriquecimiento funcional es identificar rutas metabólicas que se encuentren enriquecidas en los metabolitos que muestran cambios significativos entre las condiciones estudiadas, HA y control en nuestro caso. Se emplearon dos herramientas diferentes para llevar a cabo el análisis de enriquecimiento funcional, que se describen a continuación: PaintOmics3 y el paquete de R *mdgsa*.

3.6.1. PaintOmics3

PaintOmics3 v0.4.5 (Hernández-de-Diego *et al.*, 2018) es una herramienta web que permite la visualización integradora de múltiples datos ómicos sobre las rutas de KEGG. Entre otras muchas funcionalidades, PaintOmics3 realiza un análisis de enriquecimiento funcional de los metabolitos que están asociados a una ruta de KEGG aplicando la prueba exacta de Fisher para cada una de dichas rutas. El test de Fisher analiza una tabla de contingencia por cada ruta en la que se pretende averiguar si el porcentaje de metabolitos diferencialmente acumulados en la ruta en cuestión es significativamente mayor que el porcentaje de metabolitos diferencialmente acumulados fuera de esta ruta. En caso afirmativo, esta ruta estaría enriquecida, en nuestro caso, en los metabolitos con cambios significativos en HA.

El “*input*” proporcionado a PaintOmics3 fue una matriz con los logFC entre HA y control para cada metabolito y tejido, y otro fichero con el nombre de los metabolitos con cambios significativos en el tejido estudiado. Se realizó un análisis PaintOmics para cada uno de los 5 tejidos (CBLO, CX, HP, PL2W y PL4W). Como “*output*” se obtuvo una tabla con el número de metabolitos anotados a cada ruta y el *p*-valor del test de Fisher correspondiente a cada ruta.

3.6.2. Gene Set Enrichment Analysis

Mientras que PaintOmics3 realiza un tipo de enriquecimiento funcional conocido como de “sobre-representación” porque se basa en evaluar si, en nuestro estudio, las rutas están enriquecidas en metabolitos alterados por la HA, los análisis de enriquecimiento del tipo “Gene Set Enrichment Analysis” no requieren una selección previa de los metabolitos con cambios significativos entre las condiciones comparadas, sino simplemente el valor del estadístico que estime dicho cambio para cada metabolito.

Para aplicar esta segunda estrategia se utilizó la librería de R “*mdgsa*” (Montaner y Dopazo, 2010) disponible en Bioconductor (Gentleman *et al.*, 2004) que ajusta un modelo de regresión logística para cada ruta tomando el estadístico que estima el cambio en los niveles metabólicos como variable explicativa y como variable respuesta binaria la pertenencia o no de cada metabolito a la ruta testada. Aquellas rutas con modelos estadísticamente significativos son las que se consideran enriquecidas en los metabolitos que presentan cambios entre condiciones. En nuestro caso, el estadístico utilizado para indicar la magnitud del cambio entre condiciones fue el valor absoluto de los coeficientes de regresión del modelo PLS-DA, transformado adecuadamente según las recomendaciones de la librería “*mdgsa*”. Por otra parte, se utilizó la función “*annotMat2list*” de esta misma librería para convertir el fichero de anotación funcional en una lista en la que cada elemento corresponde a una ruta biológica y contiene el nombre de los metabolitos que participan en esta vía. Se descartaron para el análisis aquellas rutas metabólicas que contenían menos de 5 metabolitos ya que se consideran bloques funcionales demasiado pequeños para el análisis estadístico. Esta metodología se aplicó para cada uno de los 5 tejidos tanto con la anotación y los pathways de KEGG como con la anotación de CHEBI y las rutas metabólicas de Reactome.

3.7. MÉTODOS DE INTEGRACIÓN DE DATOS

Las metodologías descritas anteriormente se han aplicado de forma independiente sobre los datos de cada uno de los tejidos. Para relacionar los distintos tejidos entre sí de forma integrativa, se aplicó el modelo de regresión multivariante basado en variables latentes PLS (Ver apartado “3.4.2. *Análisis Discriminante de Regresión por Mínimos Cuadrados Parciales (PLS-DA)*”). En concreto, se buscaba entender las conexiones entre los metabolitos en plasma y los metabolitos en CBLO, para tratar de identificar en plasma posibles biomarcadores de alteraciones en el CBLO, que pudieran explicar el deterioro cognitivo producido por la HA.

Así pues, se utilizaron los datos de PL4W como matriz explicativa **X** en el modelo PLS, mientras que la matriz respuesta **Y** correspondía al valor de los metabolitos con cambios significativos para CBLO. Se ajustó el modelo seleccionando el número de componentes necesarias para observar una separación clara entre los grupos HA y control, y se seleccionaron los metabolitos más relevantes para el modelo en **X** e **Y** a partir de sus pesos (*weights*).

Por último, se creó una red de co-regulación de metabolitos con los metabolitos seleccionados. Para ello, se calculó el coeficiente de correlación de Pearson entre los metabolitos seleccionados de ambos tejidos y se eliminaron las conexiones entre pares de metabolitos con correlación inferior a |0,6|. Los metabolitos seleccionados en ambos tejidos y sus conexiones se representaron en forma de red mediante el software Cytoscape (Shannon *et al.*, 2003).

La Figura 2 resume todos estos procedimientos que se han explicado en este apartado con el objetivo de mejorar la comprensión del flujo de trabajo al lector.

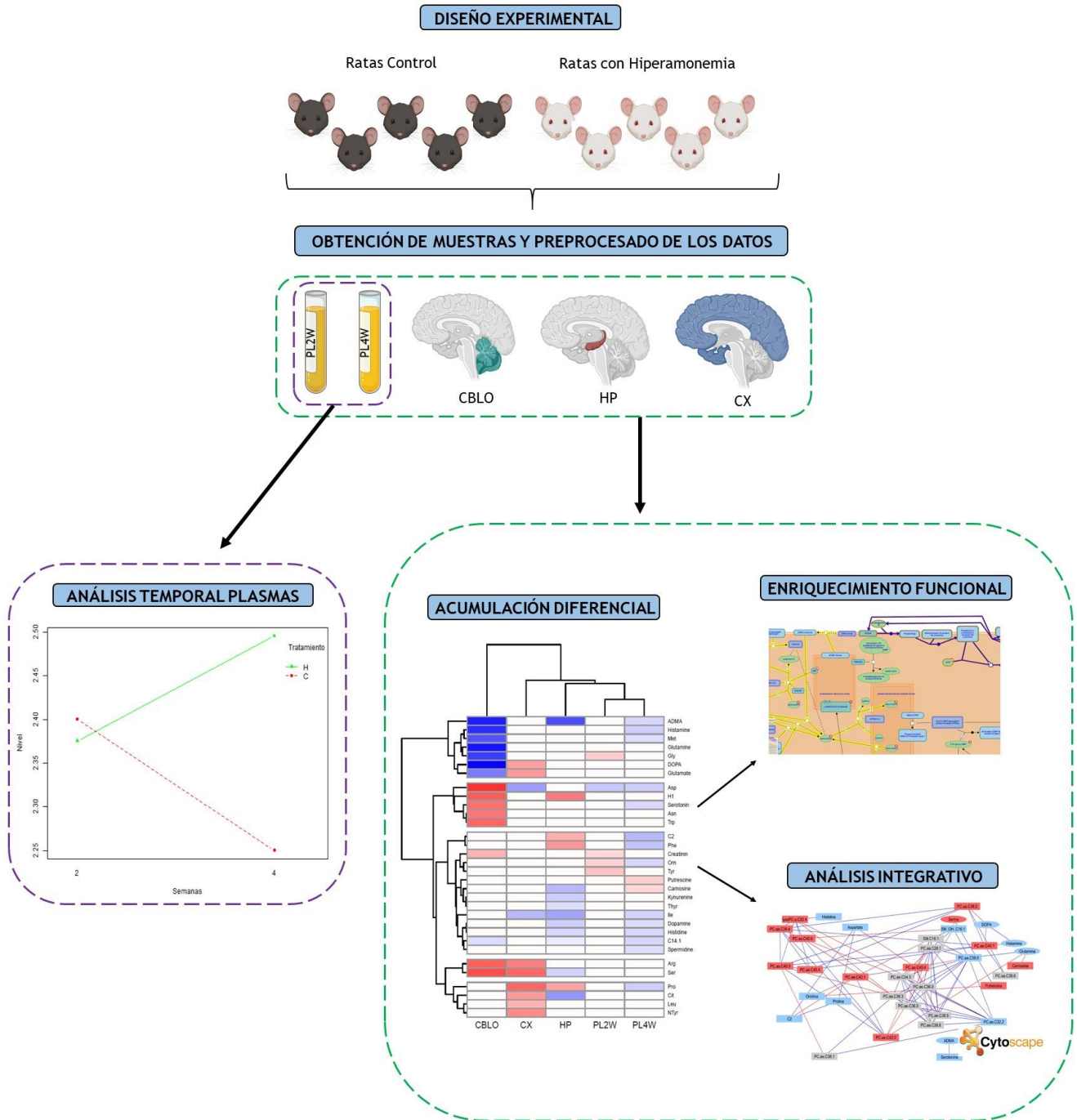


Figura 2. Flujo de trabajo llevado a cabo en este estudio. Se obtuvieron datos metabolómicos de plasmas (PL2W y PL4W) y de CBLO, CX e HP de 16 ratas (8 control y 8 con HA). Se realizó un análisis de acumulación diferencial en cada uno de los tejidos. Posteriormente se estudiaron las rutas enriquecidas en los metabolitos diferencialmente acumulados y se realizó un análisis integrativo entre el plasma y los tejidos del encéfalo. Además, con los datos de plasma se realizó un análisis para conocer qué metabolitos cambiaban a lo largo del tiempo y de condiciones (Control/HA).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. PREPROCESAMIENTO DE DATOS

Las matrices iniciales de datos metabólicos en cada tejido contenían las concentraciones de 180 metabolitos: 14 aminas biogénicas, 21 aminoácidos, 14 esfingomielinas, 90 glicerofosfolípidos, 40 acilcarnitinas y 1 monosacárido. En primer lugar, se realizó un estudio de valores faltantes y se eliminaron aquellos metabolitos que presentaban más del 20% de valores faltantes. Un total de 118 metabolitos superaron el filtro. Sin embargo, pese a tener un porcentaje de valores faltantes superior al límite establecido se añadieron al análisis los metabolitos creatinina, tirosina, citrulina y triptófano, por estar relacionados con la EHM. Por lo que en total se trabajó con 122 metabolitos. En la figura suplementaria 1 del anexo se muestra la distribución de los valores faltantes, antes y después de realizar el filtro.

Los valores faltantes se imputaron mediante el algoritmo “*mice*” y posteriormente se realizó una transformación logarítmica de los datos debido a que presentaban distribuciones muy asimétricas con casi todos los valores muy bajos y unos cuantos extremadamente altos. A continuación, se probaron tres estrategias de normalización diferentes para hacer comparables las distintas muestras (ratas): normalización por la mediana, por cuantiles y con el método VSN. Se escogió normalizar por la mediana debido a que es el método de normalización que obtuvo una mejor separación de las muestras en función del grupo al que pertenecen: Control o HA. En la Figura 3 se muestran los diagramas de cajas y bigotes para cada muestra de CBLO antes y después de realizar la transformación logarítmica y la normalización por la mediana. Los gráficos para el resto de tejidos se encuentran en la figura suplementaria 2 del anexo. Además, con este procedimiento, no se fuerza a que las distribuciones sean exactamente iguales como en la normalización por cuantiles.

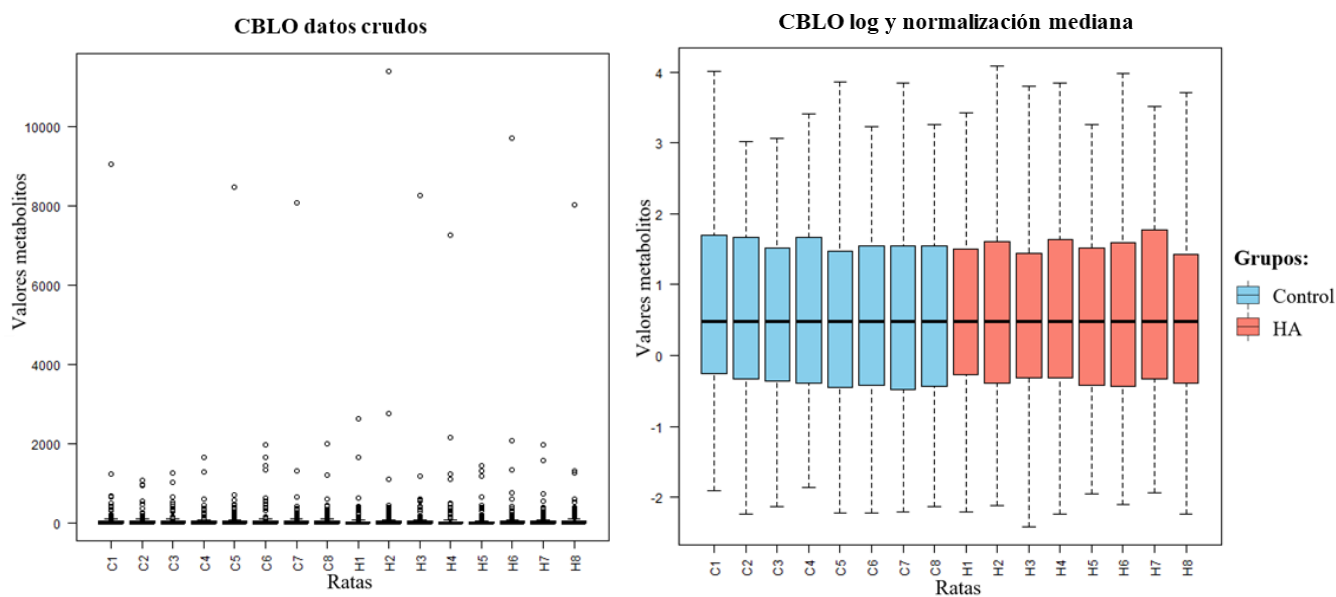


Figura 3. Diagramas de caja y bigotes de valores correspondientes a muestras de CBLO. A la izquierda se muestran los datos crudos y a la derecha los datos después de realizar la transformación logarítmica y la normalización por la mediana. **C**, control; **H**, HA.

4.2.EFECTO DE LA HA CRÓNICA EN CADA TEJIDO

4.2.1. Acumulación diferencial

Uno de los principales objetivos de este proyecto es encontrar cambios en la concentración de los metabolitos en respuesta a la dieta rica en amonio, para posteriormente determinar su posible relación con la EHM. Para ello, se aplicaron dos estrategias diferentes para el análisis de cada matriz de datos normalizada: modelos lineales y métodos de clasificación multivariantes de reducción de la dimensión (PLS-DA).

En la primera estrategia se utilizó la librería de R “*limma*” (Ritchie *et al.*, 2015). Se generó un modelo lineal para cada metabolito, en el que su concentración en cada muestra era la variable respuesta y el grupo (Control/HA), la variable explicativa. Se seleccionaron como metabolitos diferencialmente acumulados, es decir, con cambios estadísticamente significativos entre ambos grupos de ratas (Control e HA), aquellos compuestos cuyo coeficiente de regresión asociado al factor grupo tenía un p -valor inferior a 0,05 y, como filtro adicional, presentaban un $|\logFC| \geq 0,2$. Los resultados de este análisis se recogen en la tabla suplementaria 1 del anexo, en la que se puede observar que esta metodología no logró capturar los metabolitos diferenciales entre las dos condiciones estudiadas, debido probablemente a la alta variabilidad observada dentro de cada grupo unida al reducido tamaño muestral. La alta variabilidad podría ser debida a diversos motivos como posibles efectos de lote o “batch effect” no determinados: separación de las ratas en jaulas, hora de alimentación antes de la extracción del plasma, peso de las ratas etc. En cualquier caso, no fue posible determinar las causas de dicha variabilidad, por lo que no se pudieron corregir los datos para reducir este ruido adicional.

Por todo ello, se optó por aplicar una técnica de reducción de la dimensión supervisada (PLS-DA), ya que este tipo de metodologías manejan mejor el ruido de los datos. La Figura 4 muestra los gráficos de *scores* del PLS-DA para las dos primeras componentes de muestras correspondientes a CBLO y PL4W de ratas sometidas a una dieta rica en amonio (H) o una dieta normal (C). Los gráficos PLS-DA para el resto de tejidos se muestran en la Figura suplementaria 3 del anexo.

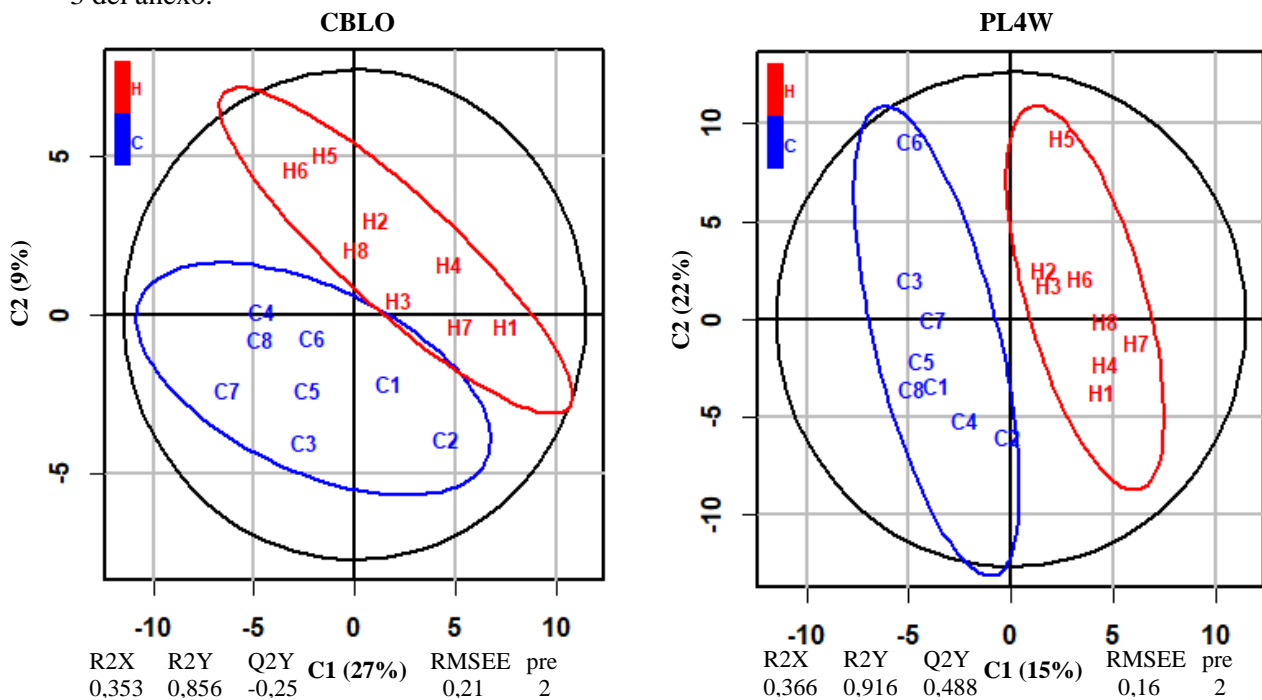


Figura 4. Gráfico de *scores* del modelo PLS-DA para las dos primeras componentes. A la izquierda se muestra el PLS-DA para CBLO y a la derecha para PL4W. C, control; H, HA; C1, primera componente; C2, segunda componente. Entre paréntesis, el porcentaje de varianza de los datos metabólicos explicado por cada componente.

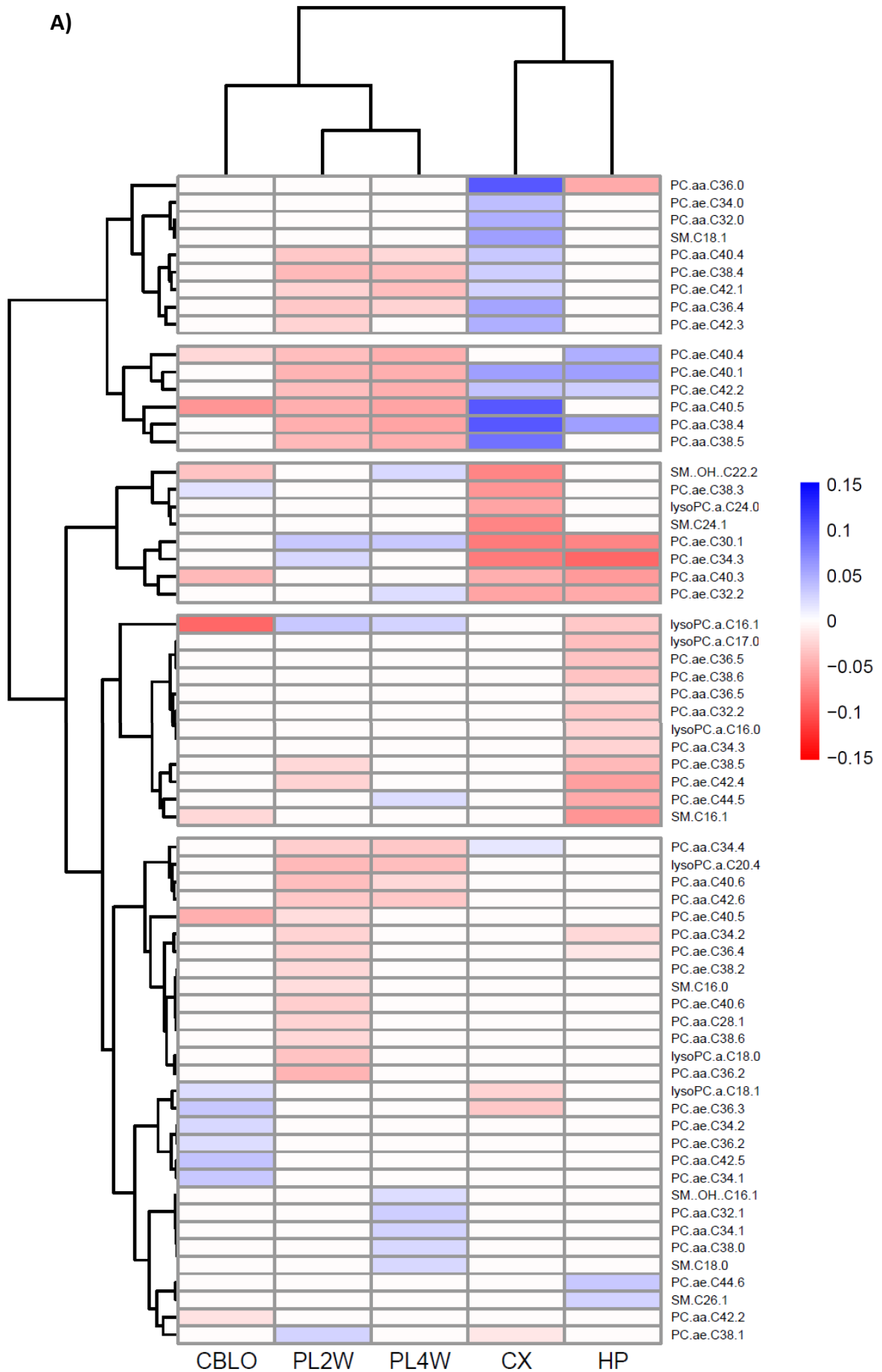
Como se puede observar, las dos primeras componentes separan perfectamente los dos grupos de ratas, de hecho, en el caso de las muestras de PL4W solo la primera componente ya indica una perfecta separación. En cada tejido, se determinó el número de componentes necesario para la separación de ambos grupos de ratas y se obtuvieron los valores de VIP y los coeficientes de regresión para dicho número de componentes. Finalmente, se seleccionaron los metabolitos con cambios significativos como aquellos con un VIP >1 y cuyo intervalo de confianza al 95% para el coeficiente de regresión obtenido por el método de remuestreo Jackknife, no contuviera el valor 0. En todos los tejidos se observaron metabolitos con cambios significativos entre las dos condiciones estudiadas: en CBLO, 31 metabolitos; en CX, 36; en HP, 39; en PL2W, 36 y en PL4W, 40 (Tabla 1).

Tabla 1: Número de metabolitos con cambios significativos en HA con el método PLS-DA.

		RP^(a)	RN^(b)	Total	Porcentaje^(c)
Coeffβ^(d)	CBLO	26	22	48	36,86%
	CX	39	36	75	61,48%
	HP	25	59	84	68,85%
	PL2W	18	51	69	56,57%
	PL4W	62	29	91	74,60%
VIP^(e)	CBLO	23	25	48	39,34%
	CX	17	21	38	31,15%
	HP	23	25	48	39,34%
	PL2W	5	31	36	29,51%
	PL4W	24	16	40	32,79%
Coeffβ \cap VIP^(f)	CBLO	15	16	31	25,41%
	CX	17	19	36	29,51%
	HP	16	23	39	31,97%
	PL2W	5	31	36	29,51%
	PL4W	24	16	40	32,79%

^(a)Regulación positiva, mayor concentración en HA; ^(b)Regulación negativa, menor concentración en HA; ^(c)Porcentaje de metabolitos con cambios significativos entre ambas condiciones con respecto al total; ^(d)Metabolitos que no contienen el valor 0 en el estudio del intervalo de confianza de los coeficientes de regresión; ^(e) Metabolitos con VIP >1; ^(f)Metabolitos que cumplen con los criterios VIP y de coeficiente de regresión.

En la Figura 5 se muestra un mapa de calor que resume los resultados del análisis de acumulación diferencial para cada tejido y metabolito seleccionado, agrupados en esfingomielinas y glicerofosfolípidos (Figura 5A) y aminoácidos, aminas biogénicas, monosacáridos y acilcarnitinas (Figura 5B). A continuación, se discute la relación de algunos de los metabolitos seleccionados con la HA crónica y la EHM.



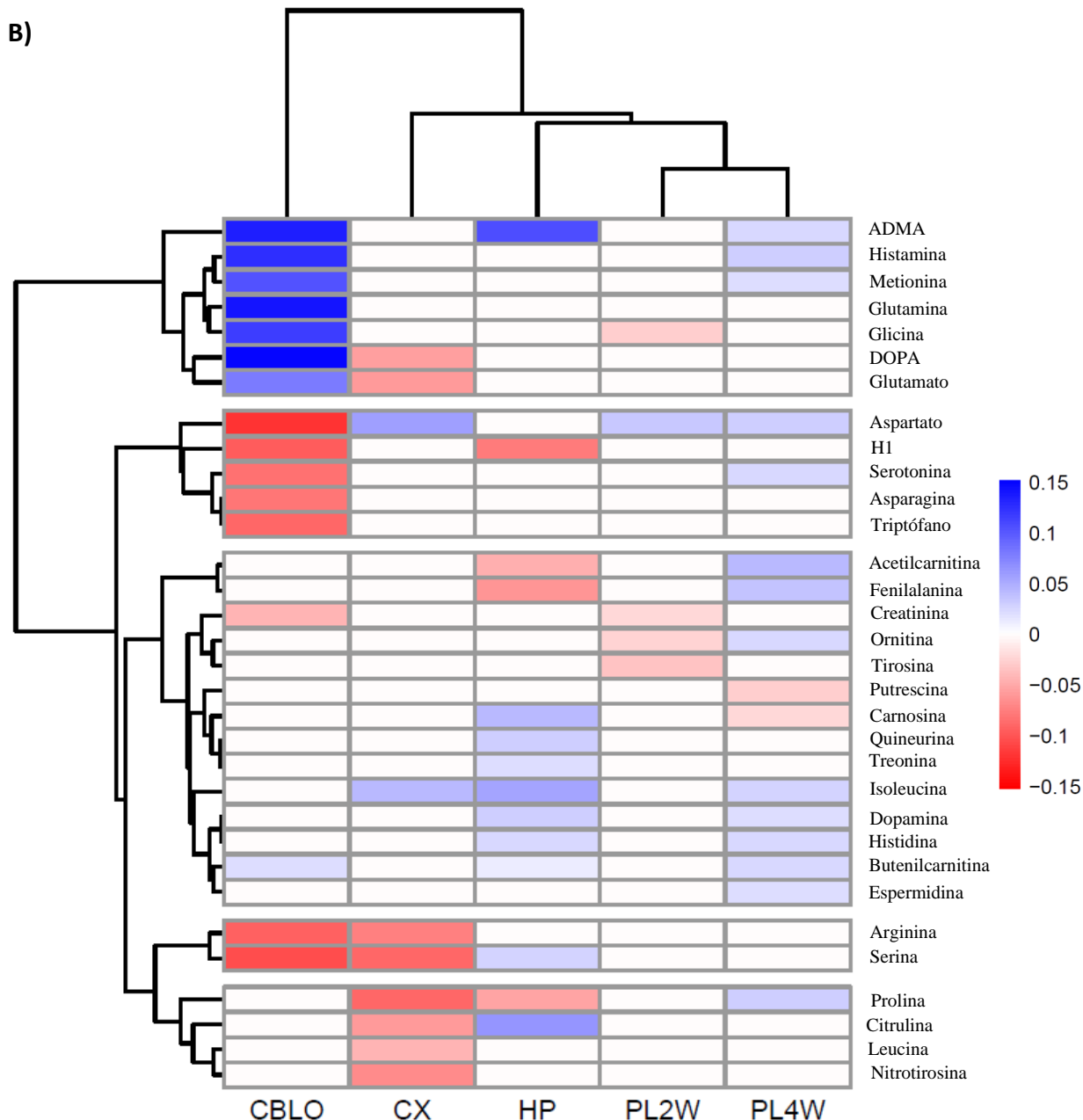


Figura 5. Mapa de calor de los metabolitos con cambios significativos por tejidos. A) Mapa de calor de esfingomielinas y glicerofosfolípidos. B) Mapa de calor de aminoácidos, aminas biogénicas, monosacáridos y acilcarnitinas. En **blanco** sin cambios significativos entre control e HA; en **rojo** niveles más bajos en HA y en **azul**, niveles más altos. Las distintas tonalidades de color se asocian con la magnitud del cambio de las concentraciones de los metabolitos entre ambas condiciones. El orden de los tejidos en el gráfico se establece en función de la similitud de perfil metabólico. Los lípidos se describen con la notación "Cx: y", donde **x** denota el número de carbonos en la cadena principal e **y** el número de dobles enlaces. **PC**, fosfatidilcolina; **lysoPC**, lisofosfatidilcolina; **SM**, esfingomielina.

Glutamina, glutamato y aspartato

En la figura 5B se muestra que la glutamina se encuentra significativamente elevada en CBLO en HA, pero no en el resto de tejidos. Estos resultados concuerdan con otros estudios que han reportado un aumento de glutamina en cerebro en condiciones de HA y de EH, tanto en humanos (Weiss *et al.*, 2016) como en modelos animales (Ratnakumari *et al.*, 1994; Cudalbu *et al.*, 2012; Cabrera-Pastor *et al.*, 2019). El amonio se produce en todos los órganos del cuerpo, pero solo el hígado tiene el conjunto completo de enzimas para detoxificarlo en forma de urea (Walker, 2014).

El resto de tejidos extrahepáticos (incluido el cerebro), tanto en condiciones normales como de HA, eliminan el amonio incorporándolo a la glutamina mediante la acción de la glutamina sintetasa (Cooper *et al.*, 1979; Walker, 2014). Por tanto, al haber una mayor cantidad de amonio, los niveles de glutamina aumentan con respecto al control como mecanismo del CBLO para detoxificar el amonio. A pesar de que la glutamina tiene un papel detoxificante al captar amonio, también está relacionada con efectos negativos en la EH. Su acumulación en los astrocitos provoca un desequilibrio osmótico que se asocia con estrés oxidativo, inflamación y aparición de síntomas neuropatológicos (Watson *et al.*, 1985; Shawcross *et al.*, 2004ab). Durante mucho tiempo se ha considerado que esta inflamación de los astrocitos era común en todos los tipos de EH (Brusilow *et al.*, 2010). Sin embargo, algunos estudios no apoyan esta idea para la enfermedad hepática crónica (Oria *et al.*, 2010; Cauli *et al.*, 2014) por lo que es un tema que aún está en debate.

También en el CBLO se advierte una mayor cantidad de glutamato, un neurotransmisor excitador del SNC. La glutamina y el glutamato son metabolitos que están estrechamente relacionados a través del ciclo de la glutamina – glutamato (Figura 6). Brevemente, la glutamina formada en los astrocitos a partir de amonio y glutamato por la glutamina sintetasa, atraviesa la célula glial y se introduce en la neurona glutamatérgica donde se transforma a glutamato y amonio por la acción de la glutaminasa. El glutamato liberado de las neuronas presinápticas se une a receptores específicos de las neuronas postsinápticas. El excedente se introduce en el astrocito para convertirse de nuevo en glutamina (mediante la acción de la glutamina sintetasa), la cual puede atravesar la BBB y verterse al torrente sanguíneo para su posterior detoxificación, o viajar de nuevo a la neurona (Felipo y Butterworth, 2002; Bak *et al.*, 2006). Debido al exceso continuo de amonio y a esta vinculación entre la glutamina y el glutamato parece lógico observar un aumento de ambos metabolitos en CBLO en condiciones de HA con respecto al control. Los estudios de Cabrera- Pastor *et al.*, (2019) respaldan los resultados obtenidos ya que demostraron que la HA produce un aumento en los niveles de glutamato, glutamina y GABA (neurotransmisor que se sintetiza a partir del glutamato) extracelular en el CBLO, en el mismo modelo animal de HA crónica utilizado en este estudio.

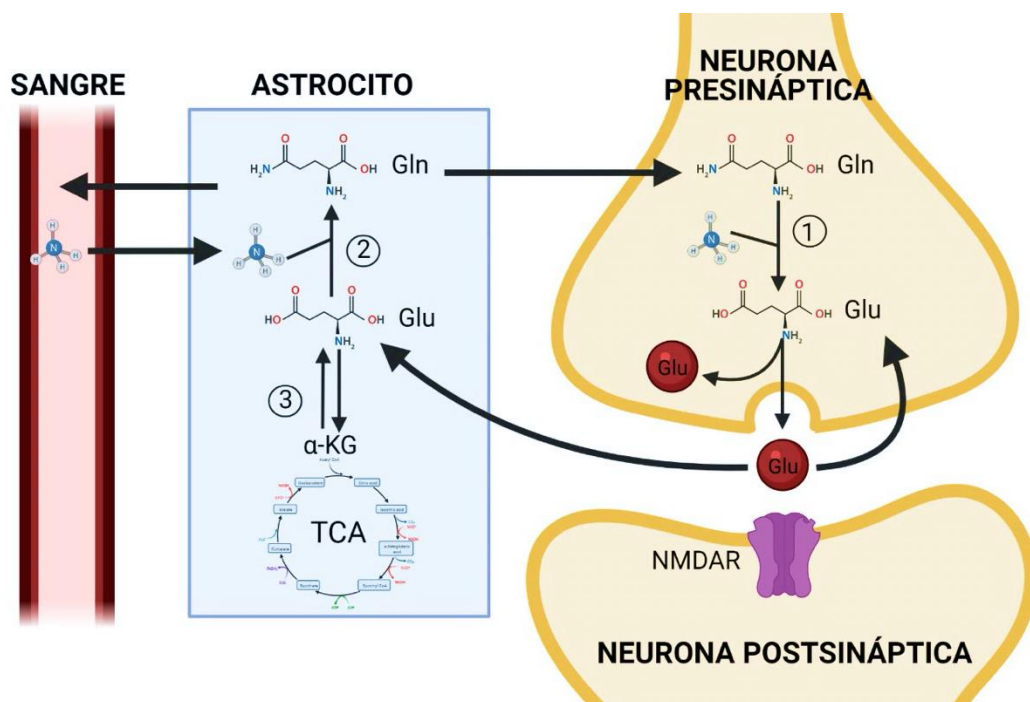
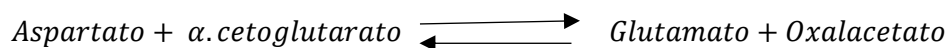


Figura 6. Esquema del ciclo de la glutamina-glutamato. Gln, glutamina; Glu, glutamato; NMDAR, Receptor NMDA; α-KG, alfa cetoglutarato; TCA, ciclo de Krebs. 1, glutaminasa; 2, glutamina sintetasa; 3, glutamato deshidrogenasa. Adaptado de Felipo y Butterworth, (2002).

Contrariamente al CBLO, en el CX el glutamato se encuentra en menor concentración en HA, aunque no se observan cambios significativos en los niveles de glutamina (Figura 5B). Esto podría ser debido a que la actividad de alguna de las enzimas que participan en este proceso se encuentra alterada en estos tejidos. La diferencia en la alteración de la neurotransmisión entre CBLO y CX por la HA ya ha sido reportada con anterioridad por Cauli *et al.*, (2009c).

Cabe añadir que el aspartato se acumula menos en CBLO, pero más en el CX en HA (Figura 5B). El aspartato no es esencial en mamíferos, y es producido a partir del α -cetogluturato por una reacción de transaminación catalizada por la acción de la enzima Aspartato Aminotransferasa (AST) mediante la siguiente reacción (McKenna *et al.*, 2000):



Luego se puede presuponer que en el CX la reacción está desplazada hacia la formación del aspartato y en CBLO hacia la producción del glutamato. Estos resultados parecen indicar que hay una desregulación en la actividad de la AST y que difiere entre estos tejidos. Por ello, sería interesante un estudio más exhaustivo de esta ruta en las diferentes regiones cerebrales y con distintas concentraciones de amonio. Además de esta ruta de biosíntesis de glutamato a partir del aspartato mediante la AST, también puede sintetizarse a partir de la glutamina con la enzima glutaminasa y, a través de la conversión de α -cetogluturato por la glutamato deshidrogenasa (McKenna *et al.*, 2000) (Figura 6). De forma que la variación observada de glutamato (reducción o aumento), además de poder deberse a la actividad de la AST, podría verse favorecida o reforzada por las otras rutas de biosíntesis de glutamato mencionadas. Para esclarecer la aportación de cada una de ellas, se podría realizar un estudio en el que se inactiven estas enzimas en el modelo animal y estudiar los productos resultantes. Así, una vez identificada la vía implicada o más afectada, se podrían estudiar los mecanismos por los que está alterada.

ADMA, citrulina y arginina

El ADMA, dimetilarginina asimétrica, es otro metabolito que presenta cambios significativos entre control e HA. En la figura 5B se observan niveles elevados de ADMA en CBLO, HP y PL4W. Previamente, otros autores han observado un aumento de ADMA en distintas condiciones como el envejecimiento (Kielstein *et al.*, 2003; Scalera *et al.*, 2004; Sverdlov *et al.*, 2014), hipertensión (Perticone *et al.*, 2005; Matsuguma *et al.*, 2006), otras enfermedades cardiovasculares (Zoccali *et al.*, 2001; Meinitzer *et al.*, 2007; Schlesinger *et al.*, 2016) e incluso en HA (Lluch *et al.*, 2004; Bajaj *et al.*, 2013). El ADMA se obtiene por la metilación de residuos de arginina por la acción de enzimas de la familia de la Proteína-Metil Transferasa, PRMT-1, siendo esta la principal enzima generadora de ADMA (Oliva-Damaso *et al.*, 2019). A su vez, la Dimetilarginina Dimetilaminohidrolasa, DDAH-I, favorece la hidrólisis de ADMA a dimetilamina y citrulina (Leiper, 2005). Debido a la relación de ADMA con la citrulina y la arginina, es necesario estudiar estos tres metabolitos conjuntamente. Asimismo, son muchos los estudios que han informado de una desregulación (tanto en humanos como en ratas) de ADMA, arginina y DDAH-I en condiciones de HA, tal y como se recoge en la revisión de Czarnecka *et al.*, (2017b). Por su parte, el ADMA actúa como un inhibidor endógeno de la Óxido Nítrico Sintasa (NOS) ya que compite con la arginina por el sitio activo de NOS (Figura 7). En efecto, Faraci *et al.*, (1995) reportaron que el 50% de la actividad de la NOS del cerebro de ratas se inhibía mediante la infusión de ADMA. Por tanto, ADMA limita la producción de Óxido Nítrico (NO), el cual es un vasodilatador endógeno que regula la perfusión del cerebro e influye significativamente en el tono de las arterias y de los vasos venosos (Iadecola, 1993).

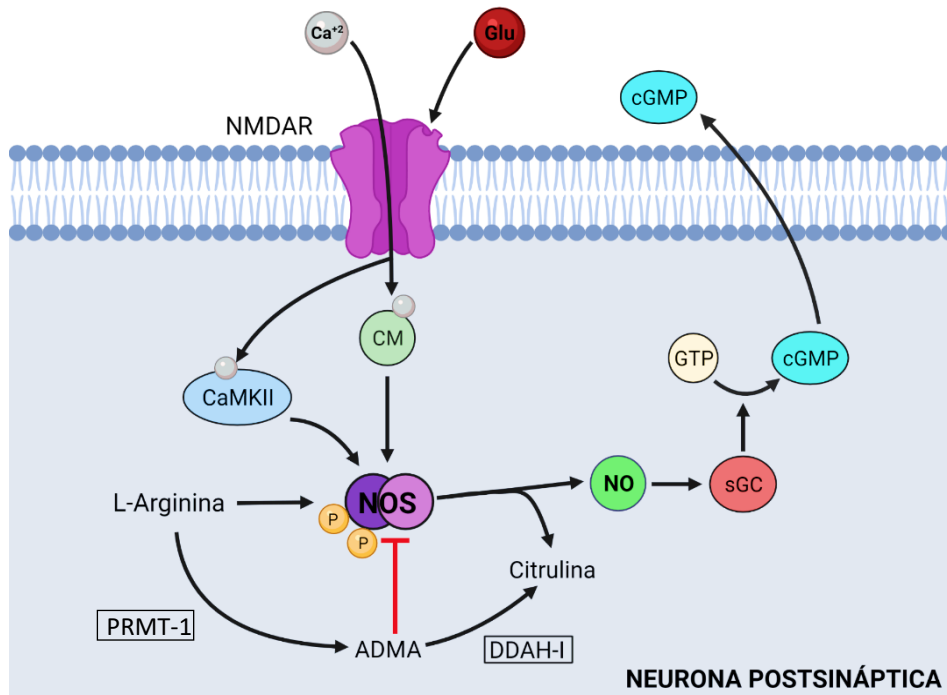


Figura 7. La HA crónica inhibe la vía NO-cGMP. En la HA crónica hay una mayor actividad de la proteína quinasa II dependiente de calcio / calmodulina (CaMKII), que unido a la calmodulina (CM), fosforila (P) la NOS en Ser847, reduciendo su actividad y formación de NO. Esto da como resultado una menor activación de la guanilil ciclasa soluble (sGC) y una síntesis reducida de cGMP. Además, la NOS también está modulada por ADMA, la cual se obtiene de la metabolización de la L-arginina a través de PRMT-1. La enzima DDAH-I participa en el catabolismo de ADMA obteniendo como resultado citrulina. Adaptado de Felipo, (2013).

Concretamente en este estudio, el nivel de ADMA está elevado en CBLO (Figura 5B), mientras que el de arginina está disminuido (no hay cambios significativos para la citrulina). Esto podría indicar, por un lado, que se produce más arginina, tal vez por una actividad elevada de la PRMT-1. Sin embargo, son pocos los trabajos que han estudiado PRMT-1 en HA. Czarnicka *et al.*, (2017a) observaron que no había cambios significativos en la expresión de PRMT-1 en CX de ratas con HA inducida por tioacetamida. También Mookerjee *et al.*, (2007) informaron de una expresión reducida de las enzimas DDAH y un aumento de PRMT-1 en hígados de hepatitis alcohólica. No obstante, no existen trabajos en los que se haya evaluado la actividad de estas enzimas en EH. Por otro lado, podría ser que, debido al efecto inhibitorio que ejerce ADMA en la NOS obligue a la arginina a catabolizarse en ADMA. Al mismo tiempo, que no se eleven los niveles de citrulina ante el aumento de ADMA podría indicar que la enzima DDAH-I no puede hacer frente a tal cantidad de ADMA. De hecho, diversos autores proponen que la principal causa de la elevación de ADMA durante la HA está relacionada con la disminución de la actividad de DDAH-I (Tain *et al.*, 2010; Balasubramaniyan *et al.*, 2012). De esta forma, se puede predecir que la actividad de la NOS va a ser mucho menor por dos motivos: 1) hay menos sustrato, arginina; 2) hay mayor cantidad de ADMA que bloquea la actividad enzimática de la NOS. Por su parte, en el CX, se encuentran niveles bajos de arginina y de citrulina, pero ningún cambio en ADMA (Figura 5B). Los niveles bajos de citrulina podrían indicar una baja actividad de la NOS por falta de sustrato (arginina). En el caso de HP, se observa niveles elevados de ADMA y citrulina en HA pero niveles normales de arginina con respecto al control (Figura 5B). Este es un caso parecido al del CBLO, en donde posiblemente haya una mayor metabolización de arginina a ADMA. Por ello y a diferencia que en CBLO, se observa un aumento de citrulina. Esto podría ser debido a que la enzima DDAH-I en HP no está alterada como sí podría estarlo en el CBLO. No obstante, para corroborar estas hipótesis se requeriría realizar estudios adicionales en el que se midan los

niveles de estos metabolitos. Pero también de NO, de dimetilamina y la expresión y la actividad enzimática de DDAH-I, NOS y PRMT-1, tanto en control como en HA en las diferentes regiones del encéfalo. Además, también sería interesante investigar otras rutas de obtención de citrulina para ver cómo contribuye cada ruta a su cantidad final. Quizá estos estudios que se proponen permitan esclarecer la relación de estos metabolitos y la actividad enzimática en EHM y explicar las diferencias observadas entre los 3 tejidos analizados.

En cuanto a las consecuencias que supone niveles altos de ADMA se encuentra la vasoconstricción producida al inhibir la NOS y por tanto, la síntesis de NO. De igual modo, la desregulación de la síntesis de NO produce alteraciones en los niveles de cGMP (Fedele y Raiteri, 1999; Madhusoodanan y Murad, 2007), lo cual según Czarnecka *et al.*, (2017b) es un denominador común de la mayoría de los síntomas que acompañan a la progresión de la HA crónica y aguda. En efecto, Erceg *et al.*, (2005ab) asociaron la disminución de la señalización de cGMP en el CBLO con disfunción cognitiva y deterioro del aprendizaje en EH. También se ha informado en ratas con Ligadura de los Conductos Biliares (BDL), que la elevación de los niveles de ADMA plasmáticos y hepáticos se correlacionó positivamente con la gravedad de la enfermedad y los marcadores de estrés oxidativo (Tain *et al.*, 2010). Por ello sería interesante estudiar el efecto que tiene ADMA sobre la producción de cGMP y relacionarlo con el estado cognitivo de las ratas con HA y con las manifestaciones clínicas propias de la EHM.

Glicina y serina

La glicina y la serina son otros metabolitos relevantes para el funcionamiento neurológico normal, que también pueden estar alterados en condiciones de HA. Por un lado, la serina es un aminoácido no esencial muy importante ya que es el precursor de otros dos aminoácidos, glicina y *D*-serina, que regulan la transmisión glutamatérgica excitadora. Estas moléculas actúan como co-agonistas del receptor de glutamato NMDA: la *D*-serina interviene sobre los Receptores NMDA (NMDAR) sinápticos facilitando la potenciación a largo plazo (Mothet *et al.*, 2000; Papouin *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2013). Mientras que la glicina actúa principalmente sobre los NMDAR extra-sinápticos (Papouin *et al.*, 2012) involucrados en trastornos neurodegenerativos y muerte celular (Hardingham y Bading, 2010). Además, la glicina actúa como neurotransmisor inhibitor a través del receptor ionotrópico de glicina.

En cuanto a la glicina, se observan niveles altos en CBLO, pero no hay diferencias significativas en HP y CX entre las ratas control e HA (Figura 5B). Previamente Cabrera-Pastor *et al.*, (2016a) reportaron que la HA altera fuertemente la neurotransmisión glicinérgica en CBLO y la modulación por la glicina de la vía glutamato-NO-cGMP. Al no observarse cambios en los niveles de glicina en HP y CX, se podría insinuar que no es necesario estudiar los efectos de este metabolito en estas áreas. Con respecto a la serina, nuestros resultados (Figura 5B) muestran niveles bajos en CBLO y CX, pero altos en HP en ratas con HA. Estos resultados sugieren que, en HA la serina podría alterar la modulación del NMDAR en las tres regiones cerebrales, pero de manera opuesta en HP con respecto a CX y CBLO. A pesar de que en la literatura no se han encontrado muchos artículos que asocien alteraciones en la concentración de serina con la HA o la EHM, sí que se ha relacionado la escasez de *D*-serina con otras patologías neurológicas como la esquizofrenia y el trastorno bipolar (Snyder y Ferris, 2000; Hashimoto *et al.*, 2005). Concretamente Basu *et al.*, (2009) informaron que los ratones modificados genéticamente que carecen de la capacidad de producir *D*-serina tienen una neurotransmisión glutamatérgica profundamente alterada. Además, observaron que presentaban anomalías de comportamiento homólogas a la de la esquizofrenia, con hiperactividad, memoria espacial deteriorada y ansiedad. Además de conocer qué efectos tiene las diferentes concentraciones de serina en los tejidos que se estudian, también sería interesante conocer cuáles son los mecanismos que regulan la producción y el metabolismo de la serina para explicar las diferencias observadas entre tejidos.

Por otro lado, en el SNC, la serina participa en la formación de fosfolípidos y de ceramidas, la columna vertebral de los esfingolípidos. Los lípidos son los compuestos orgánicos más abundantes del cerebro, representando hasta el 50% de su peso seco (Maugard *et al.*, 2020). Estos fosfolípidos son importantes en las vías de señalización de la apoptosis (Tabatabaie *et al.*, 2010). Las esfingosinas son los precursores de la esfingomielina que se encuentran en las vainas de mielina (Maugard *et al.*, 2020). La importancia de la *L*-serina en la formación de esfingolípidos fue reportada por primera vez por Mitoma *et al.*, (1998). En su estudio demostraron que la administración externa de *L*-serina era esencial para la síntesis de esfingolípidos y fosfatidilserina en neuronas cultivadas *in vitro*. Los lípidos, por tanto, constituyen un componente esencial en el funcionamiento neuronal. Nuestros resultados muestran cambios significativos en el perfil lipídico de ratas con HA tanto en los diferentes tejidos del encéfalo como en el plasma (Figura 5A). Bien es cierto, que estos cambios son diferentes entre los distintos tejidos estudiados asemejándose en mayor medida entre las muestras de plasma. Los cambios observados en los niveles de lípidos podrían indicar que la HA altera el metabolismo lipídico, pero de forma diferente en las distintas regiones del encéfalo. Recientemente, Rubio *et al.*, (2021) en su análisis multiómico advirtieron que las fosfatidilcolinas insaturadas de cadena larga, el aumento del transporte de ácidos grasos y la producción de prostaglandinas están fuertemente vinculados al plasma de pacientes con EHM. Sin embargo, el metabolismo de los lípidos y los procesos biológicos en los que intervienen es un campo aún inexplorado en HA y EHM, aunque no en otras enfermedades neurológicas como Parkinson (Miletić *et al.*, 2020), Alzheimer (Whiley *et al.*, 2014) y enfermedad de Huntington (McGarry *et al.*, 2020). Mapstone *et al.*, (2014) utilizaron el mismo kit de Biocrates que en el presente trabajo e identificaron diez lípidos de sangre periférica que predicen el deterioro cognitivo leve o la enfermedad de Alzheimer con una precisión del 90%. Entre ellos, PC.aa.C38.6 y PC.aa.C40.6 en PL2W, y PC.aa.C40.6 en PL2W y PL4W, también se redujeron significativamente en ratas con HA crónica en nuestro estudio (Figura 5A). No obstante, PC.aa.C38.0 está incrementado en PL4W en nuestro trabajo a diferencia de lo que ocurre en el estudio de Mapstone *et al.*, (2014). Recientemente, el estudio metabólico llevado a cabo por McGarry *et al.*, (2020) mostró que los defectos en el metabolismo de la serina, la glicina y el aumento de algunas fosfatidilcolinas y esfingomielinas en líquido cefalorraquídeo de pacientes con enfermedad de Huntington están relacionados con su progresión clínica. Como en el estudio de Mapstone *et al.*, (2014), los resultados obtenidos sugieren un futuro análisis con el cual se podrían correlacionar los lípidos alterados en plasma de ratas con HA crónica con las alteraciones cognitivas y motoras en estas ratas y así encontrar posibles biomarcadores de las alteraciones neurológicas en EHM.

Aminoácidos de cadena ramificada, triptófano, serotonina y quineurina

En la figura 5B se observan cambios entre Control e HA en los niveles de Aminoácidos de Cadena Ramificada (BCAA) tales como la leucina y la isoleucina, que son aminoácidos esenciales. La isoleucina se encuentra elevada en CX, HP y PL4W, mientras que se observa una disminución de leucina en CX. El aumento de los niveles de BCAA de nuestro estudio en PL4W está en contraposición con los resultados de otras investigaciones donde se observa una disminución de BCAA en plasma de pacientes con cirrosis y EHM (Jiménez *et al.*, 2010) y en ratas con HA aguda (Holecek *et al.*, 2011). De hecho, durante mucho tiempo se ha sugerido que la suplementación con BCAA podría mejorar la enfermedad. Incluso las guías de la Sociedad Europea de Nutrición Clínica y Metabolismo recomiendan el uso de suplementos enriquecidos con BCAA en pacientes con EH (Plauth *et al.*, 2006; Vilstrup *et al.*, 2014). El mecanismo beneficioso que se le asocia es que puede activar la reacción de aminotransferasa de BCAA y mejorar la desintoxicación del amonio al incorporarlo al glutamato y formar glutamina (Wagenmakers *et al.*, 1990). Sin embargo, en otros estudios se ha dudado de la eficacia de la administración de los BCAA (Alexander *et al.*, 1989; Als-Nielsen *et al.*, 2003). En la revisión de Gluud *et al.*, (2017), realizada

con datos de varios ensayos clínicos, se concluye que los BCAA tienen un efecto beneficioso en la EH, pero no tienen ningún efecto sobre la mortalidad y la calidad de vida de las personas. Además, se le han asociado efectos perjudiciales relacionados con el aumento de glutamina en el organismo, tal y como se ha argumentado previamente. De esta forma, la suplementación de BCAA es un campo en donde queda mucho por investigar y esclarecer. Dicho esto, nuestros niveles elevados de isoleucina en PL4W, podrían ser debidos a un mecanismo de compensación del organismo ante el aumento de amonio para favorecer su incorporación a la glutamina. De hecho, en situaciones de estrés, como enfermedad o ejercicio físico intenso, se produce la ruptura de las proteínas musculares, liberando BCAA (Holeček, 2001). Cabe recalcar que el modelo animal empleado son ratas que poseen HA crónica y que corresponden a las fases tempranas de la EHM. Además, en la literatura se asocia la disminución de los BCAA en plasma en modelos animales de HA aguda, no crónica y en pacientes con estadios más comprometidos de la afección. Por lo que en nuestro modelo incipiente de EHM, podría ser que las ratas compensen el exceso de amonio con una mayor conversión a glutamina para su posterior eliminación por el hígado.

En el mapa de calor (Figura 5B), se observa que los niveles de serotonina y triptófano se encuentran disminuidos en CBLO de las ratas con HA mientras que en los demás tejidos cerebrales (HP y CX) no hay cambios significativos. El triptófano (aminoácido esencial) es el precursor de la 5-hidroxitriptamina, conocida como serotonina, la cual tiene una gran influencia en una amplia variedad de trastornos motores (Kawashima, 2018) y neuroconductuales, especialmente neuropsiquiátricos. En efecto, se ha asociado a muchos trastornos psiquiátricos como ansiedad o comportamiento agresivo (Mendoza y Foundas, 2007). El triptófano también participa en la vía de la quinurenina, que está relacionada con la depresión y la esquizofrenia, y se ha demostrado que inhibe competitivamente los receptores ionotrópicos del glutamato (Muneer, 2020). Esta vía metabólica se produce también en las bacterias que constituyen la microbiota intestinal y se piensa que pueden regular la función cerebral al modular los NMDAR (Muneer, 2020). Nuestros resultados muestran un aumento del nivel de quineurina en HP en HA (Figura 5B). De esta forma, los cambios de comportamiento en pacientes con EHM (Martín-Valenzuela *et al.*, 2020) podrían ser consecuencia de alteraciones en los niveles de quineurina, serotonina y triptófano. La variación de estos dos últimos metabolitos en HA ya ha sido analizada en otros estudios. Bachmann *et al.*, 2004 comprobaron que la infusión de amonio en ratas aumenta los niveles de triptófano cerebral y el metabolito derivado de la serotonina, el Ácido 5-hidroxiindol-acético (5HIAA), pero no de serotonina. También se vio una acumulación de triptófano y 5HIAA en el tejido cerebral de ratas con HA inducida por ureasa (Felipo y Butterworth, 2002). Este aumento del 5HIAA podría explicarse por una mayor actividad de la enzima Monoamino Oxidasa (MAO), encargada de metabolizar la serotonina, tal y como se ha observado en el CBLO de ratones con HA congénita (Rao *et al.*, 1994). También se ha informado de una disminución de los niveles de serotonina y un aumento de la actividad MAO en ratas BDL, otro modelo de EH con HA (Dhanda y Sandhir, 2015). El incremento de 5HIAA y la mayor actividad de MAO en HA podrían explicar los bajos niveles de serotonina que observamos en CBLO.

No obstante, el cambio en los niveles de triptófano que hemos obtenido en CBLO (Figura 5B) no está en relación con la bibliografía anteriormente citada. A pesar de ello, se pueden justificar estos niveles bajos de triptófano en CBLO, y también de serotonina, por la relación existente entre los BCAA y los Aminoácidos Aromáticos (AAA) como el triptófano, la fenilalanina y la tirosina. Es bien sabido que los BCAA y los AAA compiten por unirse a un transportador situado en la BBB. En consecuencia, cuando aumentan los niveles plasmáticos de BCAA, también se incrementan las concentraciones de BCAA en el cerebro y disminuyen las de AAA (Fernstrom, 2005). El aumento de BCAA en plasma y su efecto en algunos neurotransmisores se ha asociado previamente a diferentes patologías. Un estudio de aleatorización mendeliana mostró que los niveles plasmáticos elevados de BCAA, en concreto la isoleucina, podrían estar asociados con la

enfermedad de Alzheimer posiblemente al modificar la señalización serotoninérgica (Larsson y Markus, 2017). De esta manera, se pueden justificar los niveles reducidos de triptófano en el CBLO (y los de fenilalanina en HP): como los niveles de isoleucina están elevados en PL4W, impide que el triptófano atraviese la BBB, observándose niveles reducidos en CBLO y por consiguiente, de serotonina. Una de las cuestiones a abordar sería medir la actividad enzimática MAO y los niveles de 5HIAA en este modelo de EHM, para saber si esta disminución de serotonina se debe solo a la falta de triptófano en el CBLO o también se debe a una actividad elevada de MAO.

Histamina

Otra amina importante es la histamina, que se encuentra elevada en HA tanto en CBLO como en PL4W (Figura 5B). Por un lado, la histamina actúa como neurotransmisor modulando el equilibrio motor, la coordinación (Li *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2016a) y la consolidación de la memoria en el CBLO (Silva-Marques *et al.*, 2016). Las alteraciones en el sistema histaminérgico en EH ya han sido reportadas en otros trabajos. Se observó que las ratas con anastomosis portocava, un modelo de EH, presentaban niveles elevados de histamina en las regiones cerebrales (Fogel *et al.*, 1991; Lozeva *et al.*, 1998). La acumulación de histamina puede contribuir a la alteración de los ritmos circadianos, el ciclo de sueño-vigilia y la actividad locomotora en la EH (Lozeva *et al.*, 2001, 2003; Spahr *et al.* 2007). Recientemente, Sergeeva *et al.*, (2020) demostraron el papel del sistema histaminérgico en la modulación de la vigilia en los trastornos de HA, lo cual puede contribuir al deterioro de la coordinación motora y de la memoria, y a cambios del ritmo circadiano en EHM. Por otro lado, la histamina también tiene una función importante tanto en los procesos inmunitarios como en las alergias. Los mastocitos son las principales células liberadoras de histamina y se consideran los primeros inductores de la activación microglial, pudiendo producir neuroinflamación y deterioro cognitivo (Dong *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2016b). En concreto, Rodrigo *et al.*, 2010 observaron que la HA crónica induce activación microglial y neuroinflamación, procesos que contribuyen a las alteraciones cognitivas y motoras que ocurren durante la EH. Por tanto, los niveles aumentados de histamina podrían contribuir a la activación microglial por HA en el CBLO.

DOPA

Otro dato sorprendente que se aprecia en la Figura 5B, es el aumento de DOPA en CBLO de ratas con HA, ya que en esta región del encéfalo no existen neuronas dopaminérgicas. Los motivos de este aumento se desconocen, así como su función biológica. Por ello, pensamos que tal vez sería útil un estudio exhaustivo de cómo varía la distribución de DOPA en el SNC en HA.

A pesar de haber identificado metabolitos con cambios significativos en todos los tejidos, se observa (Figura 5B) que las variaciones son mayores y más pronunciadas en el CBLO que en el resto de tejidos, para el caso de los aminoácidos y las aminas. Esto podría ser debido a que el CBLO es una de las áreas del encéfalo más sensible al aumento de amonio que el resto. De hecho, O'Carroll *et al.*, (1991) observaron que en los pacientes con HA existe una redistribución del flujo sanguíneo caracterizada por una reducción del mismo en las estructuras corticales y un aumento concomitante en algunas áreas subcorticales como el CBLO. También podría ser que el CBLO fuese la parte del encéfalo que primero sufre los efectos de la HA ya que, como se ha explicado anteriormente, el modelo animal utilizado simula etapas tempranas de la EHM. Corroborando los resultados de este estudio en cuanto al CBLO, Felipo *et al.*, (2014) mostraron que el flujo sanguíneo en el CBLO aumenta en pacientes cirróticos, incluso en los que no tienen EHM, y que correlaciona con alteraciones en diferentes análisis psicométricos, sugiriendo que es un marcador de alteraciones neurológicas en pacientes cirróticos, más temprano y sensible que las pruebas psicométricas utilizadas actualmente para el diagnóstico de EHM. En cuanto a los esfingolípidos y fosfolípidos, los cambios son más parecidos entre tejidos, aunque para el caso del CBLO es la

región que menos variación sufre de una condición a otra. Con respecto a la funcionalidad de los metabolitos, cabe destacar que los aminoácidos y aminos son muy relevantes en el funcionamiento del SNC y tienen una o más funciones diferentes. En cambio, los lípidos son muchos, pero con igual función los que pertenecen al mismo grupo, con lo cual realmente son 2 “metabolitos” únicos: esfingomielinas y glicerofosfolípidos. Teniendo en cuenta que los tejidos están agrupados en función de su similitud del perfil metabólico (Figura 5), pone de manifiesto que tanto CX como HP tienen unas características metabólicas más parecidas entre ellos que con el CBLO. Cauli *et al.*, 2009c ya observaron estas diferencias en HA entre CBLO y CX en cuanto a la activación del receptor GABA. La similitud en el perfil metabólico de CX e HP y sus diferencias con CBLO no son exclusivas de la HA. En su estudio metabólico no dirigido con ratones sanos, Choi *et al.*, (2018) observaron que el HP y el CX presentaban un metaboloma muy similar y que este era significativamente diferente al del CBLO.

4.2.2. Enriquecimiento funcional

Para el enriquecimiento funcional se emplearon dos estrategias diferentes. La primera mediante PaintOmics3, pero dado que se encontraron pocas rutas enriquecidas en nuestros metabolitos diferencialmente acumulados, se optó por la metodología “Gene Set Analysis” mediante la librería de R “*mdgsa*”. De esta forma, se analizaron las rutas metabólicas que se encuentran enriquecidas en los metabolitos significativamente diferenciales en cada uno de los cinco tejidos estudiados. Además, de cada uno de los tejidos se obtuvieron los resultados del enriquecimiento funcional correspondientes a los dos tipos de bases de datos de vías metabólicas empleadas: KEGG y Reactome (Tabla 2). Entre las rutas significativamente alteradas en CBLO cabe destacar la de *Interacción neuroactiva ligando-receptor*, *Transportadores ABC* (significativa en PL4W), *Transportadores transmembrana mediado por SLC* y *Transportadores de neurotransmisores dependientes Na⁺/Cl⁻*.

En primer lugar, en la vía *Interacción neuroactiva ligando-receptor* participan algunos neurotransmisores y neuromoduladores del SNC que podrían verse afectados por la HA como es el caso del glutamato. El glutamato es un neurotransmisor excitador de vital importancia para el funcionamiento normal del SNC. De hecho, se han observado cambios en su acumulación en diferentes tejidos estudiados en este trabajo (ver el punto 4.2.1. Acumulación diferencial). Estas diferencias en los niveles de glutamato entre las ratas control y las hiperamoniémicas alteran la neurotransmisión glutaminérgica (Monfort *et al.*, 2002; Cauli *et al.*, 2009b) o incluso, otras rutas metabólicas donde participa el glutamato. De hecho, el glutamato, principalmente a través de sus receptores NMDA (NMDAR), activa la vía glutamato-óxido nítrico-cGMP (Figura 7), la cual está alterada en el CBLO de ratas con HA (Hermenegildo *et al.*, 1998; Cabrera-Pastor *et al.*, 2016a).

El efecto del amonio sobre los NMDAR y las rutas que se encuentran aguas abajo, es diferente en HA aguda y crónica. En la primera, hay una sobre-activación de estos receptores lo que conduce a la activación de la vía glutamato-óxido nítrico-cGMP y, por tanto, a la formación excesiva de NO y cGMP (Cauli *et al.*, 2011). El exceso de estas sustancias, contribuyen a la muerte del animal por mecanismos excitotóxicos similares a los implicados en la isquemia cerebral (Felipo, 2013). Marcaida *et al.*, (1992) y Hermenegildo *et al.*, (1996) apuntaron que esto podía evitarse administrando antagonistas del NMDAR. Por el contrario, en la HA crónica los niveles de amonio no son lo suficientemente altos como para inducir la muerte celular y esto permite la estimulación de respuestas adaptativas que dan como resultado una función reducida de algunas vías de transducción de señales asociadas a los NMDAR (Llansola *et al.*, 2007; Felipo, 2013). Entre las respuestas adaptativas se puede nombrar la reducción de la expresión de receptores de glutamato (en CBLO) tanto ionotrópicos (Cabrera-Pastor *et al.*, 2018; Tarazona *et al.*, 2021) como metabotrópicos (Llansola *et al.*, 2005; Cabrera-Pastor *et al.*, 2012; Tarazona *et al.*, 2021). De manera que, aunque haya más glutamato extracelular en el CBLO de ratas con HA

Tabla 2. Rutas metabólicas enriquecidas en los metabolitos con cambios significativos en cada tejido.

	Ruta metabólica	<i>p</i> -valor				
		CBLO	CX	HP	PL2W	PL4W
K E G G	Metabolismo del cianoaminoácido	3,1e-04	0,24	0,83	0,96	0,42
	Biosíntesis de glucosinolatos	0,018	0,81	0,69	0,40	0,78
	Biosíntesis de aminoacil-tRNA	3,3e-05	0,07	0,67	0,58	0,40
	Biosíntesis de metabolitos secundarios vegetales	1,6e-05	0,10	0,57	0,28	0,35
	Biosíntesis de alcaloides derivados de la vía del shikimato	0,018	0,86	0,55	0,28	0,95
	Biosíntesis de alcaloides derivados de ornitina, lisina y ácido nicotínico	8,7e-04	0,18	0,55	0,65	8,9e-04
	Rutas metabólicas	6,8e-06	0,046	0,73	0,17	0,12
	Biosíntesis metabolitos secundarios	3,5e-06	0,035	0,65	0,21	0,20
	Biosíntesis de antibióticos	2,0e-05	0,066	0,61	0,49	0,32
	Metabolismo del ácido 2-oxocarboxílico	1,4e-03	0,85	0,93	0,94	0,31
	Biosíntesis de aminoácidos	9,2e-06	0,049	0,66	0,67	0,39
	Transportadores ABC	1,4e-04	0,06	0,96	0,68	0,04
	Interacción neuroactiva ligando – receptor	0,013	0,38	0,94	0,73	0,25
	Digestión y absorción de proteínas	6,4e-06	0,07	0,55	0,31	0,16
	Absorción mineral	2,6e-04	0,22	0,28	0,12	0,34
	Metabolismo central del carbono en cáncer	3,2e-05	0,07	0,67	0,58	0,40
	R E A C T O M E	Oxidaciones biológicas	0,041	0,91	0,23	0,18
Metabolismo		0,02	0,90	0,35	0,30	0,19
Metabolismo de aminoácidos y derivados		0,02	0,92	0,52	0,29	0,15
Transportadores de neurotransmisores dependientes Na ⁺ /Cl ⁻		0,043	0,18	0,91	0,32	0,51
Fase I - Funcionalización de compuestos		0,86	0,94	0,17	0,24	0,043
Transporte transmembrana mediado por SLC		0,024	0,64	0,07	0,62	0,50
Transporte de sales biliares y ácidos orgánicos, iones metálicos y aminoácidos		0,045	0,66	0,17	0,39	0,70
Transporte de moléculas pequeñas	0,024	0,64	0,07	0,62	0,50	

En rojo las rutas que tienen un *p*-valor significativo y por tanto se encuentran enriquecidas en los metabolitos diferencialmente acumulados.

crónica (Cabrera-Pastor *et al.*, 2019) la activación de la vía NMDA-NO-cGMP está disminuida, así como los niveles de cGMP, y esto induce alteraciones funcionales que llevan al deterioro en el aprendizaje y la coordinación motora. La inhibición de la actividad de la NOS por el aumento de ADMA, como hemos visto anteriormente, podría contribuir a la disminución de los niveles de cGMP. Estudios previos han observado que ciertos mecanismos se activan en HA para interferir en la actividad de la NOS. El-Mlili *et al.*, (2008) observaron un aumento de la actividad de la Proteína Quinasa dependiente de Ca²⁺/Calmodulina II (CaMKII) en ratas con HA crónica, lo cual

aumenta la fosforilación de la NOS en Ser847 reduciendo su actividad enzimática basal y, por consiguiente, la formación de NO y cGMP (Figura 7). Así pues, podría ser útil estudiar el cambio de la expresión de los NMDAR así como analizar si existe un efecto sinérgico entre ADMA y CaMKII, o cuál ejerce una mayor influencia sobre la reducción de la actividad de la NOS como mecanismo de protección frente a la muerte celular. Por tanto, la baja activación de la vía glutamato-NO-cGMP puede prevenir algunos de los efectos tóxicos que se producen por la sobre-activación de los NMDAR. Pero también reduce la función fisiológica normal de estas rutas, lo que contribuye a la aparición de algunas de las alteraciones neurológicas presentes en la HA y EHM. Por ejemplo, Erceg *et al.*, (2005ab) informaron que la reducción de la señalización de esta vía en CBLO en ratas con EH y EHM se correlaciona con un déficit en la capacidad de aprendizaje. En HP también se observó una reducción en la memoria a largo plazo dependiente de los NMDAR y deterioro del aprendizaje espacial en la prueba del laberinto de Morris (Monfort *et al.*, 2007).

La glicina, como se ha comentado anteriormente, también actúa como neurotransmisor en el SNC y participa en la ruta *Interacción neuroactiva ligando-receptor*. Zwingmann *et al.*, (2002) informaron que el aumento de la glicina extracelular en cerebro de ratas con IHA era el resultado de una disminución de su recaptación por los transportadores de Glyt-1. Estos transportadores modulan la actividad del NMDAR regulando los niveles de glicina (Wipf *et al.*, 2015). También Cabrera-Pastor *et al.*, (2016b) mostraron un efecto del cGMP extracelular en CBLO sobre los receptores de glicina, que están involucrados en la modulación de la capacidad de aprendizaje.

En segundo lugar, existen otras rutas alteradas en CBLO relacionadas con el transporte de sustancias. 1) *Transportadores ABC* (por sus siglas en inglés *ATP-binding cassette*), que también resultó significativamente alterada en PL4W. Estos transportadores dependen de ATP para el transporte de sustancias. Hay evidencia científica de que la insuficiencia hepática y la HA alteran la expresión y función de los transportadores ABC en la BBB (Aspinall *et al.*, 2011; Jin *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2014; Wu *et al.*, 2021). Aun así, estas modificaciones, tal y como mencionan en su revisión Fan y Liu, (2018), dependen del tipo de insuficiencia hepática e HA desarrollada y del tipo de transportador ABC. La mayoría de referencias citadas anteriormente son estudios en HA aguda, siendo escasos los trabajos en HA crónica. En uno de ellos, Zhou *et al.*, (2019) observaron aumentos en la expresión de la glucoproteína P (conocida como *multidrug resistance protein*) en la BBB de ratas con HA crónica. En otro estudio reciente descubrieron que el transportador de lípidos ABCA1 se encontraba regulado al alza en plasma de pacientes con EHM (Rubio *et al.*, 2021). 2) Los *Transportadores transmembrana mediada por SLC* y *Transportadores de neurotransmisores dependientes Na⁺/Cl⁻* también se ha visto que están desregulados en HA. Por ejemplo, el transportador de creatina, que está codificado por el gen SLC6A8, el cual pertenece a la superfamilia de genes que codifican los transportadores de neurotransmisores, aminoácidos y osmolitos dependientes de Na⁺/Cl⁻ se encuentra alterado en condiciones de HA (Braissant *et al.*, 2008). La creatina actúa como neuromodulador (Béard y Braissant, 2010) y se ha demostrado que defectos en el gen SLC6A8 se correlacionaron con la ausencia de creatina en el cerebro, retraso mental, epilepsia y comportamiento autista (Mancardi *et al.*, 2007; Thurm *et al.*, 2016). En nuestro caso, los niveles de creatinina, producto de la metabolización de la creatina, se encuentran bajos en CBLO de ratas con HA (Figura 5B) lo cual podría ser debido a fallos en algún transportador o a la disminución de la creatina o de su metabolización. Al mismo tiempo, Zielińska *et al.*, (2014) proponen en EH aguda el aumento de expresión del transportador LAT2, un transportador de aminoácidos, puede afectar al intercambio de arginina/glutamina a través de la membrana celular astrocítica. El aumento de este transportador también puede contribuir a las alteraciones en los niveles de arginina y glutamina en plasma y cerebro, ya que su expresión también está aumentada en células endoteliales expuestas a amonio y así podría alterar el intercambio de estos aminoácidos en la BBB. Además, este tipo de transportadores se han visto

involucrados en otras enfermedades del SNC. Precisamente, LAT1 es capaz de transportar L-DOPA, por lo que su funcionamiento en la BBB también es crucial para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson (Kageyama *et al.*, 2000). Alteraciones de este transportador podrían ser responsables del aumento de DOPA que hemos observado en el CBLO de las ratas con HA crónica. Por último, es necesario comentar que los transportadores que están en la BBB y permiten el paso de metabolitos del torrente sanguíneo general a la circulación cerebral o viceversa, sí pueden afectar a nuestros resultados. Sin embargo, los transportadores que están en las células dentro del cerebro, que modulan el contenido intra-extracelular, no nos ayudan a explicar las diferencias observadas porque en nuestro caso se ha medido el total de metabolitos en las distintas áreas del encéfalo, sin especificar la contribución intra o extra celular de cada uno de ellos.

A pesar de que hay rutas enriquecidas que presentan significación estadística, cabe comentar que muchas de ellas son rutas muy generales como *Metabolismo*, *Biosíntesis de aminoácidos*, *Metabolismo de aminoácidos y derivativo* y *Rutas metabólicas*. Otras de las vías significativas no tienen relación *a priori* con EHM ni con la HA, entre ellas se encuentran *Metabolismo central del carbono en cáncer* y *Biosíntesis de antibióticos*. Además, a la hora de generar la anotación funcional necesaria para el enriquecimiento, se presentaron varios problemas. 1) Varios metabolitos con diferentes ID de Biocrates apuntaban al mismo ID de KEGG. Este es el caso de las esfingomielinas y glicerosfolípidos. La base de datos de KEGG asocia a estos compuestos un ID general, “esfingomielinas”, ya que no distingue entre el número de carbonos, insaturaciones y su posición. En el caso de CHEBI, sí que es capaz de discernir entre las características químicas de estos compuestos, pero Reactome no les atribuye una función o una ruta metabólica específica. De hecho, este es uno de los grandes desafíos que presenta la lipidómica hoy en día: existen herramientas que permiten identificar y cuantificar con exactitud los lípidos (e incluso el número de insaturaciones) pero se desconoce en qué vías metabólicas y fenotipos intervienen (Bou *et al.*, 2010). 2) En el caso opuesto, un único ID de Biocrates corresponde a varios ID de KEGG. Por ejemplo, en el caso de los azúcares, Biocrates solo reconoce el compuesto “H1” y lo considera como la “suma de hexosas”. No obstante, dentro de este grupo existen varios compuestos de KEGG como D-glucosa, L-fructosa, L-galactosa, etc. Es por ello que no se tuvo en cuenta “H1” para el enriquecimiento funcional ya que podría sobre-estimar el efecto de algunas vías metabólicas en las que se encuentran los azúcares implicados. 3) Metabolitos (“nitrotirosina”) que tienen un ID de Biocrates pero que no tienen ID de KEGG (aunque sí de CHEBI). 4) Metabolitos (algunas acilcarnitinas) que cuyo ID corresponde a un ID de Biocrates o de CHEBI pero que no están asociados con ninguna vía metabólica. Todos estos inconvenientes que se han argumentado junto al bajo número de metabolitos del que partíamos (122), han tenido como consecuencia que solo unos pocos de ellos hayan podido asociarse a rutas biológicas (aminas biogénicas y aminoácidos), lo cual ha dificultado enormemente el análisis de enriquecimiento funcional.

4.3. ANÁLISIS TEMPORAL EN PLASMA

La metabolómica en plasma se había medido a las 2 y a las 4 semanas de inicio del estudio. Por eso, se puede hacer un análisis para identificar aquellos metabolitos que cambian a lo largo del tiempo y, además, este cambio es diferente en las condiciones Control e HA. Para ello, se calculó la diferencia entre los niveles de metabolitos a las 2 (PL2W) y las 4 semanas (PL4W). Posteriormente, se aplicó de nuevo un modelo PLS-DA a la matriz resultante con las diferencias, siguiendo el mismo procedimiento llevado a cabo en el apartado 4.2.1. Acumulación diferencial. Como resultado, se observó que un total de 41 metabolitos presentaban cambios entre ambas semanas que eran diferentes en cada grupo experimental (Tabla 3).

Tabla 3. Metabolitos con cambios diferentes entre las 2 y las 4 semanas del tratamiento en Control e HA.

	Δ HA ^(a)	Δ Control ^(b)	Total	Porcentaje ^(c)
Coefβ ^(d)	56	16	72	59,02%
VIP ^(e)	38	6	44	36,07%
Coefβ \cap VIP ^(f)	36	5	41	33,61%

^(a)Incremento mayor en HA en el tiempo; ^(b)Incremento mayor en control en el tiempo; ^(c)Porcentaje de metabolitos con cambios significativos entre ambas condiciones con respecto al total de metabolitos; ^(d)Metabolitos que no contienen el valor 0 en el estudio del intervalo de confianza de los coeficientes de regresión; ^(e) Metabolitos con VIP >1; ^(f)Metabolitos que cumplen con los criterios VIP y de coef β .

En la figura 8 se muestran algunos gráficos de interacción de los metabolitos que cambian entre ambas semanas y condiciones. Entre alguno de ellos encontramos la **isoleucina** cuyo cambio temporal es significativamente distinto en control e HA, ya que aumenta en HA y disminuye en control (Figura 8A). En el apartado 4.2.1. Acumulación diferencial, ya se ha justificado que este aumento de isoleucina podría deberse a mecanismos de compensación para hacer frente al aumento de amonio en sangre.

En el mismo sentido, la **ornitina** es otro metabolito que también presenta un cambio temporal significativamente distinto en ratas con HA y controles (Figura 8E). En la Figura 5B, se puede ver como este metabolito presenta niveles bajos en PL2W y altos en PL4W en ratas con HA con respecto al control. Tal y como se ha propuesto para el caso de la isoleucina, aquí también planteamos que el aumento observado en el tiempo de la ornitina se puede deber a un mecanismo de compensación frente al entrono hiperamonémico. Esta hipótesis la refuerza el hecho de que varios estudios han reportado el papel beneficioso de la administración de LOLA, mezcla de *L*-ornitina y *L*-aspartato, en la insuficiencia hepática y EH. Los ensayos controlados aleatorios de la administración de LOLA en pacientes con insuficiencia hepática crónica, HA y EH han resultado en reducciones en el amonio plasmático y mejores puntuaciones en las pruebas psicométricas (Staedt *et al.*, 1993; Kircheis *et al.*, 1997; Alvares-da-Silva *et al.*, 2014). Al mismo tiempo, la guía del 2014 de la Asociación Americana para el estudio de la Enfermedad Hepática y la Asociación Europea para el Estudio del Hígado recomiendan el uso de LOLA intravenoso para el tratamiento de la EH (Vilstrup *et al.*, 2014). Los mecanismos que se consideran que sustentan la reducción del amonio en sangre por LOLA incluyen la síntesis de urea y glutamina por los hepatocitos y el músculo esquelético, respectivamente (Rose *et al.*, 1998). No obstante, Jalan *et al.*, (2007) observaron que en algunos casos la reducción inicial del amonio plasmático con LOLA era solo transitoria. Tanto para el caso de la ornitina como para la isoleucina sería interesante medir los cambios de la concentración de estos metabolitos a lo largo de más semanas de administración de la dieta, con el fin de comprobar el cese de estos mecanismos de compensación con el tiempo.

La **histamina**, la **serotonina** y la **dopamina** también se encuentran en mayor cantidad en HA a las 4 semanas (Figura 8D, 88C y 8B respectivamente). En la Figura 5B, se observa que estos metabolitos presentan cambios significativos en PL4W, pero no en PL2W. Esto resulta bastante curioso por el hecho de que estos neurotransmisores también ejercen funciones importantes en el sistema inmune, tal y como se ha comentado en el apartado anterior para la histamina. En el caso de la serotonina, algunas células del sistema inmune son capaces de sintetizarla como los mastocitos (Kushnir-Sukhov *et al.*, 2007) y los linfocitos T (Chen *et al.*, 2015b). Además, las plaquetas pueden captar serotonina en sangre y liberarla en los sitios de lesión e inflamación para atraer otras células inmunitarias innatas, como los neutrófilos (Duerschmied *et al.*, 2013). Asimismo, también se la ha visto involucrada en enfermedades no neurológicas. Por ejemplo,

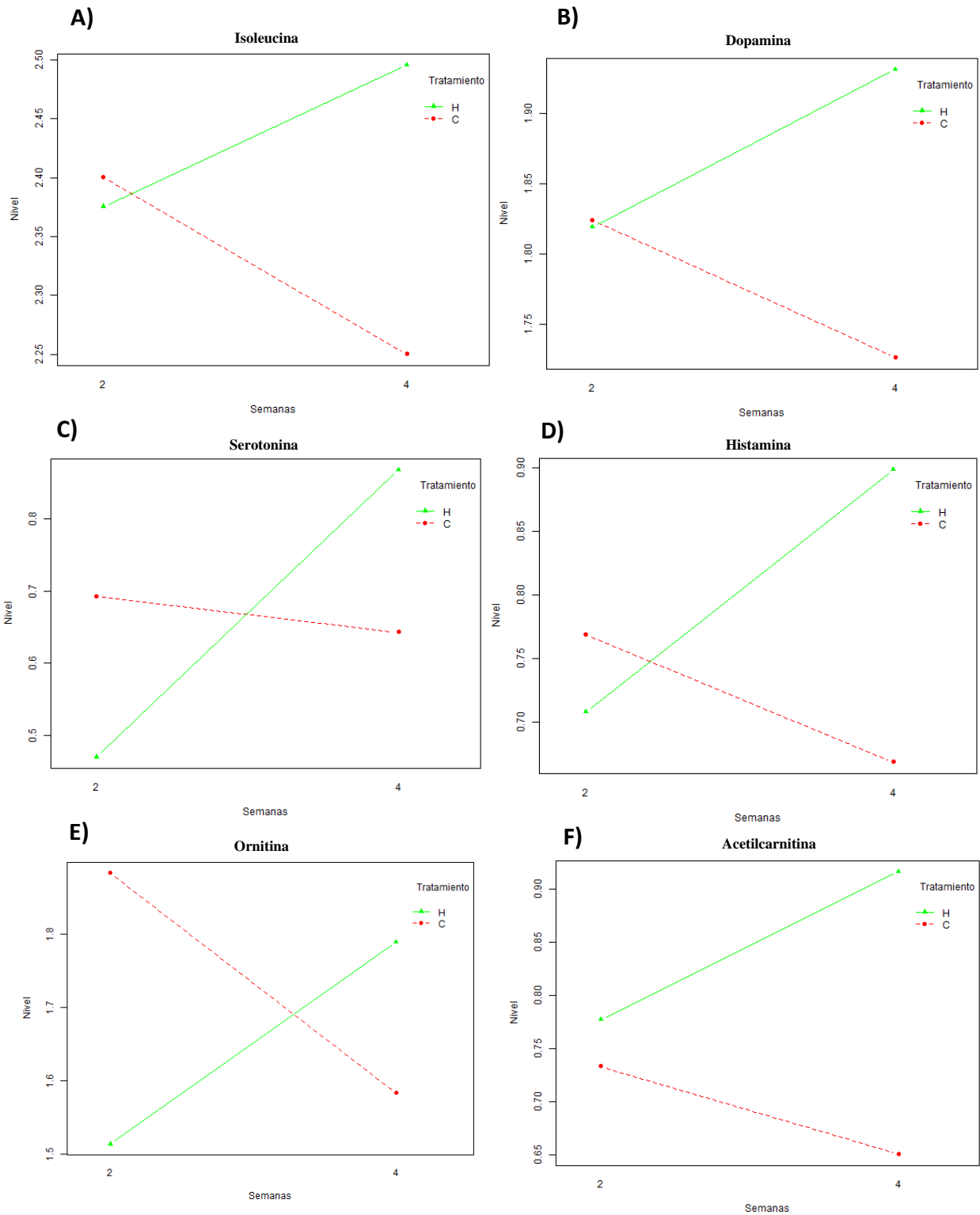


Figura 8. Gráficos de interacción de A) Isoleucina, B) Dopamina, C) Serotonina, D) Histamina, E) Ornitina y F) Acetilcarnitina entre control e HA y entre 2 y 4 semanas de dieta hiperamonémica. En el eje de abscisas se representa la semana 2 y 4 de recogida de plasma de las ratas. El eje de ordenadas muestra los niveles de metabolito. C, control; H, HA.

recientemente, Yabut *et al.*, (2020) propusieron que la inhibición de la síntesis de serotonina en mastocitos podría representar un enfoque terapéutico para el tratamiento de la obesidad y la resistencia a la insulina. Con respecto a la dopamina, se sabe que muestra efectos reguladores complejos sobre las respuestas inmunes tanto en el cerebro como en la periferia (Matt y Gaskill, 2019). Al igual que la serotonina y la histamina, también existen células inmunes que sintetizan y almacenan dopamina como las células T (Cosentino *et al.*, 2007), monocitos/macrófagos (Marino *et al.*, 1999; Flierl *et al.*, 2009), eosinófilos (Withers *et al.*, 2017) y los mastocitos (Rönnberg *et al.*, 2012). Además, los cambios en las concentraciones de dopamina podrían influir en la disfunción de las células inmunes en varios estadios de enfermedad, incluida la enfermedad de Parkinson, la esclerosis múltiple, la enfermedad inflamatoria intestinal, etc. (Matt y Gaskill, 2019). Paralelamente, Nakano *et al.*, (2011) observaron que la dopamina liberada por las células dendríticas agrava la inflamación sinovial en la artritis reumatoide. Con todo ello, se justifica el papel que tienen la histamina, la serotonina y la dopamina en el sistema inmune y por tanto, se propone que el aumento de estas aminas en plasma podría ser debido a una respuesta del sistema inmune ante el aumento de amonio en sangre. De hecho, Balzano *et al.*, (2019) han demostrado que la HA crónica induce inflamación periférica. No obstante, se requieren más investigaciones con el objetivo de dilucidar los cambios que se producen en el sistema inmunitario en condiciones de HA y los mecanismos implicados, lo cual podría llevar a descubrir nuevas dianas terapéuticas para prevenir la inflamación periférica que contribuye a la neuroinflamación y a las alteraciones neurológicas en EHM.

La **carnitina** es importante para introducir ácidos grasos en la mitocondria y proveer así de acetil-Coenzima A (acetil-CoA) al ciclo de Krebs. La unión de glutamato y acetil-CoA para formar N-acetil-glutamato es uno de los pasos del ciclo de la urea (Figura 9). Por ello, en el hígado la carnitina influye en los niveles de amonio al modular la utilización de glutamato en el ciclo de la urea y así desplazar la reacción de la formación de glutamina a partir de glutamato y amonio (Ando *et al.*, 2017). La literatura ha descrito una deficiencia de carnitina en modelos de HA debida a deficiencias de enzimas del ciclo de la urea (Ratnakumari *et al.*, 1995). También se ha estudiado ampliamente la suplementación con carnitina o acilcarnitinas para mejorar alteraciones cerebrales asociadas a la HA y EH (Ratnakumari *et al.*, 1995; Sato *et al.*, 2020). En este estudio hemos encontrado un aumento de algunas acilcarnitinas en el tiempo en HA (Figura 8F). En la caracterización de este modelo de HA crónica ya se observó un aumento de acilcarnitinas en hígado (Miñana *et al.*, 1989). Este aumento en el tiempo también podría deberse a un mecanismo compensatorio para disminuir los niveles de amonio. De hecho, se ha descrito que la HA crónica previene la muerte por intoxicación aguda de amonio, probablemente por los mecanismos de adaptación y protección que se han activado por la HA crónica (Felipo *et al.*, 1998).

Pese a los cambios observados entre condiciones y tiempo de algunos de los metabolitos en HA, cabe destacar que los gráficos de interacción muestran variaciones en los niveles algunos metabolitos en el tiempo correspondientes a las ratas control. En teoría son ratas que están expuestas a las mismas condiciones ambientales y con la misma dieta, por lo que no se deberían observar estos cambios en el grupo control. Esto sugiere, que puede haber algún factor desconocido que ha influido en el análisis. Por otro lado, en este estudio hemos visto que hay varios metabolitos que cambian en ratas con HA a lo largo del tiempo (Figura 8). También en la Figura 5B se puede observar que hay más aminoácidos y aminas con cambios significativos en PL4W que en PL2W. El hecho que los metabolitos cambien en ratas con HA a lo largo del tiempo no es una novedad ya que se está trabajando con un modelo de HA crónica, de manera que conforme pasa el tiempo, las alteraciones que se producen como consecuencia de la HA se hacen cada vez más evidentes. Estos cambios entre 2 y 4 semanas de dieta, también fueron descritos por

Balzano *et al.*, (2020), donde observaron cómo se instaura y progresa la neuroinflamación crónica en el tiempo.

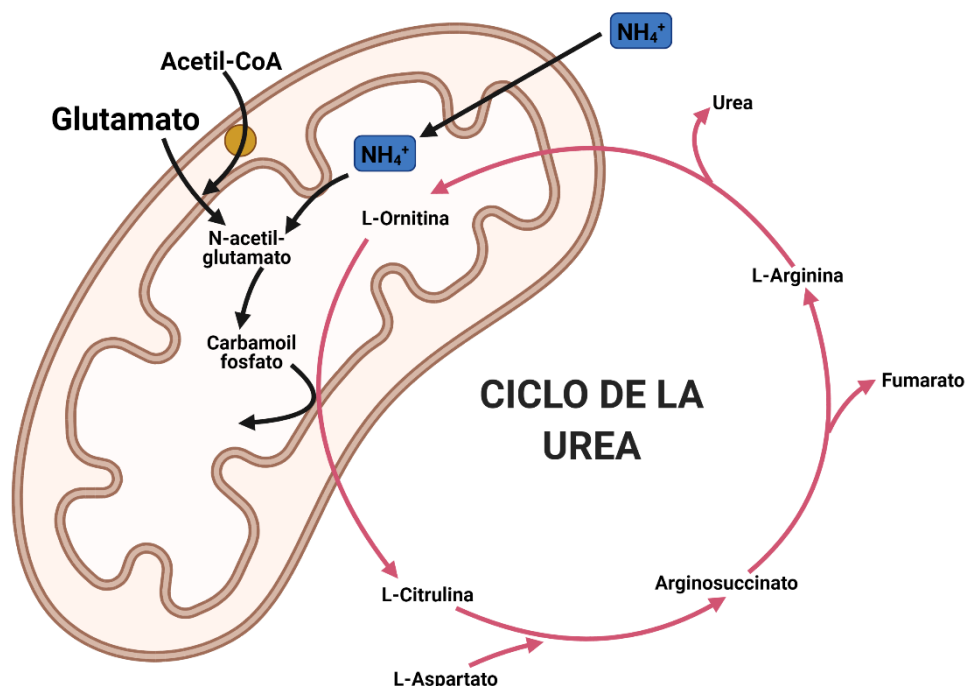


Figura 9. Interacción de la carnitina con el ciclo de la urea. La carnitina (punto amarillo) que se encuentra en el espacio inter-mitocondrial, permite la entrada de acetil-CoA al interior de la mitocondria. La acetil-CoA y el glutamato forman el N-acetil-glutamato, el cual incorpora a su estructura el amonio que ha entrado en la mitocondria para dar lugar al carbamoil fosfato. Este último reacciona con la L-ornitina para formar L-citrulina que ya sale al exterior de la mitocondria para continuar con el ciclo y obtener como producto final urea. Adaptado de Ando *et al.*, (2017).

4.4. ANÁLISIS INTEGRATIVO DE CEREBELO Y PLASMA

En este apartado, se aplicó un modelo de regresión multivariante PLS con el objetivo de encontrar metabolitos en PL4W que estuvieran asociados a metabolitos con cambios significativos en diferentes áreas del encéfalo, de forma que los primeros se pudieran utilizar como marcadores de daño cerebral o deterioro cognitivo. En concreto, se realizó este análisis en CBLO puesto que es la región en la que se hallaron más cambios (y de mayor intensidad) debidos a la HA en la concentración de aminos y aminoácidos y porque es el único tejido en el que se encontraron rutas enriquecidas en los metabolitos alterados. Otro motivo es que, tal y como hemos sugerido anteriormente, mantenemos nuestra hipótesis de que tal vez sea el CBLO el área que primero se vea afectada ante el aumento de amonio en sangre. En efecto, al estudiar la circulación cerebral observamos que las arterias vertebrales y basilares irrigan el tronco del encéfalo, el CBLO, la corteza cerebral posterior y el lóbulo temporal medial. Seguidamente, las arterias cerebrales posteriores se bifurcan desde la arteria basilar para irrigar entre otros el HP (Bouthillier *et al.*, 1996). Por tanto, en nuestro estudio, el CBLO sería la primera zona de paso de sangre y por consiguiente del amonio. Cabe indicar que el CX también es una de las primeras áreas cerebrales irrigadas, pero comprende una región mucho más grande y más heterogénea.

Así pues, se utilizaron los datos de metabolómica en PL4W como matriz predictora **X** en el modelo PLS y los de CBLO como matriz respuesta **Y**. Se seleccionaron dos componentes porque, especialmente la segunda, separaba perfectamente los dos grupos de ratas. En el gráfico de *scores*

(Figura 10A) se observa que la segunda componente es la que mejor separa los grupos HA y control. Por tanto, se seleccionaron el 25% de metabolitos de plasma y de CBLO con *weights* (Figura 10B) más elevados en esta segunda componente, ya que son los metabolitos de cada tejido más relacionados entre sí y también más relacionados con la HA. Por último, se representó una red de co-regulación de los metabolitos mediante el software Cytoscape (Figura 11). Para ello, se calculó el coeficiente de correlación de Pearson entre los metabolitos seleccionados de ambos tejidos y se eliminaron las conexiones entre aquellos pares de metabolitos con una correlación inferior a 0,6 en valor absoluto.

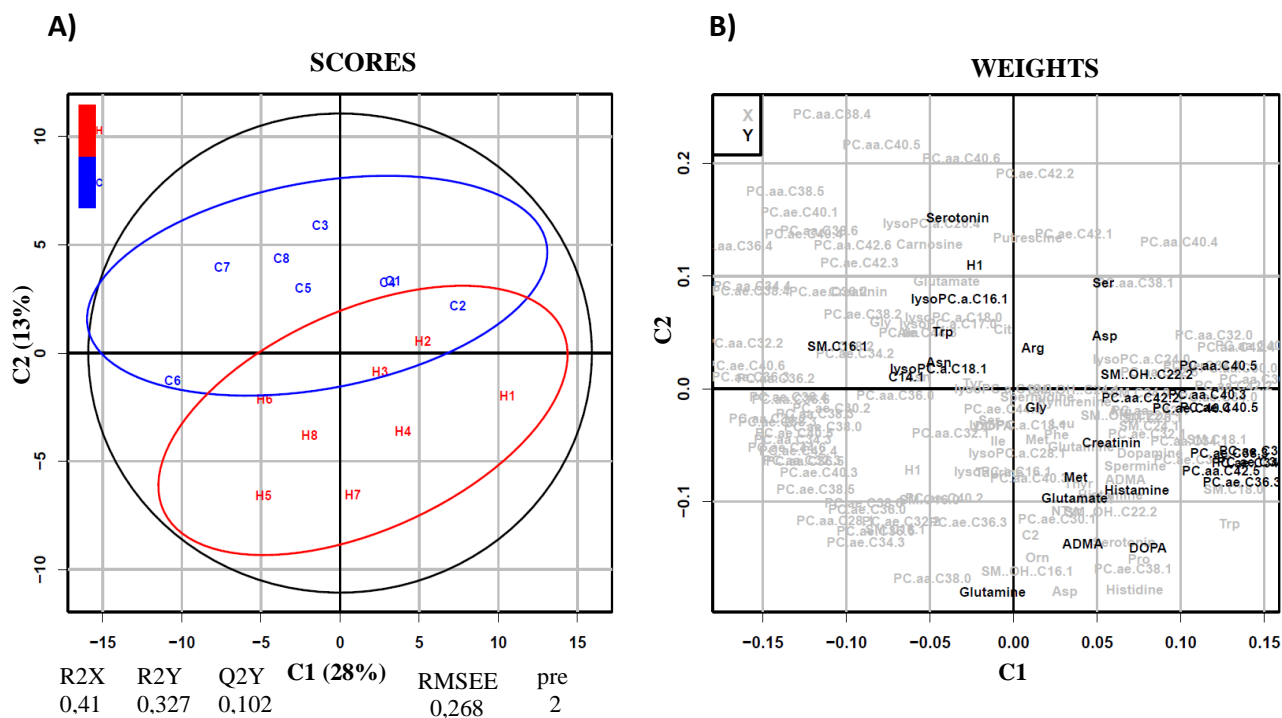


Figura 10. Modelo PLS entre CBLO y PL4W. A) Gráfico de *scores* para las dos primeras componentes. **B)** Gráfico de *weights* del modelo PLS para las dos primeras componentes. **C**, control; **H**, HA; **C1**, primera componente; **C2**, segunda componente. Entre paréntesis, el porcentaje de varianza de los datos metabólicos explicado por cada componente

Entre los metabolitos de PL4W se observa que la mayoría de ellos son glicerofosfolípidos y que se encuentran con niveles bajos en la condición de HA, salvo dos de ellos que se encuentran con valores superiores en HA. Curiosamente, en PL4W la mayoría de los metabolitos que se encuentran con niveles bajos en HA son lípidos de cadena larga que tienen un número de insaturaciones alto (≥ 4 dobles enlaces), siendo los que se encuentran con niveles altos en HA, de cadena corta con pocos dobles enlaces (Figura 11). Estos resultados coinciden con los plasmados en la Figura 5A, tanto en PL4W como en CBLO. Esta particular agrupación no es exclusiva de nuestro estudio, Rubio *et al.*, (2021) utilizando este mismo kit de metabolómica, comprobaron que los fosfolípidos se agrupan casi perfectamente por masa molecular y nivel de saturación en plasma de pacientes con EHM. Ahora bien, se desconoce si este perfil lipídico es común para la mayor parte de pacientes con EHM o de ratas con HA crónica. Igualmente, se ignora su papel biológico en la enfermedad. De esta forma, un estudio más exhaustivo sobre los fosfolípidos en EHM e HA podría revelar si la agrupación observada es coincidente en la enfermedad y tiene alguna función biológica, o si es meramente una casualidad.

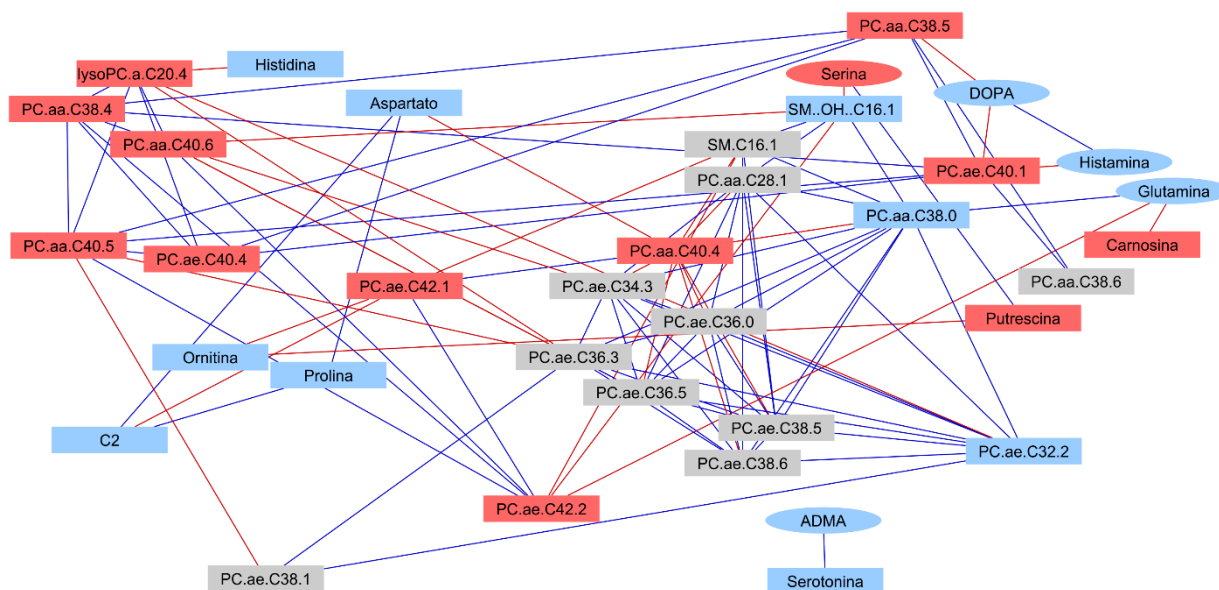


Figura 11. Red de interacción de metabolitos de PL4W y CBLO. Los rectángulos representan metabolitos de PL4W y las elipses de CBLO. En azul los metabolitos que aumentan significativamente en HA con respecto el control, y en rojo los que disminuyen; en gris los metabolitos sin cambios significativos. Las flechas azules indican correlación positiva entre ambos metabolitos y en rojo, correlación negativa. Los lípidos se describen con la notación "Cx: y", donde x denota el número de carbonos en la cadena lateral e y el número de dobles enlaces. PC, fosfatidilcolina; lysoPC, lisofosfatidilcolina; SM, esfingomiolina.

En cuanto a los metabolitos en PL4W que se asocian con los metabolitos significativos en CBLO se encuentra la carnosina. En la Figura 11 se puede apreciar que los niveles bajos de carnosina están relacionados con niveles altos de glutamina. La carnosina es un dipéptido de beta-alanina e histidina. Sus propiedades antioxidantes y su capacidad de eliminar especies reactivas (Kohen *et al.*, 1988; Aydın *et al.*, 2010) le han atribuido un efecto nefroprotector (Fouad *et al.*, 2008) y beneficios en varias afecciones como la diabetes (Lee *et al.*, 2005) y la isquemia cerebral (Gallant *et al.*, 2000; Rajanikant *et al.*, 2007). Al mismo tiempo, se ha demostrado que la administración de carnosina es eficaz contra las complicaciones asociadas al Parkinson (Boldyrev *et al.*, 2008), la enfermedad de Alzheimer (Hipkiss, 2007) y enfermedades hepáticas (Fouad *et al.*, 2007; Fouad *et al.*, 2009; Yan *et al.*, 2009; Kuloglu y Sönmez, 2015). En su estudio, Jamshidzadeh *et al.*, (2017) demostraron que la administración de carnosina alivió de forma eficaz la lesión hepática, la HA y mejoró la actividad locomotora en ratas BDL. Además, Shi *et al.*, (2017) informaron que la carnosina previno el daño celular, rescató la expresión de la glutamina sintetasa y la producción de glutamina en los astrocitos senescentes en condiciones de isquemia cerebral. Con todo ello y dado que, como se ha argumentado previamente, los niveles muy elevados de glutamina tienen efectos nocivos y se ha asociado con estrés oxidativo en la EH, se sugiere que los niveles bajos de carnosina pueden ser un indicativo de daño cerebral.

Por otro lado, se observa (Figura 11) una asociación positiva entre los niveles de serotonina en PL4W y ADMA en CBLO. Aunque ningún estudio de insuficiencia hepática y EH ha relacionado ambos metabolitos, su asociación ha sido reportada en el trabajo de Bardi *et al.*, (2006). Los autores observaron que los niveles de ADMA y serotonina en plasma disminuían en respuesta a un tratamiento frente la enfermedad oclusiva arterial periférica. De manera que ADMA y serotonina podrían considerarse como biomarcadores de progresión/remisión clínica para esta enfermedad. Esto también podría extrapolarse a la EHM ya que en nuestro estudio hemos visto que la serotonina y el ADMA se encuentran elevados en PL4W. Anteriormente se han citado un

gran número de trabajos en los que se ha observado un aumento de ADMA tanto a nivel cerebral como plasmático en pacientes y ratas con insuficiencia hepática e HA. De tal manera, el aumento de ADMA parece ser un indicador común en EH. Sin embargo, tal y como apuntan Czarnecka *et al.*, (2017b), aún no es evidente que la concentración elevada de ADMA en plasma pueda considerarse como un marcador clínico de disfunción hepática y/o un factor acompañante en el diagnóstico de EH. Otra hipótesis se basa en que la serotonina en plasma podría ser un indicador de respuestas inmunitarias ante el aumento del amonio en sangre ya que la HA crónica induce inflamación periférica (Balzano *et al.*, 2019). Por tanto, en base a todo lo anterior, proponemos la necesidad de realizar un análisis más exhaustivo de estos metabolitos para una mejor comprensión de cómo influyen estos y su relación en distintos estadios de la enfermedad.

Estos metabolitos (carnosina y serotonina) podrían servir como potenciales biomarcadores que pueden ser útiles para detectar en plasma cambios relacionados con la HA y EH y así monitorizar la enfermedad. No obstante, dado el reducido tamaño muestral con el que se cuenta y el ruido observado en los datos, son necesarias más investigaciones en este campo para predecir con más exactitud indicadores en plasma que estén relacionados con los cambios en el metabolismo del CBLO en EH. Al mismo tiempo, también sería interesante comprender el papel de los fosfolípidos en la EHM y su relación con los aminoácidos y aminos. También cabe recalcar que las relaciones entre metabolitos de distintos tejidos determinadas por un modelo de regresión (PLS, en este caso) no se pueden interpretar como relaciones de causa-efecto, sino simplemente significan que dichos metabolitos cambian de la misma manera (o de manera inversa).

5. CONCLUSIONES

Las enfermedades hepáticas son uno de los principales problemas de salud y su incidencia ha aumentado notablemente en los últimos años. El hígado es el órgano involucrado en la desintoxicación de sustancias en el organismo, por lo que un funcionamiento anormal conduce a la acumulación de compuestos tóxicos, entre ellos el amonio. El aumento de amonio produce HA y esta puede dar lugar a la aparición de la EHM y la EH, con los síntomas neurológicos asociados.

Pese a que se han realizado muchos estudios para desentrañar los efectos moleculares de la HA (tanto en modelos animales como en humanos) en la EH y EHM, ninguno de ellos emplea la metabolómica en plasma y en diferentes regiones del encéfalo al mismo tiempo, por lo que nuestro trabajo se considera innovador en este campo. Los análisis realizados en este trabajo nos han ayudado a comprender con más detalle los efectos de la HA crónica en el metabolismo animal y contribuir al conocimiento de la etiología y el desarrollo de la EHM y la EH. Estas aproximaciones han determinado que:

1. El pre-procesamiento de los datos mostró que estos presentaban distribuciones muy asimétricas con todos los valores muy bajos y unos cuantos extremadamente altos. Además, se observó una alta variabilidad en los datos en cada grupo de rata, pero no fue posible determinar las causas de esta variabilidad. El análisis previo de los datos (pre-proceso y normalización) permitió reducir el ruido en los datos, lo cual se traduce en mejores resultados en los análisis posteriores.
2. El análisis metabolómico reveló que la acumulación diferencial de metabolitos varía entre los 5 tejidos estudiados al someterlos a un entorno hiperamonémico. Estas variaciones resultaron menores entre el HP y CX observándose marcadas diferencias en la huella metabólica del CBLO con respecto las otras regiones cerebrales. Específicamente es en el CBLO donde se han encontrado mayores cambios y más pronunciados en el nivel de los aminoácidos y aminos posiblemente porque podría ser la región del encéfalo que primero sufre las alteraciones causadas por la HA. Entre los metabolitos diferenciales se encuentran los siguientes. a) la glutamina, el glutamato, el aspartato, la glicina, la serina, la serotonina, los BCAA y los AAA. La variación de estos metabolitos en HA podría indicar alteraciones en la neurotransmisión glutaminérgica, gabaérgica, glicinérgica y serotoninérgica. Además, los cambios en la serina, esencial para la síntesis de esfingolípidos, podrían explicar las variaciones observadas a nivel lipídico en ambas condiciones. b) El ADMA, la citrulina y la arginina también se encuentran alterados en ratas con HA, lo que sugiere que la producción de NO y cGMP pueda verse comprometida. c) DOPA, aunque no se logra explicar el aumento de su concentración en CBLO. Del mismo modo, el enriquecimiento funcional solo identificó rutas enriquecidas en los metabolitos con cambios significativos en el CBLO. *Interacción neuroactiva ligando-receptor*, es una ruta de interés en la que destaca la vía NMDAR-glutamato-NO-cGMP, la cual está alterada en HA y se asocia con deterioro cognitivo y motor en la EH y la EHM. También presentan cambios significativos rutas biológicas relacionadas con el transporte de sustancias en la BBB.
3. El estudio temporal de los plasmas reveló que había metabolitos que cambiaban de forma diferente a lo largo del tiempo en ambos grupos (Control/HA). Entre ellos se encuentran la dopamina, la histamina y la serotonina que están relacionadas con respuestas inmunitarias e inflamatorias. La ornitina, la isoleucina y algunas acilcarnitinas también mostraron un incremento en el tiempo en HA, posiblemente como un mecanismo compensatorio del organismo para hacer frente al aumento de amonio. Estas diferencias

observadas entre ambas semanas, resultan importantes ya que muestran que los efectos de la HA crónica en el tiempo se van agravando como resultado de su cronicidad.

4. Por último, el modelo de regresión PLS permitió encontrar metabolitos en PL4W que pudieran estar asociados con los cambios del metabolismo en CBLO para monitorizar la enfermedad. Se describieron la serotonina y la carnosina en PL4W como potenciales biomarcadores de los cambios en ADMA y glutamina, respectivamente, en el CBLO. Aunque el método PLS presenta la ventaja de poder modelizar relaciones entre dos matrices de datos con un elevado número de variables y un reducido número de observaciones, es evidente la necesidad de validar estos resultados con otros estudios con mayor tamaño muestral.

En conclusión, nuestro trabajo se considera pionero en el estudio de la HA crónica y la EHM ya que en ningún estudio previo se ha realizado un análisis metabolómico en plasma y en las distintas áreas del encéfalo simultáneamente. Aunque es cierto que los datos metabolómicos por sí solos no son suficientes para obtener una comprensión completa de un sistema biológico y su comportamiento en condiciones patológicas. En este sentido, se necesita una integración con otros datos ómicos como transcriptómica y proteómica, para justificar con mayor certeza los motivos por los que se encuentran cambios en los metabolitos en HA crónica. No obstante, nuestro estudio sirve como punto de partida para otras investigaciones ya que sugiere potenciales biomarcadores y nuevos mecanismos y vías por los cuales la HA crónica altera la función cerebral, pudiendo afectar a la EHM, que deberían ser estudiados más profundamente en el futuro.

6. REFERENCIAS

- Abbott, N. J., Rönnbäck, L., y Hansson, E. (2006). Astrocyte–endothelial interactions at the blood–brain barrier. *Nat. Rev. Neurosci.*, 7(1), 41-53. <https://doi.org/10.1038/nrn1824>
- Alexander, W. F., Spindel, E., Harty, R. F., y Cerda, J. J. (1989). The usefulness of branched chain amino acids in patients with acute or chronic hepatic encephalopathy. *Am. J. Gastroenterol.*, 84(2), 91-96.
- Als-Nielsen, B., Koretz, R. L., Gluud, L. L., y Gluud, C. (2003). Branched-chain amino acids for hepatic encephalopathy. *Cochrane Database Syst. Rev.*, 2(1). <https://doi.org/10.1002/14651858.CD001939>
- Alvares-da-Silva, M. R., de Araujo, A., Vicenzi, J. R., da Silva, G. V., Oliveira, F. B., Schacher, F., ... y Fernandes, L. N. T. (2014). Oral l-ornithine-l-aspartate in minimal hepatic encephalopathy: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Hepatol. Res.*, 44(9), 956-963. <https://doi.org/10.1111/hepr.12235>
- Ando, M., Amayasu, H., Itai, T., y Yoshida, H. (2017). Association between the blood concentrations of ammonia and carnitine/amino acid of schizophrenic patients treated with valproic acid. *BioPsychoSocial Med.*, 11(1), 1-8. <https://doi.org/10.1186/s13030-017-0101-0>
- Aspinall, R. J., Weis, S. M., Barnes, L., Lutu-Fuga, K., Bylund, D. J., Pockros, P. J., y Cheresh, D. A. (2011). A Src family kinase inhibitor improves survival in experimental acute liver failure associated with elevated cerebral and circulating vascular endothelial growth factor levels. *Liver Int.*, 31(8), 1222-1230. <https://doi.org/10.1111/j.1478-3231.2011.02554.x>
- Aydın, A. F., Küçükgergin, C., Özdemirler-Erata, G., Koçak-Toker, N., y Uysal, M. (2010). The effect of carnosine treatment on prooxidant–antioxidant balance in liver, heart and brain tissues of male aged rats. *Biogerontology*, 11(1), 103-109. <https://doi.org/10.1007/s10522-009-9232-4>
- Bachmann, C., Braissant, O., Villard, A. M., Boulat, O., y Henry, H. (2004). Ammonia toxicity to the brain and creatine. *Mol Genet. Metab.*, 81(1), 52-57. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2003.10.014>
- Bajaj, J. S., Ahluwalia, V., Wade, J. B., Sanyal, A. J., White, M. B., Noble, N. A., ... y Heuman, D. M. (2013). Asymmetric dimethylarginine is strongly associated with cognitive dysfunction and brain MR spectroscopic abnormalities in cirrhosis. *J. Hepatol.*, 58(1), 38-44. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2012.08.005>
- Bak, L. K., Schousboe, A., y Waagepetersen, H. S. (2006). The glutamate/GABA–glutamine cycle: aspects of transport, neurotransmitter homeostasis and ammonia transfer. *J. Neurochem.*, 98(3), 641-653. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.03913.x>
- Balasubramaniyan, V., Wright, G., Sharma, V., Davies, N. A., Sharifi, Y., Habtesion, A., ... y Jalan, R. (2012). Ammonia reduction with ornithine phenylacetate restores brain eNOS activity via the DDAH-ADMA pathway in bile duct-ligated cirrhotic rats. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 302(1), 145-152. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00097.2011>
- Balzano, T., Dadsetan, S., Forteza, J., Cabrera-Pastor, A., Taoro-Gonzalez, L., Malaguarnera, M., ... y Felipo, V. (2019). Chronic hyperammonemia induces peripheral inflammation that leads to cognitive impairment in rats: Reversed by anti-TNF- α treatment. *J. Hepatol.*, 73(3), 582-592. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2019.01.008>

- Balzano, T., Arenas, Y. M., Dadsetan, S., Forteza, J., Gil-Perotin, S., Cubas-Nuñez, L., ... y Felipo, V. (2020). Sustained hyperammonemia induces TNF- α IN Purkinje neurons by activating the TNFR1-NF- κ B pathway. *J. Neuroinflammation*, *17*(1), 1-22. <https://doi.org/10.1186/s12974-020-01746-z>
- Basu, A. C., Tsai, G. E., Ma, C. L., Ehmsen, J. T., Mustafa, A. K., Han, L., ... y Coyle, J. T. (2009). Targeted disruption of serine racemase affects glutamatergic neurotransmission and behavior. *Mol. Psychiatry*, *14*(7), 719-727. <https://doi.org/10.1038/mp.2008.130>
- Béard, E., y Braissant, O. (2010). Synthesis and transport of creatine in the CNS: importance for cerebral functions. *J. Neurochem.*, *115*(2), 297-313. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2010.06935.x>
- Bardi, P., de Lalla, A., Pieragalli, D., De Franco, V., Meini, S., Ceccatelli, L., y Auteri, A. (2006). Effect of iloprost on plasma asymmetric dimethylarginine and plasma and platelet serotonin in patients with peripheral arterial occlusive disease. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.*, *80*(3-4), 175-182. <https://doi.org/10.1016/j.prostaglandins.2006.06.005>
- Bou Khalil, M., Hou, W., Zhou, H., Elisma, F., Swayne, L. A., Blanchard, A. P., ... y Figeys, D. (2010). Lipidomics era: accomplishments and challenges. *Mass Spectrom. Rev.*, *29*(6), 877-929. <https://doi.org/10.1002/mas.20294>
- Bouthillier, A., Van Loveren, H. R., y Keller, J. T. (1996). Segments of the internal carotid artery: a new classification. *Neurosurgery*, *38*(3), 425-433. <https://doi.org/10.1097/00006123-199603000-00001>
- Braissant, O., Cagnon, L., Monnet-Tschudi, F., Speer, O., Wallimann, T., Honegger, P., y Henry, H. (2008). Ammonium alters creatine transport and synthesis in a 3D culture of developing brain cells, resulting in secondary cerebral creatine deficiency. *Eur. J. Neurosci.* *27*(7), 1673-1685. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2008.06126.x>
- Brusilow, S. W., Koehler, R. C., Traystman, R. J., y Cooper, A. J. (2010). Astrocyte glutamine synthetase: importance in hyperammonemic syndromes and potential target for therapy. *Neurotherapeutics*, *7*(4), 452-470. <https://doi.org/10.1016/j.nurt.2010.05.015>
- Buckner, R. L. (2013). The cerebellum and cognitive function: 25 years of insight from anatomy and neuroimaging. *Neuron*, *80*(3), 807-815. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.10.044>
- Buuren, S. V., y Groothuis-Oudshoorn, K. (2010). mice: Multivariate imputation by chained equations in R. *J. Stat. Softw.*, 1-68. <http://hdl.handle.net/10.18637/jss.v045.i03>
- Byass, P. (2014). The global burden of liver disease: a challenge for methods and for public health. *BMC Med.*, *12*(1), 1-3. <https://doi.org/10.1186/s12916-014-0159-5>
- Cabrera-Pastor, A., Llansola, M., Reznikov, V., Boix, J., y Felipo, V. (2012). Differential effects of chronic hyperammonemia on modulation of the glutamate–nitric oxide–cGMP pathway by metabotropic glutamate receptor 5 and low and high affinity AMPA receptors in cerebellum in vivo. *Neurochem. Int.*, *61*(1), 63-71. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2012.04.006>
- Cabrera-Pastor, A., Taoro-Gonzalez, L., y Felipo, V. (2016a). Hyperammonemia alters glycinergic neurotransmission and modulation of the glutamate-nitric oxide-cGMP pathway by extracellular glycine in cerebellum in vivo. *J. Neurochem.*, *137*(4), 539-548. <https://doi.org/10.1111/jnc.13579>
- Cabrera-Pastor, A., Malaguarnera, M., Taoro-Gonzalez, L., Llansola, M., y Felipo, V. (2016b). Extracellular cGMP modulates learning biphasically by modulating glycine receptors,

- CaMKII and glutamate-nitric oxide-cGMP pathway. *Sci. Rep.*, 6(1), 1-13. <https://doi.org/10.1038/srep33124>
- Cabrera-Pastor, A., Taoro-González, L., López-Merino, E., Celma, F., Llansola, M., y Felipo, V. (2018). Chronic Hyperammonemia Alters in Opposite Ways Membrane Expression of GluA1 and GluA2 AMPA Receptor Subunits in Cerebellum. Molecular Mechanisms Involved. *Biochimica Biophys. Acta.*, 1864(1), 286-295. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2017.10.031>
- Cabrera-Pastor, A., Arenas, Y. M., Taoro-Gonzalez, L., Montoliu, C., y Felipo, V. (2019). Chronic hyperammonemia alters extracellular glutamate, glutamine and GABA and membrane expression of their transporters in rat cerebellum. Modulation by extracellular cGMP. *Neuropharmacology*, 161(1), 1-13. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2019.01.011>
- Cambiaghi, A., Ferrario, M., y Masseroli, M. (2017). Analysis of metabolomic data: tools, current strategies and future challenges for omics data integration. *Brief. Bioinform.*, 18(3), 498-510. <https://doi.org/10.1093/bib/bbw031>
- 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), 514-519. <https://doi.org/10.1002/hep.21734>
- Cauli, O., Rodrigo, R., Piedrafita, B., Llansola, M., Mansouri, M. T., y Felipo, V. (2009a). Neuroinflammation contributes to hypokinesia in rats with hepatic encephalopathy: ibuprofen restores its motor activity. *J. Neurosci. Res.*, 87(6), 1369-1374. <https://doi.org/10.1002/jnr.21947>
- Cauli, O., Rodrigo, R., Llansola, M., Montoliu, C., Monfort, P., Piedrafita, B., ... y Felipo, V. (2009b). Glutamatergic and gabaergic neurotransmission and neuronal circuits in hepatic encephalopathy. *Metab. Brain Dis.*, 24(1), 69-80. <https://doi.org/10.1007/s11011-008-9115-4>
- Cauli, O., Mansouri, M. T., Agustí, A., y Felipo, V. (2009c). Hyperammonemia increases GABAergic tone in the cerebellum but decreases it in the rat cortex. *Gastroenterology*, 136(4), 1359-1367. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2008.12.057>
- Cauli, O., López-Larrubia, P., Rodrigo, R., Agustí, A., Boix, J., Nieto-Charques, L., ... y Felipo, V. (2011). Brain region-selective mechanisms contribute to the progression of cerebral alterations in acute liver failure in rats. *Gastroenterology*, 140(2), 638-645. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2010.10.043>
- Cauli, O., Llansola, M., Agustí, A., Rodrigo, R., Hernández-Rabaza, V., Rodrigues, T. B., ... y Felipo, V. (2014). Cerebral oedema is not responsible for motor or cognitive deficits in rats with hepatic encephalopathy. *Liver Int.*, 34(3), 379-387. <https://doi.org/10.1111/liv.12258>
- Chan, M. K., Tsang, T. M., Harris, L. W., Guest, P. C., Holmes, E., y Bahn, S. (2011). Evidence for disease and antipsychotic medication effects in post-mortem brain from schizophrenia patients. *Mol. Psychiatry*, 16(12), 1189-1202. <https://doi.org/10.1038/mp.2010.100>
- Chen, X., Xie, C., Sun, L., Ding, J., & Cai, H. (2015a). Longitudinal metabolomics profiling of Parkinson's disease-related α -synuclein A53T transgenic mice. *PloS One*, 10(8), 1-15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0136612>
- Chen, Y., Leon-Ponte, M., Pingle, S. C., O'Connell, P. J., y Ahern, G. P. (2015b). T lymphocytes possess the machinery for 5-HT synthesis, storage, degradation and release. *Acta Physiol.*, 213(4), 860-867. <https://doi.org/10.1111/apha.12470>

- Choi, W. T., Tosun, M., Jeong, H. H., Karakas, C., Semerci, F., Liu, Z., y Maletić-Savatić, M. (2018). Metabolomics of mammalian brain reveals regional differences. *BMC Syst. Biol.*, 12(8), 77-88. <https://doi.org/10.1186/s12918-018-0644-0>
- Cocchi, M., Biancolillo, A., y Marini, F. (2018). Chemometric methods for classification and feature selection. En J. Jaumot, C. Bedia, R. Tauler (Ed.), *Data Analysis for Omic Sciences: Methods and Applications* (pp. 265-299). Elsevier.
- Conn, H. O., Leevy, C. M., Vlahcevic, Z. R., Rodgers, J. B., Maddrey, W. C., Seeff, L., & 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), 573-583. [https://doi.org/10.1016/S0016-5085\(77\)80135-2](https://doi.org/10.1016/S0016-5085(77)80135-2)
- Cooper, A. J., McDonald, J. M., Gelbard, A. S., Gledhill, R. F., y Duffy, T. E. (1979). The metabolic fate of ¹³N-labeled ammonia in rat brain. *JBC*, 254(12), 4982-4992. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)50550-0](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)50550-0)
- Cosentino, M., Fietta, A. M., Ferrari, M., Rasini, E., Bombelli, R., Carcano, E., ... y Lecchini, S. (2007). Human CD4+ CD25+ regulatory T cells selectively express tyrosine hydroxylase and contain endogenous catecholamines subserving an autocrine/paracrine inhibitory functional loop. *Blood*, 109(2), 632-642. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-01-028423>
- Cudalbu, C., Lanz, B., Duarte, J. M., Morgenthaler, F. D., Pilloud, Y., Mlynárik, V., y Gruetter, R. (2012). Cerebral glutamine metabolism under hyperammonemia determined in vivo by localized ¹H and ¹⁵N NMR spectroscopy. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 32(4), 696-708. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2011.173>
- Czarnecka, A., Milewski, K., Jaźwiec, R., y Zielińska, M. (2017a). Intracerebral administration of S-Adenosylhomocysteine or S-Adenosylmethionine attenuates the increases in the cortical extracellular levels of dimethylarginines without affecting cGMP level in rats with acute liver failure. *Neurotox. Res.*, 31(1), 99-108. <https://doi.org/10.1007/s12640-016-9668-7>
- Czarnecka, A., Milewski, K., y Zielińska, M. (2017b). Asymmetric dimethylarginine and hepatic encephalopathy: cause, effect or association?. *Neurochem. Res.*, 42(3), 750-761. <https://doi.org/10.1007/s11064-016-2111-x>
- Davidovic, L., Navratil, V., Bonaccorso, C. M., Catania, M. V., Bardoni, B., y Dumas, M. E. (2011). A metabolomic and systems biology perspective on the brain of the fragile X syndrome mouse model. *Genome Res.*, 21(12), 2190-2202 <https://doi.org/10.1007/10.1101/gr.116764.110>
- Dhanda, S., y Sandhir, R. (2015). Role of dopaminergic and serotonergic neurotransmitters in behavioral alterations observed in rodent model of hepatic encephalopathy. *Behav. Brain Res.*, 286(1), 222-235. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2015.01.042>
- Dong, H., Zhang, X., Wang, Y., Zhou, X., Qian, Y., & Zhang, S. (2017). Suppression of brain mast cells degranulation inhibits microglial activation and central nervous system inflammation. *Mol. Neurobiol.*, 54(2), 997-1007. <https://doi.org/10.1007/s12035-016-9720-x>
- Dudley, E., Yousef, M., Wang, Y., y Griffiths, W. J. (2010). Targeted metabolomics and mass spectrometry. *Adv. Protein Chem. Struct. Biol.*, 80(1), 45-83. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-381264-3.00002-3>
- Duerschmied, D., Suidan, G. L., Demers, M., Herr, N., Carbo, C., Brill, A., ... y Wagner, D. D. (2013). Platelet serotonin promotes the recruitment of neutrophils to sites of acute inflammation in mice. *Blood*, 121(6), 1008-1015. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-06-437392>

- Efron, B. (1982). Introduction. En CBMS-NSF (Ed.). *The Jackknife, the Bootstrap, and Other Resampling Plans* (pp. 1-5). Society for Industrial and Applied Mathematics.
- El-Mlili, N., Rodrigo, R., Naghizadeh, B., Cauli, O., y Felipo, V. (2008). Chronic hyperammonemia reduces the activity of neuronal nitric oxide synthase in cerebellum by altering its localization and increasing its phosphorylation by calcium-calmodulin kinase II. *J. Neurochem.*, *106*(3), 1440-1449. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2008.05495.x>
- Erceg, S., Monfort, P., Hernandez-Viadel, M., Llansola, M., Montoliu, C., y Felipo, V. (2005a). Restoration of learning ability in hyperammonemic rats by increasing extracellular cGMP in brain. *Brain Res.*, *1036*(1-2), 115-121. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2004.12.045>
- Erceg, S., Monfort, P., Hernández-Viadel, M., Rodrigo, R., Montoliu, C., y Felipo, V. (2005). Oral administration of sildenafil restores learning ability in rats with hyperammonemia and with portacaval shunts. *Hepatology*, *41*(2), 299-306. <https://doi.org/10.1002/hep.20565>
- 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), 1-14. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics10030102>
- Faraci, F. M., Brian Jr, J. E., y Heistad, D. D. (1995). Response of cerebral blood vessels to an endogenous inhibitor of nitric oxide synthase. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, *269*(5), 522-527. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.1995.269.5.H1522>
- Fedele, E., y Raiteri, M. (1999). In vivo studies of the cerebral glutamate receptor/NO/cGMP pathway. *Prog. Neurobiol.*, *58*(1), 89-120. [https://doi.org/10.1016/S0301-0082\(98\)00077-X](https://doi.org/10.1016/S0301-0082(98)00077-X)
- Felipo, V., Miñana, M. D., y Grisolia, S. (1988). Long-term ingestion of ammonium increases acetylglutamate and urea levels without affecting the amount of carbamoyl-phosphate synthase. *Eur J Biochem.*, *176*(3), 567-571. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1988.tb14315.x>
- Felipo, V., Hermenegildo, C., Montoliu, C., Llansola, M., y Miñana, M. D. (1998). Neurotoxicity of ammonia and glutamate: molecular mechanisms and prevention. *Neurotoxicology*, *19*(4-5), 675-681.
- Felipo, V., y Butterworth, R. F. (2002). Neurobiology of ammonia. *Prog. Neurobiol.*, *67*(4), 259-279. [https://doi.org/10.1016/S0301-0082\(02\)00019-9](https://doi.org/10.1016/S0301-0082(02)00019-9)
- Felipo, V. (2013). Hepatic encephalopathy: effects of liver failure on brain function. *Nat. Rev. Neurosci.*, *14*(12), 851-858. <https://doi.org/10.1038/nrn3587>
- Felipo, V., Urios, A., Giménez-Garzó, C., Cauli, O., Andrés-Costa, M. J., González, O., ... y Montoliu, C. (2014). Non invasive blood flow measurement in cerebellum detects minimal hepatic encephalopathy earlier than psychometric tests. *World J. Gastroenterol.*, *20*(33), 11815-11825. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i33.11815>
- 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), 716-721. <https://doi.org/10.1053/jhep.2002.31250>
- Fernstrom, J. D. (2005). Branched-chain amino acids and brain function. *J. Nutr.*, *135*(6), 1539-1546. <https://doi.org/10.1093/jn/135.6.1539S>

- Flierl, M. A., Rittirsch, D., Nadeau, B. A., Sarma, J. V., Day, D. E., Lentsch, A. B., ... y Ward, P. A. (2009). Upregulation of phagocyte-derived catecholamines augments the acute inflammatory response. *PLoS One*, *4*(2), 1-11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004414>
- Fogel, W. A., Andrzejewski, W., y Maslinski, C. (1991). Brain histamine in rats with hepatic encephalopathy. *J. Neurochem.*, *56*(1), 38-43. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1991.tb02559.x>
- Fouad, A. A., El-Rehany, M. A. A., y Maghraby, H. K. (2007). The hepatoprotective effect of carnosine against ischemia/reperfusion liver injury in rats. *Eur. J. Pharmacol.*, *572*(1), 61-68. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2007.06.010>
- Fouad, A. A., Morsy, M. A., y Gomaa, W. (2008). Protective effect of carnosine against cisplatin-induced nephrotoxicity in mice. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, *25*(3), 292-297. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2007.10.026>
- Fouad, A. A., Qureshi, H. A., Yacoubi, M. T., y Al-Melhim, W. N. (2009). Protective role of carnosine in mice with cadmium-induced acute hepatotoxicity. *Food Chem. Toxicol.*, *47*(11), 2863-2870. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2009.09.009>
- Gallant, S., Kukley, M., Stvolinsky, S., Bulygina, E., y Boldyrev, A. (2000). Effect of carnosine on rats under experimental brain ischemia. *Tohoku J. Exp. Med.*, *191*(2), 85-99. <https://doi.org/10.1620/tjem.191.85>
- Gentleman, R. C., Carey, V. J., Bates, D. M., Bolstad, B., Dettling, M., Dudoit, S., ... y Zhang, J. (2004). Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome Biol.*, *5*(10), 1-16. <https://doi.org/10.1186/gb-2004-5-10-r80>
- Gluud, L. L., Dam, G., Les, I., Cordoba, J., Marchesini, G., Borre, M., ... y Vilstrup, H. (2015). Branched-chain amino acids for people with hepatic encephalopathy. *Cochrane Database Syst. Rev.*, *9*(2), 1-88. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD001939.pub3>
- González-Domínguez, R., García-Barrera, T., Vitorica, J., y Gómez-Ariza, J. L. (2015). Application of metabolomics based on direct mass spectrometry analysis for the elucidation of altered metabolic pathways in serum from the APP/PS1 transgenic model of Alzheimer's disease. *J. Pharm. Biomed. Ana.*, *107*(1), 378-385. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2015.01.025>
- Gonzalez-Riano, C., Garcia, A., y Barbas, C. (2016). Metabolomics studies in brain tissue: a review. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, *100*(130), 141-168. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2016.07.008>
- Graham, S. F., Chevallier, O. P., Roberts, D., Hölscher, C., Elliott, C. T., y Green, B. D. (2013). Investigation of the human brain metabolome to identify potential markers for early diagnosis and therapeutic targets of Alzheimer's disease. *Anal. Chem.*, *85*(3), 1803-1811. <https://doi.org/10.1021/ac303163f>
- Hardingham, G. E., & Bading, H. (2010). Synaptic versus extrasynaptic NMDA receptor signalling: implications for neurodegenerative disorders. *Nat. Rev. Neurosci.*, *11*(10), 682-696. <https://doi.org/10.1038/nrn2911>
- Hashimoto, A., Yoshikawa, M., Niwa, A., y Konno, R. (2005). Mice lacking D-amino acid oxidase activity display marked attenuation of stereotypy and ataxia induced by MK-801. *Brain Res.*, *1033*(2), 210-215. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2004.11.031>
- Hastings, J., Owen, G., Dekker, A., Ennis, M., Kale, N., Muthukrishnan, V., ... y Steinbeck, C. (2016). ChEBI in 2016: Improved services and an expanding collection of metabolites. *Nucleic Acids Res.*, *44*(1), 1214-1219. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1031>

- Hazell, A. S., y Butterworth, R. F. (1999). Hepatic encephalopathy: An update of pathophysiologic mechanisms. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 222(2), 99-112. <https://doi.org/10.1046/j.1525-1373.1999.d01-120.x>
- Hermenegildo, C., Marcaida, G., Montoliu, C., Grisolia, S., Miñana, M. D., & Felipo, V. (1996). NMDA receptor antagonists prevent acute ammonia toxicity in mice. *Neurochem. Res.*, 21(10), 1237-1244. <https://doi.org/10.1007/BF02532401>
- Hermenegildo, C., Montoliu, C., Llansola, M., Muñoz, M. D., Gaztelu, J. M., Miñana, M. D., y Felipo, V. (1998). Chronic hyperammonemia impairs the glutamate–nitric oxide–cyclic GMP pathway in cerebellar neurons in culture and in the rat in vivo. *Eur. J. Neurosci.*, 10(10), 3201-3209. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.1998.00329.x>
- Hernández-de-Diego, R., Tarazona, S., Martínez-Mira, C., Balzano-Nogueira, L., Furió-Tarí, P., Pappas Jr, G. J., y Conesa, A. (2018). PaintOmics 3: a web resource for the pathway analysis and visualization of multi-omics data. *Nucleic Acids Res.*, 46(1), 503-509. <https://doi.org/10.1093/nar/gky466>
- Hipkiss, A. R. (2007). Could carnosine or related structures suppress Alzheimer's disease?. *J. Alzheimer's Dis.*, 11(2), 229-240. <https://doi.org/10.3233/jad-2007-11210>
- Holeček, M. (2001). The BCAA–BCKA cycle: its relation to alanine and glutamine synthesis and protein balance. *Nutrition*, 17(1), 70.
- Holecek, M., Kandar, R., Sispera, L., y Kovarik, M. (2011). Acute hyperammonemia activates branched-chain amino acid catabolism and decreases their extracellular concentrations: different sensitivity of red and white muscle. *Amino Acids*, 40(2), 575-584. <https://doi.org/10.1007/s00726-010-0679-z>
- Holmes, E., Tsang, T. M., Huang, J. T. J., Leweke, F. M., Koethe, D., Gerth, C. W., ... y Bahn, S. (2006). Metabolic profiling of CSF: evidence that early intervention may impact on disease progression and outcome in schizophrenia. *PLoS Med.*, 3(8), 1-10. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0030327>
- Huber, W., Von Heydebreck, A., Sültmann, H., Poustka, A., y Vingron, M. (2002). Variance stabilization applied to microarray data calibration and to the quantification of differential expression. *Bioinformatics*, 18(1), 96-104. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/18.suppl_1.S96
- Iadecola, C. (1993). Regulation of the cerebral microcirculation during neural activity: is nitric oxide the missing link?. *Trends Neurosci.*, 16(6), 206-214. [https://doi.org/10.1016/0166-2236\(93\)90156-G](https://doi.org/10.1016/0166-2236(93)90156-G)
- Issaq, H. J., Van, Q. N., Waybright, T. J., Muschik, G. M., y Veenstra, T. D. (2009). Analytical and statistical approaches to metabolomics research. *J. Sep. Sci.*, 32(13), 2183-2199. <https://doi.org/10.1002/jssc.200900152>
- Jalan, R., Wright, G., Davies, N. A., y Hodges, S. J. (2007). L-Ornithine phenylacetate (OP): a novel treatment for hyperammonemia and hepatic encephalopathy. *Med. Hypotheses*, 69(5), 1064-1069. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2006.12.061>
- Jamshidzadeh, A., Heidari, R., Latifpour, Z., Ommati, M. M., Abdoli, N., Mousavi, S., ... y Mardani, E. (2017). Carnosine ameliorates liver fibrosis and hyperammonemia in cirrhotic rats. *Clin. Res. Hepatol. Gastroenterol.*, 41(4), 424-434. <https://doi.org/10.1016/j.clinre.2016.12.010>

- Jassal, B., Matthews, L., Viteri, G., Gong, C., Lorente, P., Fabregat, A., ... y D'Eustachio, P. (2020). The reactome pathway knowledgebase. *Nucleic Acids Res.*, 48(1), 498-503. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz1031>
- Jiménez, B., Montoliu, C., MacIntyre, D. A., Serra, M. A., Wassel, A., Jover, M., ... y Felipo, V. (2010). Serum metabolic signature of minimal hepatic encephalopathy by 1H-nuclear magnetic resonance. *J. Proteome Res.*, 9(10), 5180-5187. <https://doi.org/10.1021/pr100486e>
- Jin, S., Wang, X. T., Liu, L., Yao, D., Liu, C., Zhang, M., ... y Liu, X. D. (2013). P-glycoprotein and multidrug resistance-associated protein 2 are oppositely altered in brain of rats with thioacetamide-induced acute liver failure. *Liv. Int.*, 33(2), 274-282. <https://doi.org/10.1111/j.1478-3231.2012.02862.x>
- Jové, M., Portero-Otín, M., Naudí, A., Ferrer, I., y Pamplona, R. (2014). Metabolomics of human brain aging and age-related neurodegenerative diseases. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 73(7), 640-657. <https://doi.org/10.1097/NEN.0000000000000091>
- Kaddurah-Daouk, R., Yuan, P., Boyle, S. H., Matson, W., Wang, Z., Zeng, Z. B., ... y Drevets, W. (2012). Cerebrospinal fluid metabolome in mood disorders-remission state has a unique metabolic profile. *Sci. Rep.*, 2(1), 1-10. <https://doi.org/10.1038/srep00667>
- Kageyama, T., Nakamura, M., Matsuo, A., Yamasaki, Y., Takakura, Y., Hashida, M., ... y Shimohama, S. (2000). The 4F2hc/LAT1 complex transports L-DOPA across the blood-brain barrier. *Brain Res.*, 879(1-2), 115-121. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(00\)02758-X](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(00)02758-X)
- Kanehisa, M., y Goto, S. (2000). KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Res.*, 28(1), 27-30. <https://doi.org/10.1093/nar/28.1.27>
- Kawashima, T. (2018). The role of the serotonergic system in motor control. *Neurosci. Res.*, 129(1), 32-39. <https://doi.org/10.1016/j.neures.2017.07.005>
- Khan, V., Putluri, N., Sreekumar, A., y Mindikoglu, A. L. (2018). Current Applications of Metabolomics in Cirrhosis. *Metabolites*, 8(4), 1-12. <https://doi.org/10.3390/metabo8040067>
- Kircheis, G., Nilius, R., Held, C., Berndt, H., Buchner, M., Gortelmeyer, R., ... y Stauch, S. (1997). Therapeutic efficacy of L-ornithine-L-aspartate infusions in patients with cirrhosis and hepatic encephalopathy: results of a placebo-controlled, double-blind study. *Hepatology*, 25(6), 1351-1360. <https://doi.org/10.1002/hep.510250609>
- Kohen, R., Yamamoto, Y., Cundy, K. C., y Ames, B. N. (1988). Antioxidant activity of carnosine, homocarnosine, and anserine present in muscle and brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85(9), 3175-3179. <https://doi.org/10.1073/pnas.85.9.3175>
- Kuloglu, N., y Sönmez, M. F. (2015). A biochemical and immunohistochemical study of the protective effects of carnosine for carbon tetrachloride induced liver injury in rats. *Biotech. Histochem.*, 90(8), 608-614. <https://doi.org/10.3109/10520295.2015.1044565>
- Kushnir-Sukhov, N. M., Brown, J. M., Wu, Y., Kirshenbaum, A., & Metcalfe, D. D. (2007). Human mast cells are capable of serotonin synthesis and release. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 119(2), 498-499. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2006.09.003>
- Larsson, S. C., y Markus, H. S. (2017). Branched-chain amino acids and Alzheimer's disease: a Mendelian randomization analysis. *Sci. Rep.*, 7(1), 1-4. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-12931-1>

- Llansola, M., Erceg, S., y Felipo, V. (2005). Chronic exposure to ammonia alters the modulation of phosphorylation of microtubule-associated protein 2 by metabotropic glutamate receptors 1 and 5 in cerebellar neurons in culture. *Neuroscience*, *133*(1), 185-191. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2005.02.008>
- Leiper, J. M. (2005). The DDAH-ADMA-NOS Pathway. *Ther. Drug Monit.*, *27*(6), 744-746. <https://doi.org/10.1097/01.ftd.0000179849.42395.11>
- Li, Y., Sacchi, S., Pollegioni, L., Basu, A. C., Coyle, J. T., y Bolshakov, V. Y. (2013). Identity of endogenous NMDAR glycine site agonist in amygdala is determined by synaptic activity level. *Nat. Commun.*, *4*(1), 1-11. <https://doi.org/10.1038/ncomms2779>
- Li, B., Zhu, J. N., & Wang, J. J. (2014). Histaminergic afferent system in the cerebellum: structure and function. *Cerebellum & ataxias*, *1*(1), 1-9. <https://doi.org/10.1186/2053-8871-1-5>
- Lindon, J. C., Nicholson, J. K., & Holmes, E. (Eds.). (2011). *The handbook of metabonomics and metabolomics*. Elsevier.
- Lluch, P., Torondel, B., Medina, P., Segarra, G., Del Olmo, J. A., Serra, M. A., y Rodrigo, J. M. (2004). Plasma concentrations of nitric oxide and asymmetric dimethylarginine in human alcoholic cirrhosis. *J. Hepatol.*, *41*(1), 55-59. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2004.03.016>
- Lozeva, V., MacDonald, E., Belcheva, A., Hippeläinen, M., Kosunen, H., y Tuomisto, L. (1998). Long-term effects of portacaval anastomosis on the 5-hydroxytryptamine, histamine, and catecholamine neurotransmitter systems in rat brain. *J. Neurochem.*, *71*(4), 1450-1456.
- Lozeva, V., Tuomisto, L., Sola, D., Plumed, C., Hippeläinen, M., y Butterworth, R. (2001). Increased density of brain histamine H1 receptors in rats with portacaval anastomosis and in cirrhotic patients with chronic hepatic encephalopathy. *Hepatology*, *33*(6), 1370-1376. <https://doi.org/10.1053/jhep.2001.25090>
- Lozeva, V., Tuomisto, L., Tarhanen, J., y Butterworth, R. F. (2003). Increased concentrations of histamine and its metabolite, tele-methylhistamine and down-regulation of histamine H3 receptor sites in autopsied brain tissue from cirrhotic patients who died in hepatic coma. *J. Hepatol.*, *39*(4), 522-527. [https://doi.org/10.1016/S0168-8278\(03\)00353-2](https://doi.org/10.1016/S0168-8278(03)00353-2)
- López-Ibáñez, J., Pazos, F., y Chagoyen, M. (2016). MBROLE 2.0—functional enrichment of chemical compounds. *Nucleic Acids Res.*, *44*(1), 201-204. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw253>
- Madhusoodanan, K. S., y Murad, F. (2007). NO-cGMP signaling and regenerative medicine involving stem cells. *Neurochem. Res.*, *32*(4), 681-694. <https://doi.org/10.1007/s11064-006-9167-y>
- Mancardi, M. M., Caruso, U., Schiaffino, M. C., Baglietto, M. G., Rossi, A., Battaglia, F. M., ... y Gaggero, R. (2007). Severe epilepsy in X-linked creatine transporter defect (CRTR-D). *Epilepsia*, *48*(6), 1211-1213. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2007.01148.x>
- Mapstone, M., Cheema, A. K., Fiandaca, M. S., Zhong, X., Mhyre, T. R., MacArthur, L. H., ... y Federoff, H. J. (2014). Plasma phospholipids identify antecedent memory impairment in older adults. *Nat. Med.*, *20*(4), 415-418. <https://doi.org/10.1038/nm.3466>
- Marcaida, G., Felipo, V., Hermenegildo, C., Miñana, M. D., y Grisolia, S. (1992). Acute ammonia toxicity is mediated by the NMDA type of glutamate receptors. *FEBS lett.*, *296*(1), 67-68. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(92\)80404-5](https://doi.org/10.1016/0014-5793(92)80404-5)

- March, R. E. (1997). An introduction to quadrupole ion trap mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.*, 32(4), 351-369. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9888\(199704\)32:4<351::AID-JMS512>3.0.CO;2-Y](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9888(199704)32:4<351::AID-JMS512>3.0.CO;2-Y)
- Marino, F., Cosentino, M., Bombelli, R., Ferrari, M., Lecchini, S., & Frigo, G. (1999). Endogenous catecholamine synthesis, metabolism, storage, and uptake in human peripheral blood mononuclear cells. *Exp. Hematol.*, 27(3), 489-495. [https://doi.org/10.1016/S0301-472X\(98\)00057-5](https://doi.org/10.1016/S0301-472X(98)00057-5)
- Marti, J., Gunasekaran, G., Iyer, K., & Schwartz, M. (2015). Surgical management of noncirrhotic portal hypertension. *Clin. Liver Dis.*, 5(5), 112-115. <https://doi.org/10.1002/cld.470>
- Martín-Valenzuela, S., Borrás-Barrachina, A., Gallego, J. J., Urios, A., Mestre-Salvador, V., Correa-Ghisays, P., ... y Montoliu, C. (2020). Motor and Cognitive Performance in Patients with Liver Cirrhosis with Minimal Hepatic Encephalopathy. *J. Clin. Med.*, 9(7), 1-16. <https://doi.org/10.3390/jcm9072154>
- Matsuguma, K., Ueda, S., Yamagishi, S. I., Matsumoto, Y., Kaneyuki, U., Shibata, R., ... y Okuda, S. (2006). Molecular mechanism for elevation of asymmetric dimethylarginine and its role for hypertension in chronic kidney disease. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 17(8), 2176-2183. <https://doi.org/10.1681/ASN.2005121379>
- Matt, S. M., y Gaskill, P. J. (2019). Where is dopamine and how do immune cells see it?: dopamine-mediated immune cell function in health and disease. *J. Neuroimmune Pharmacol.*, 15(1), 114-164. <https://doi.org/10.1007/s11481-019-09851-4>
- Maugard, M., Vigneron, P. A., Bolaños, J. P., y Bonvento, G. (2020). L-Serine links metabolism with neurotransmission. *Prog. Neurobiol.*, 197(1), 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2020.101896>
- McGarry, A., Gaughan, J., Hackmyer, C., Lovett, J., Khadeer, M., Shaikh, H., ... y Moaddel, R. (2020). Cross-sectional analysis of plasma and CSF metabolomic markers in Huntington's disease for participants of varying functional disability: a pilot study. *Sci. Rep.*, 10(1), 1-13. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-77526-9>
- McKenna, M. C., Stevenson, J. H., Huang, X., y Hopkins, I. B. (2000). Differential distribution of the enzymes glutamate dehydrogenase and aspartate aminotransferase in cortical synaptic mitochondria contributes to metabolic compartmentation in cortical synaptic terminals. *Neurochem. Int.*, 37(2-3), 229-241. [https://doi.org/10.1016/S0197-0186\(00\)00042-5](https://doi.org/10.1016/S0197-0186(00)00042-5)
- Meinitzer, A., Seelhorst, U., Wellnitz, B., Halwachs-Baumann, G., Boehm, B. O., Winkelmann, B. R., y Marz, W. (2007). Asymmetrical dimethylarginine independently predicts total and cardiovascular mortality in individuals with angiographic coronary artery disease (the Ludwigshafen Risk and Cardiovascular Health study). *Clin. Chem.*, 53(2), 273-283. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2006.076711>
- Mendoza, J., y Foundas, A. (2007). *Clinical neuroanatomy: a neurobehavioral approach*. Springer Science & Business Media.
- Miletić Vukajlović, J., Drakulić, D., Pejić, S., Ilić, T. V., Stefanović, A., Petković, M., y Schiller, J. (2020). Increased plasma phosphatidylcholine/lysophosphatidylcholine ratios in patients with Parkinson's disease. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 34(4). <https://doi.org/10.1002/rcm.8595>
- Miñana, M. D., Felipo, V., Wallace, R., y Grisolia, S. (1989). Hyperammonemia decreases body fat content in rat. *FEBS Lett.*, 249(2), 261-263. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(89\)80636-2](https://doi.org/10.1016/0014-5793(89)80636-2)

- Mitoma, J., Furuya, S., y Hirabayashi, Y. (1998). A novel metabolic communication between neurons and astrocytes: non-essential amino acid L-serine released from astrocytes is essential for developing hippocampal neurons. *Neurosci. Res.*, 30(2), 195-199. [https://doi.org/10.1016/S0168-0102\(97\)00113-2](https://doi.org/10.1016/S0168-0102(97)00113-2)
- Montaner, D., y Dopazo, J. (2010). Multidimensional gene set analysis of genomic data. *PLoS one*, 5(4), 1-13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010348>
- Monfort, P., Muñoz, M. D., ElAyadi, A., Kosenko, E., y Felipo, V. (2002). Effects of hyperammonemia and liver failure on glutamatergic neurotransmission. *Metab. Brain Dis.*, 17(4), 237-250. <https://doi.org/10.1023/A:1021993431443>
- Monfort, P., Erceg, S., Piedrafita, B., Llansola, M., y Felipo, V. (2007). Chronic liver failure in rats impairs glutamatergic synaptic transmission and long-term potentiation in hippocampus and learning ability. *Eur. J. Neurosci.*, 25(7), 2103-2111. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2007.05444.x>
- Mothet, J. P., Parent, A. T., Wolosker, H., Brady Jr, R. O., Linden, D. J., Ferris, C. D., ... y Snyder, S. H. (2000). d-Serine is an endogenous ligand for the glycine site of the N-methyl-D-aspartate receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97(9), 1-6. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.9.4926>
- Mookerjee, R. P., Malaki, M., Davies, N. A., Hodges, S. J., Dalton, R. N., Turner, C., ... y Jalan, R. (2007). Increasing dimethylarginine levels are associated with adverse clinical outcome in severe alcoholic hepatitis. *Hepatology*, 45(1), 62-71. <https://doi.org/10.1002/hep.21491>
- Muneer, A. (2020). Kynurenine pathway of tryptophan metabolism in neuropsychiatric disorders: pathophysiologic and therapeutic considerations. *Clin. Psychopharmacol. Neurosci.*, 18(4), 507-526. <https://doi.org/10.9758/cpn.2020.18.4.507>
- Nakano, K., Yamaoka, K., Hanami, K., Saito, K., Sasaguri, Y., Yanagihara, N., ... y Tanaka, Y. (2011). Dopamine induces IL-6-Dependent IL-17 production via D1-like receptor on CD4 Naïve T cells and D1-like receptor antagonist SCH-23390 inhibits cartilage destruction in a human rheumatoid arthritis/SCID mouse chimera model. *J. Immunol.*, 186(6), 3745-3752. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1002475>
- O'carroll, R. E., Ebmeier, K. P., Dougall, N., Murray, C., Goodwin, G. M., Hayes, P. C., ... y Best, J. J. K. (1991). Regional cerebral blood flow and cognitive function in patients with chronic liver disease. *Lancet*, 337(8752), 1250-1253. [https://doi.org/10.1016/0140-6736\(91\)92920-W](https://doi.org/10.1016/0140-6736(91)92920-W)
- Oliva-Damaso, E., Oliva-Damaso, N., Rodriguez-Esparragon, F., Payan, J., Baamonde-Laborda, E., Gonzalez-Cabrera, F., ... y Rodriguez-Perez, J. C. (2019). Asymmetric (ADMA) and Symmetric (SDMA) Dimethylarginines in Chronic Kidney Disease: A Clinical Approach. *Int. J. Mol. Sci.*, 20(15), 1-15. <https://doi.org/10.3390/ijms20153668>
- Orfao, A. (2019). *Informe anticipando: Ciencias ómicas*. Fundación instituto Roche.
- Oria, M., Chatauret, N., Chavarria, L., Romero-Giménez, J., Palenzuela, L., Pardo-Yules, B., ... y Córdoba, J. (2010). Motor-evoked potentials in awake rats are a valid method of assessing hepatic encephalopathy and of studying its pathogenesis. *Hepatology*, 52(6), 2077-2085. <https://doi.org/10.1002/hep.23938>
- Otto, M. (2016). Modeling. En J.Wiley (Ed.), *Chemometrics: statistics and computer application in analytical chemistry* (pp. 21-231). John Wiley & Sons.

- Papouin, T., Ladépêche, L., Ruel, J., Sacchi, S., Labasque, M., Hanini, M., ... y Oliet, S. H. (2012). Synaptic and extrasynaptic NMDA receptors are gated by different endogenous coagonists. *Cell*, *150*(3), 633-646. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.06.029>
- Perticone, F., Sciacqua, A., Maio, R., Perticone, M., Maas, R., Boger, R. H., ... y Zoccali, C. (2005). Asymmetric dimethylarginine, L-arginine, and endothelial dysfunction in essential hypertension. *J. Am. Coll. Cardiol.*, *46*(3), 518-523. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2005.04.040>
- Plauth, M., Cabre, E., Riggio, O., Assis-Camilo, M., Pirlich, M., Kondrup, J., ... y Nolte, W. (2006). ESPEN guidelines on enteral nutrition: liver disease. *Clin. Nutr.*, *25*(2), 285-294. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2006.01.018>
- Prabakaran, S., Swatton, J. E., Ryan, M. M., Huffaker, S. J., Huang, J. J., Griffin, J. L., ... y Bahn, S. (2004). Mitochondrial dysfunction in schizophrenia: evidence for compromised brain metabolism and oxidative stress. *Mol. Psychiatry*, *9*(7), 684-697. <https://doi.org/10.1038/sj.mp.4001511>
- Putri, S. P., Yamamoto, S., Tsugawa, H., y Fukusaki, E. (2013). Current metabolomics: technological advances. *J. Biosci. Bioeng.*, *116*(1), 9-16. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2013.01.004>
- Rao, V. R., Qureshi, I. A., y Butterworth, R. F. (1994). Activities of monoamine oxidase-A and-B are altered in the brains of congenitally hyperammonemic sparse-fur (spf) mice. *Neurosci. Lett.*, *170*(1), 27-30. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(94\)90230-5](https://doi.org/10.1016/0304-3940(94)90230-5)
- Ratnakumari, L., Qureshi, I. A., y Butterworth, R. F. (1994). Regional amino acid neurotransmitter changes in brains of spf/Y mice with congenital ornithine transcarbamylase deficiency. *Metab. Brain Dis.*, *9*(1), 43-51. <https://doi.org/10.1007/BF01996073>
- Ratnakumari, L., Qureshi, I. A., Maysinger, D., y Butterworth, R. F. (1995). Developmental deficiency of the cholinergic system in congenitally hyperammonemic spf mice: effect of acetyl-L-carnitine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, *274*(1), 437-443.
- Ritchie, M. E., Phipson, B., Wu, D. I., Hu, Y., Law, C. W., Shi, W., y Smyth, G. K. (2015). Limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Res.*, *43*(7), 1-13. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv007>
- Rodrigo, R., Cauli, O., Gomez-Pinedo, U., Agusti, A., Hernandez-Rabaza, V., Garcia-Verdugo, J. M., y Felipe, V. (2010). Hyperammonemia induces neuroinflammation that contributes to cognitive impairment in rats with hepatic encephalopathy. *Gastroenterology*, *139*(2), 675-684. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2010.03.040>
- Rönnerberg, E., Melo, F. R., y Pejler, G. (2012). Mast cell proteoglycans. *J. Histochem. Cytochem.*, *60*(12), 950-962. <https://doi.org/10.1369/0022155412458927>
- Rose, C., Michalak, A., Pannunzio, P., Therrien, G., Quack, G., Kircheis, G., y Butterworth, R. F. (1998). L-ornithine-L-aspartate in experimental portal-systemic encephalopathy: therapeutic efficacy and mechanism of action. *Metab. Brain Dis.*, *13*(2), 147-157. <https://doi.org/10.1023/A:1020613314572>
- Rubio, T., Felipe, V., Tarazona, S., Pastorelli, R., Escudero-García, D., Tosca, J., ... y Montoliu, C. (2021). Multi-omic analysis unveils biological pathways in peripheral immune system associated to minimal hepatic encephalopathy appearance in cirrhotic patients. *Sci. Rep.*, *11*(1), 1-14. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-80941-7>

- Saito, M., Hirano, H., Yano, Y., Momose, K., Yoshida, M., y Azuma, T. (2016). Serum level of taurine would be associated with the amelioration of minimal hepatic encephalopathy in cirrhotic patients. *Hepato. Res.*, 46(2), 215-224. <https://doi.org/10.1111/hepr.12565>
- Sato, S., Namisaki, T., Furukawa, M., Saikawa, S., Kawaratani, H., Kaji, K., ... y Yoshiji, H. (2020). Effect of L-carnitine on health-related quality of life in patients with liver cirrhosis. *Biomed. Rep.*, 13(6), 1-1. <https://doi.org/10.3892/br.2020.1372>
- Salek, R. M., Xia, J., Innes, A., Sweatman, B. C., Adalbert, R., Randle, S., ... y Griffin, J. L. (2010). A metabolomic study of the CRND8 transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Neurochem. Int.*, 56(8), 937-947. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2010.04.001>
- Scalera, F., Borlak, J., Beckmann, B., Martens-Lobenhoffer, J., Thum, T., Täger, M., y Bode-Böger, S. M. (2004). Endogenous nitric oxide synthesis inhibitor asymmetric dimethyl L-arginine accelerates endothelial cell senescence. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 24(10), 1816-1822. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000141843.77133.fc>
- Schlesinger, S., Sonntag, S. R., Lieb, W., y Maas, R. (2016). Asymmetric and symmetric dimethylarginine as risk markers for total mortality and cardiovascular outcomes: a systematic review and meta-analysis of prospective studies. *PLoS One*, 11(11), 1-26. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0165811>
- Sergeeva, O. A., Chepkova, A. N., Görg, B., Rodrigues Almeida, F., Bidmon, H. J., Haas, H. L., y Häussinger, D. (2020). Histamine-induced plasticity and gene expression in corticostriatal pathway under hyperammonemia. *CNS Neurosci. Ther.*, 26(3), 355-366. <https://doi.org/10.1111/cns.13223>
- Shannon, P., Markiel, A., Ozier, O., Baliga, N. S., Wang, J. T., Ramage, D., ... y Ideker, T. (2003). Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res.*, 13(11), 2498-2504. <http://www.genome.org/cgi/doi/10.1101/gr.1239303>
- Shawcross, D. L., Davies, N. A., Williams, R., y Jalan, R. (2004a). Systemic inflammatory response exacerbates the neuropsychological effects of induced hyperammonemia in cirrhosis. *J. Hepatol.*, 40(2), 247-254. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2003.10.016>
- Shawcross, D. L., Balata, S., Olde Damink, S. W. M., Hayes, P. C., Wardlaw, J., Marshall, I., ... y Jalan, R. (2004b). Low myo-inositol and high glutamine levels in brain are associated with neuropsychological deterioration after induced hyperammonemia. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 287(3), 503-509. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00104.2004>
- Shi, X., Wang, B., Liu, Y., Zhang, J., Huang, Y., Cao, P., ... y Lyu, J. (2017). Carnosine modulates glutamine synthetase expression in senescent astrocytes exposed to oxygen-glucose deprivation/recovery. *Brain Res. Bull.*, 100(130), 138-145. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2017.01.014>
- Silva-Marques, B., Gianlorenço, A. C. L., y Mattioli, R. (2016). Intracerebellar vermis histamine facilitates memory consolidation in the elevated T maze model. *Neurosci. Lett.*, 620(1), 33-37. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2016.03.010>
- Small, S. A., Schobel, S. A., Buxton, R. B., Witter, M. P., y Barnes, C. A. (2011). A pathophysiological framework of hippocampal dysfunction in ageing and disease. *Nat. Rev. Neurosci.*, 12(10), 585-601. <https://doi.org/10.1038/nrn3085>
- Smilde, A. K., van der Werf, M. J., Bijlsma, S., van der Werff-van der Vat, B. J., y Jellema, R. H. (2005). Fusion of mass spectrometry-based metabolomics data. *Anal. Chem.*, 77(20), 6729-6736. <https://doi.org/10.1021/ac051080y>

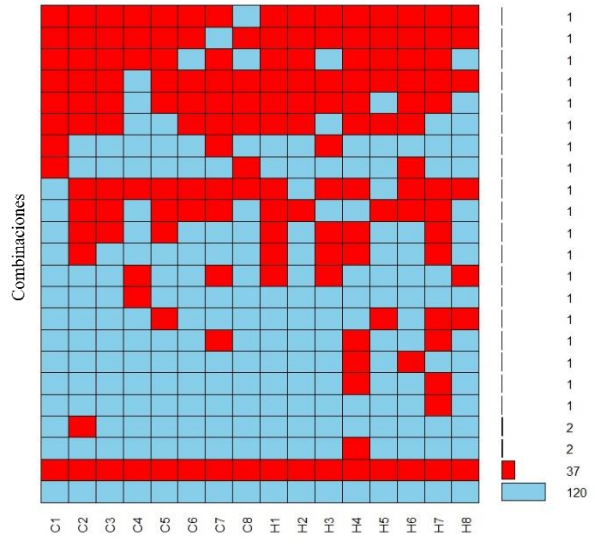
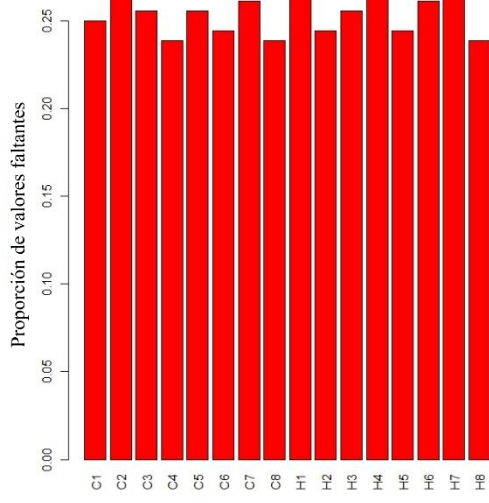
- Snyder, S. H., y Ferris, C. D. (2000). Novel neurotransmitters and their neuropsychiatric relevance. *Am. J. Psychiatry*, 157(11), 1738-1751. <https://doi.org/10.1176/appi.ajp.157.11.1738>
- Spahr, L., Coeytaux, A., Giostra, E., Hadengue, A., y Annoni, J. M. (2007). Histamine H1 blocker hydroxyzine improves sleep in patients with cirrhosis and minimal hepatic encephalopathy: a randomized controlled pilot trial. *Am. J. Gastroenterol.*, 102(4), 744-753. <https://doi.org/10.1111/j.1572-0241.2006.01028.x>
- Staedt, U., Leweling, H., Gladisch, R., Kortsik, C., Hagmüller, E., y Holm, E. (1993). Effects of ornithine aspartate on plasma ammonia and plasma amino acids in patients with cirrhosis. A double-blind, randomized study using a four-fold crossover design. *J. Hepatol.*, 19(3), 424-430. [https://doi.org/10.1016/S0168-8278\(05\)80553-7](https://doi.org/10.1016/S0168-8278(05)80553-7)
- Stinton, L. M., & Jayakumar, S. (2013). Minimal hepatic encephalopathy. *Can. J. Gastroenterol.*, 27(10), 572-574. <https://doi.org/10.1155/2013/547670>
- Sverdllov, A. L., Ngo, D. T., Chan, W. P., Chirkov, Y. Y., y Horowitz, J. D. (2014). Aging of the nitric oxide system: are we as old as our NO?. *J. Am. Heart Assoc.*, 3(4), 1-13. <https://doi.org/10.1161/JAHA.114.000973>
- Tabatabaie, L., Klomp, L. W., Berger, R., y De Koning, T. J. (2010). L-serine synthesis in the central nervous system: a review on serine deficiency disorders. *Mol. Genet. Metab.*, 99(3), 256-262. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2009.10.012>
- Tain, Y. L., Kao, Y. H., Hsieh, C. S., Chen, C. C., Sheen, J. M., Lin, I. C., y Huang, L. T. (2010). Melatonin blocks oxidative stress-induced increased asymmetric dimethylarginine. *Free Radic. Biol. Med.*, 49(6), 1088-1098. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.06.029>
- Tarazona, S., Carmona, H., Conesa, A., Llansola, M., y Felipe, V. (2021). A multi-omic study for uncovering molecular mechanisms associated with hyperammonemia-induced cerebellar function impairment in rats. *Cell Biol. Toxicol.*, 37(1), 129-149. <https://doi.org/10.1007/s10565-020-09572-y>
- Thévenot, E. A., Roux, A., Xu, Y., Ezan, E., y Junot, C. (2015). Analysis of the human adult urinary metabolome variations with age, body mass index, and gender by implementing a comprehensive workflow for univariate and OPLS statistical analyses. *J. Proteome Res.*, 14(8), 3322-3335. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.5b00354>
- Thurm, A., Himelstein, D., D'Souza, P., Rennert, O., Jiang, S., Olatunji, D., ... y Carrillo, N. (2016). Creatine transporter deficiency: screening of males with neurodevelopmental disorders and neurocognitive characterization of a case. *J. Dev. Behav. Pediatr.*, 37(4), 322. <https://doi.org/10.1097/DBP.0000000000000299>
- Vasilopoulou, C. G., Margarity, M., y Klapa, M. I. (2016). Metabolomic analysis in brain research: opportunities and challenges. *Front. Physiol.*, 7(183), 1-8. <https://doi.org/10.3389/fphys.2016.00183>
- Verpoorte, R., Choi, Y. H., y Kim, H. K. (2007). NMR-based metabolomics at work in phytochemistry. *Phytochem. Rev.*, 6(1), 3-14. <https://doi.org/10.1007/s11101-006-9031-3>
- Vilstrup, H., Amodio, P., Bajaj, J., Cordoba, J., Ferenci, P., Mullen, K. D., ... 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), 715-735. <https://doi.org/10.1002/hep.27210>

- Vinaixa, M., Samino, S., Saez, I., Duran, J., Guinovart, J. J., y Yanes, O. (2012). A guideline to univariate statistical analysis for LC/MS-based untargeted metabolomics-derived data. *Metabolites*, 2(4), 775-795. <https://doi.org/10.3390/metabo2040775>
- Walker, V. (2014). Ammonia metabolism and hyperammonemic disorders. *Adv. Clin. Chem.*, 67, 73-150. <https://doi.org/10.1016/bs.acc.2014.09.002>
- Wagenmakers, A. J. M., Coakley, J. H., y Edwards, R. H. T. (1990). Metabolism of branched-chain amino acids and ammonia during exercise: clues from McArdle's disease. *Int. J. Sports Med.*, 11(2), 101-113. <https://doi.org/10.1055/s-2007-1024861>
- Watson, A., Karp, J., Walker, W. G., Chambers, T., Risch, V., & Brusilow, S. (1985). Transient idiopathic hyperammonaemia in adults. *Lancet*, 326(8467), 1271-1274. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(85\)91554-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(85)91554-5)
- Weiss, N., Saint Hilaire, P. B., Colsch, B., Isnard, F., Attala, S., Schaefer, A., ... y Junot, C. (2016). Cerebrospinal fluid metabolomics highlights dysregulation of energy metabolism in overt hepatic encephalopathy. *J. Hepatol.*, 65(6), 1120-1130. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2016.07.046>
- Kielstein, J. T., Bode-Böger, S. M., Frölich, J. C., Ritz, E., Haller, H., y Fliser, D. (2003). Asymmetric dimethylarginine, blood pressure, and renal perfusion in elderly subjects. *Circulation*, 107(14), 1891-1895. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000060496.23144.A7>
- Whiley, L., Sen, A., Heaton, J., Proitsi, P., García-Gómez, D., Leung, R., ... y AddNeuroMed Consortium. (2014). Evidence of altered phosphatidylcholine metabolism in Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging*, 35(2), 271-278. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2013.08.001>
- Williams, R., Schalm, S. W., y O'Grady, J. G. (1993). Acute liver failure: redefining the syndromes. *Lancet*, 342(8866), 273-275. [https://doi.org/10.1016/0140-6736\(93\)91818-7](https://doi.org/10.1016/0140-6736(93)91818-7)
- Wipf, P., Skoda, E. M., y Mann, A. (2015). Conformational restriction and steric hindrance in medicinal chemistry. En *The practice of medicinal chemistry* (pp. 279-299). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417205-0.00011-0>
- Withers, S. B., Forman, R., Meza-Perez, S., Sorobetea, D., Sitnik, K., Hopwood, T., ... y Cruickshank, S. M. (2017). Eosinophils are key regulators of perivascular adipose tissue and vascular functionality. *Sci. Rep.*, 7(1), 1-12. <https://doi.org/10.1038/srep44571>
- Wold, S., Johansson, E., y Cocchi, M. (1993). PLS: partial least squares projections to latent structures. En H. Kubinyi (Ed.), *3D QSAR in Drug Design: Theory, Methods and Applications* (pp. 523-550). KLUWER ESCOM Science Publisher.
- Wu, T., Sheng, Y., Qin, Y. Y., Kong, W. M., Jin, M. M., Yang, H. Y., ... y Liu, L. (2021). Bile duct ligation causes opposite impacts on the expression and function of BCRP and P-gp in rat brain partly via affecting membrane expression of ezrin/radixin/moesin proteins. *Acta Pharmacol. Sin.*, 1-9. <https://doi.org/10.1038/s41401-020-00602-3>
- Yabut, J. M., Desjardins, E. M., Chan, E. J., Day, E. A., Leroux, J. M., Wang, B., ... y Steinberg, G. R. (2020). Genetic deletion of mast cell serotonin synthesis prevents the development of obesity and insulin resistance. *Nat. Commun.*, 11(1), 1-11. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-14080-7>
- Yan, S. L., Wu, S. T., Yin, M. C., Chen, H. T., y Chen, H. C. (2009). Protective effects from carnosine and histidine on acetaminophen-induced liver injury. *J. Food Sci.*, 74(8), 259-265. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2009.01330.x>

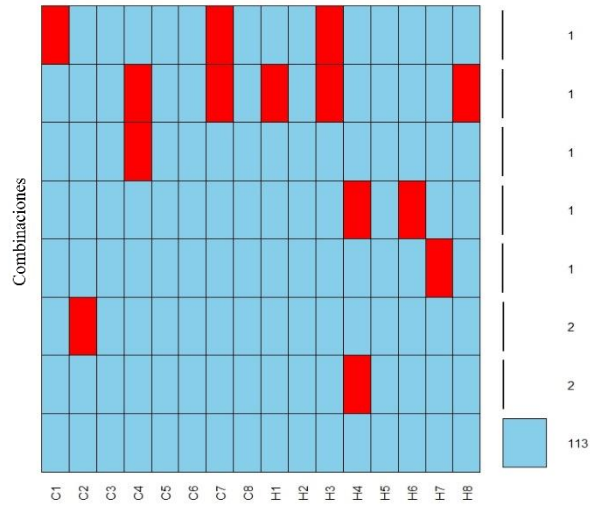
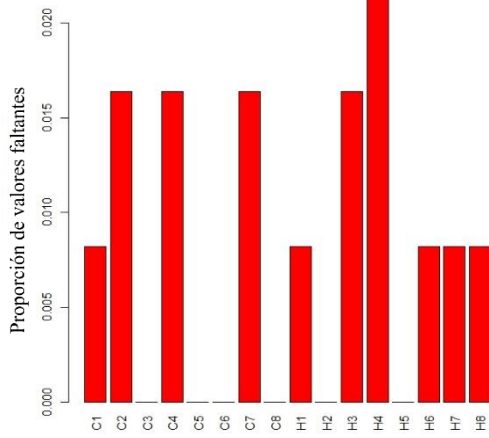
- Yang, J., Chen, T., Sun, L., Zhao, Z., Qi, X., Zhou, K., ... y Wan, C. (2013). Potential metabolite markers of schizophrenia. *Mol. Psychiatry*, 18(1), 67-78. <https://doi.org/10.1038/mp.2011.131>
- Yoshimi, N., Futamura, T., Bergen, S. E., Iwayama, Y., Ishima, T., Sellgren, C., ... y Hashimoto, K. (2016). Cerebrospinal fluid metabolomics identifies a key role of isocitrate dehydrogenase in bipolar disorder: evidence in support of mitochondrial dysfunction hypothesis. *Mol. Psychiatry*, 21(11), 1504-1510. <https://doi.org/10.1038/mp.2015.217>
- Zhang, J., Zhang, M., Sun, B., Li, Y., Xu, P., Liu, C., ... y Liu, X. (2014). Hyperammonemia enhances the function and expression of P-glycoprotein and Mrp2 at the blood–brain barrier through NF- κ B. *J. Neurochem.*, 131(6), 791-802. <https://doi.org/10.1111/jnc.12944>
- Zhang, J., Zhuang, Q. X., Li, B., Wu, G. Y., Yung, W. H., Zhu, J. N., y Wang, J. J. (2016a). Selective modulation of histaminergic inputs on projection neurons of cerebellum rapidly promotes motor coordination via HCN channels. *Mol. Neurobiol.*, 53(2), 1386-1401. <https://doi.org/10.1007/s12035-015-9096-3>
- Zhang, X., Wang, Y., Dong, H., Xu, Y., y Zhang, S. (2016b). Induction of microglial activation by mediators released from mast cells. *Cell. Physiol. Biochem.*, 38(4), 1520-1531. <https://doi.org/10.1159/000443093>
- Zielińska, M., Popek, M., y Albrecht, J. (2014). Roles of changes in active glutamine transport in brain edema development during hepatic encephalopathy: an emerging concept. *Neurochem. Res.*, 39(3), 599-604. <https://doi.org/10.1007/s11064-013-1141-x>
- Zhou, Y., Zhou, J., Li, P., Xie, Q., Sun, B., Li, Y., ... y Liu, L. (2019). Increase in P-glycoprotein levels in the blood-brain barrier of partial portal vein ligation/chronic hyperammonemia rats is mediated by ammonia/reactive oxygen species/ERK1/2 activation: In vitro and in vivo studies. *Eur. J. Pharmacol.*, 846(1), 119-127. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2019.01.005>
- Zoccali, C., Bode-Böger, S. M., Mallamaci, F., Benedetto, F. A., Tripepi, G., Malatino, L. S., ... y Böger, R. H. (2001). Plasma concentration of asymmetrical dimethylarginine and mortality in patients with end-stage renal disease: a prospective study. *Lancet*, 358(9299), 2113-2117. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(01\)07217-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(01)07217-8)
- Zwingmann, C., Desjardins, P., Hazell, A., Chatauret, N., Michalak, A., y Butterworth, R. F. (2002). Reduced expression of astrocytic glycine transporter (Glyt-1) in acute liver failure. *Metab. Brain Dis.*, 17(4), 263-273. <https://doi.org/10.1023/A:1021997532352>

ANEXOS

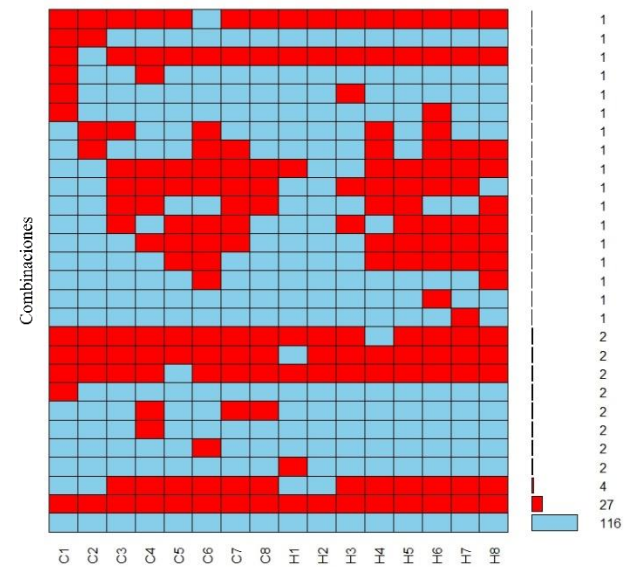
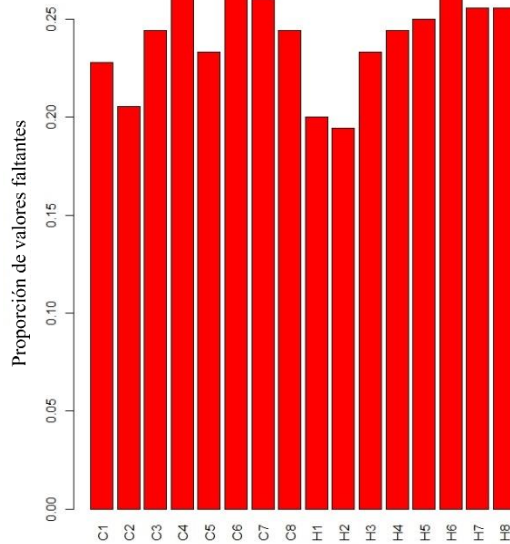
1. CBLO sin filtrar



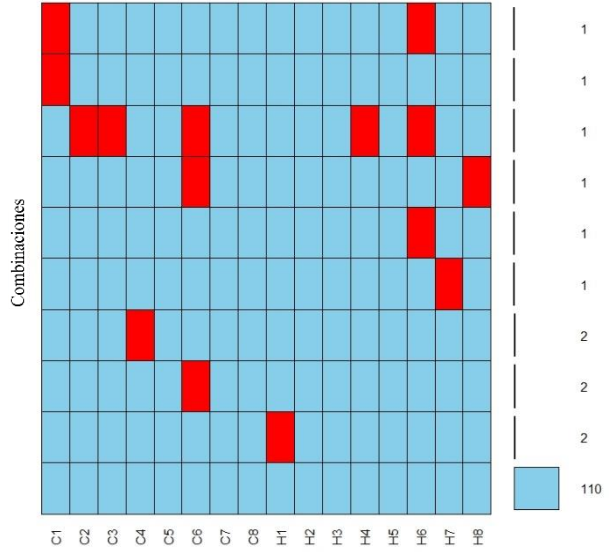
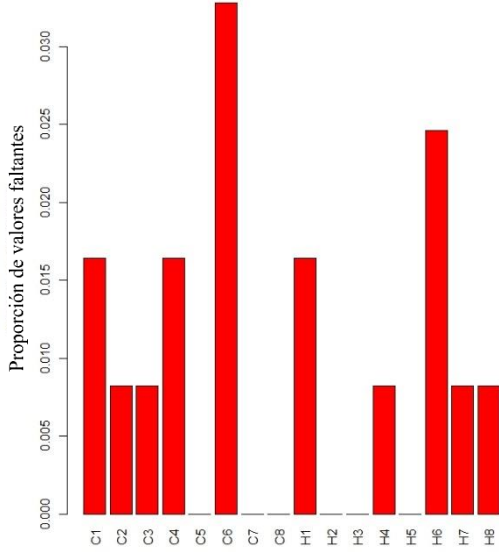
2. CBLO filtrado



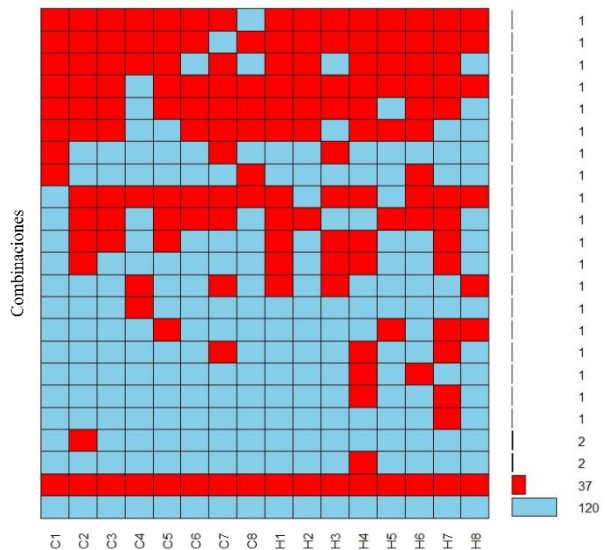
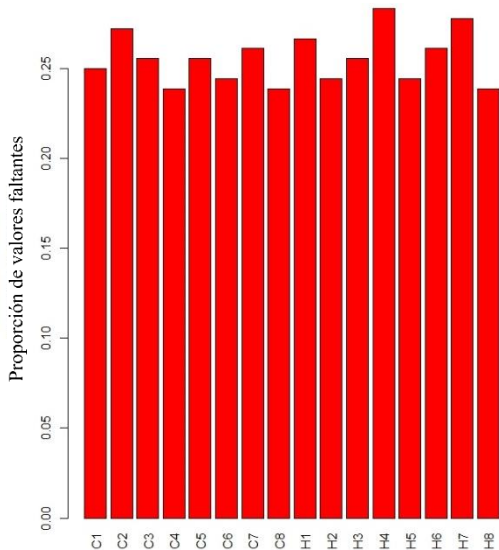
3. CX sin filtrar



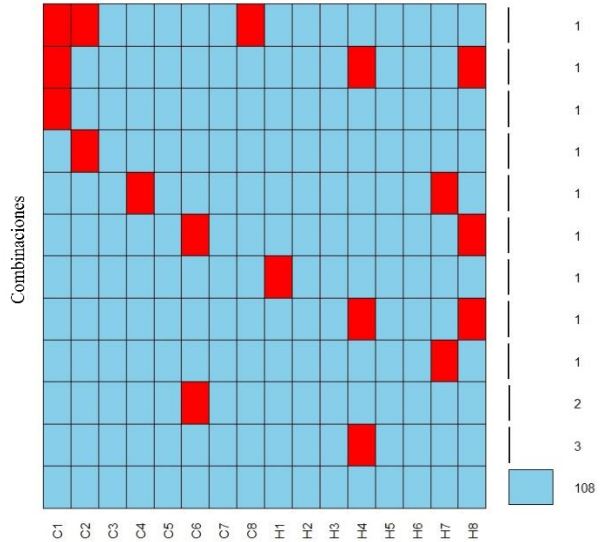
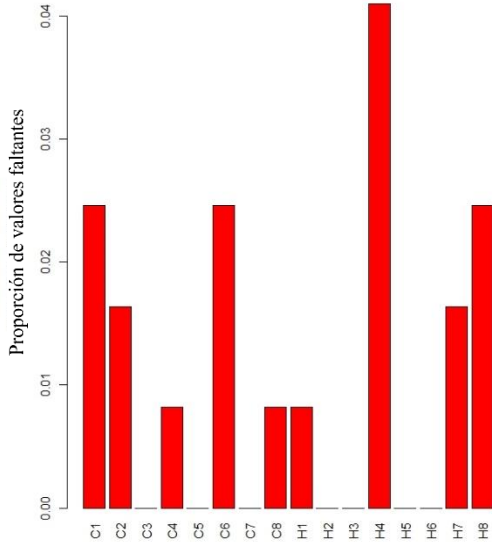
4. CX filtrado



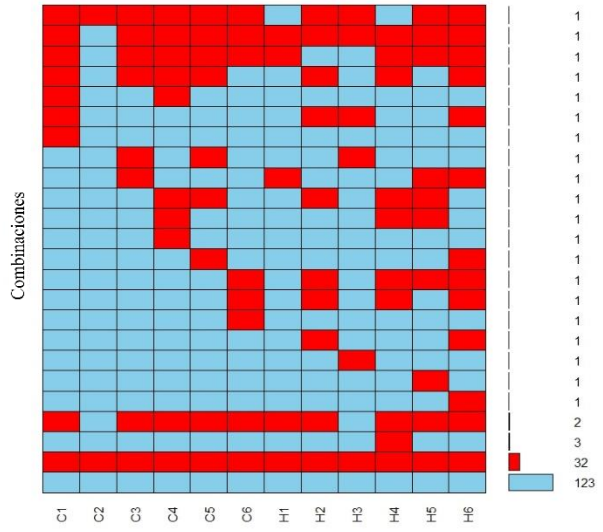
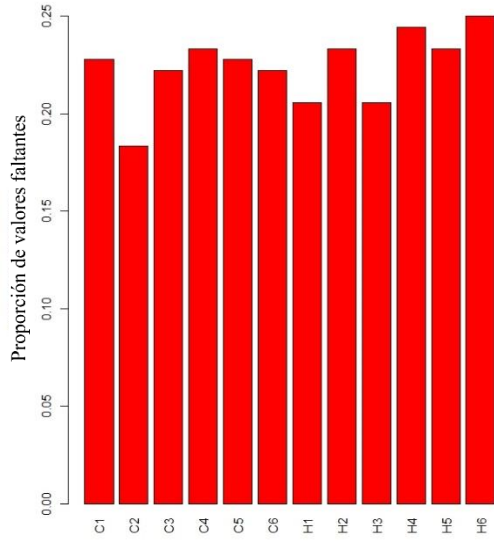
5. HP sin filtrar



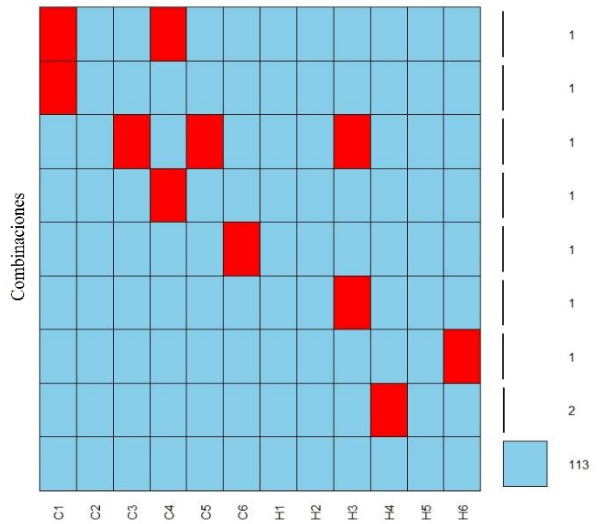
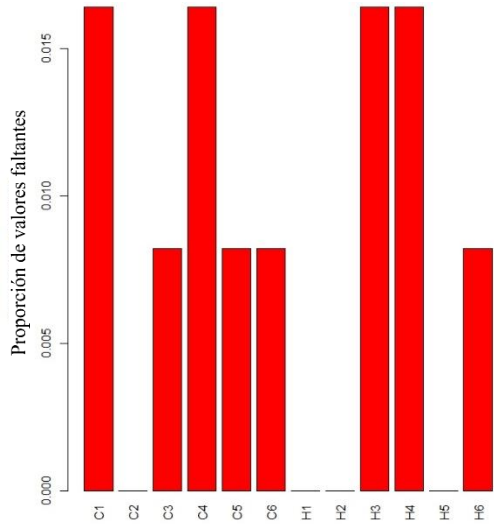
6. HP filtrado



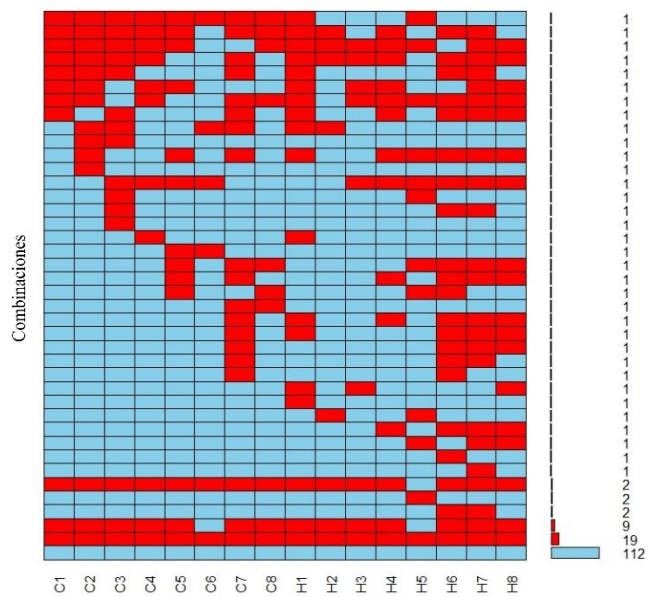
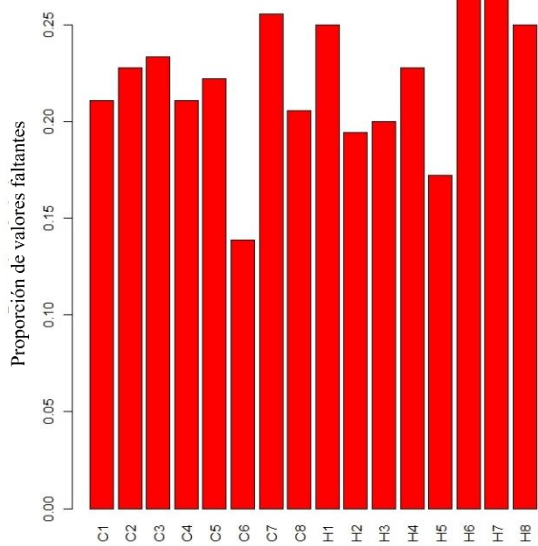
7. PL2W sin filtrar



8. PL2W filtrado



9. PL4W sin filtrar



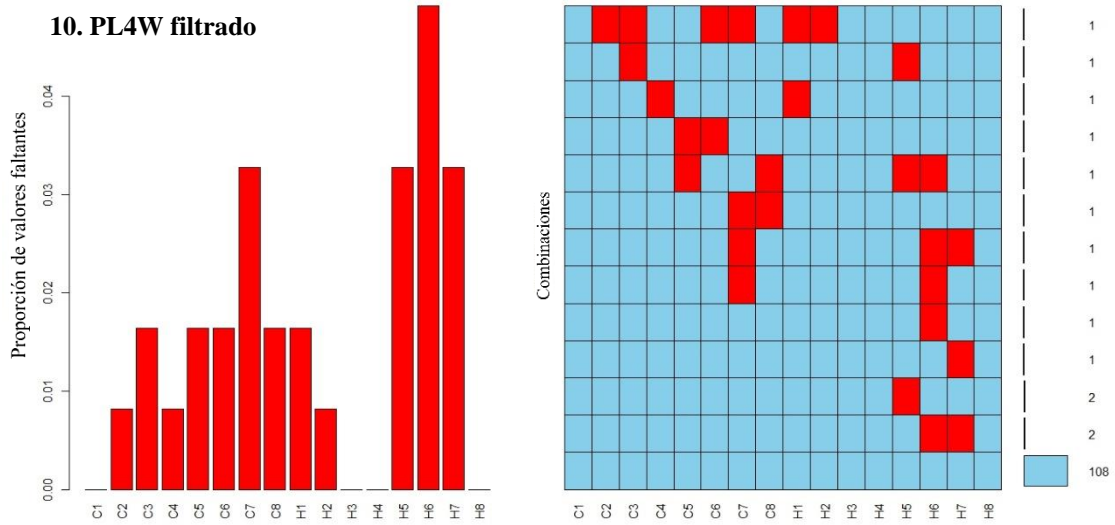
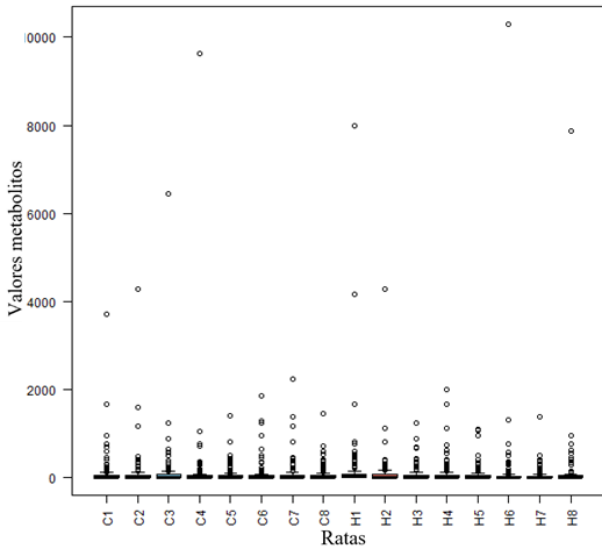
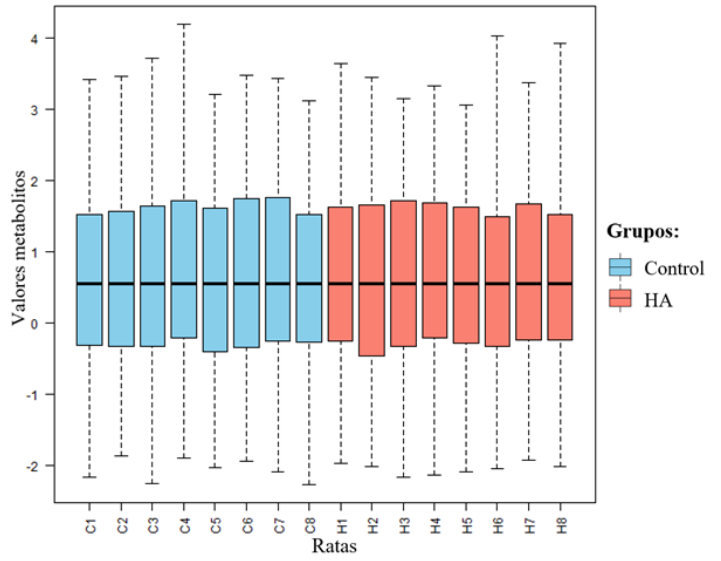


Figura Suplementaria 1. Distribución de valores faltantes. Los gráficos de la izquierda representan el porcentaje de valores faltantes por muestra. A la derecha se muestran todas las combinaciones existentes de valores faltantes (rojo) y observados (azul) así como el número de veces que se repite. Los números impares en la parte superior izquierda de cada gráfica representan la distribución de valores faltantes antes de aplicar la regla del 80%, mientras que los números pares representan la distribución de valores faltantes después de aplicar el filtro. En el eje inferior de cada gráfico se representan las muestras correspondientes a cada rata: **C**, control; **H**, HA.

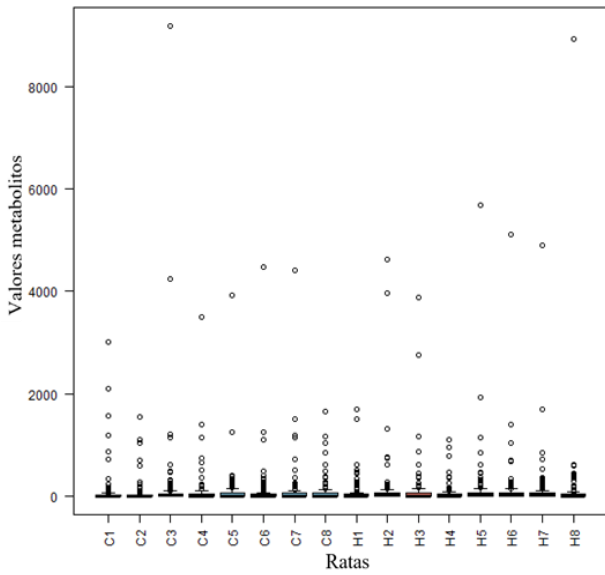
CX datos crudos



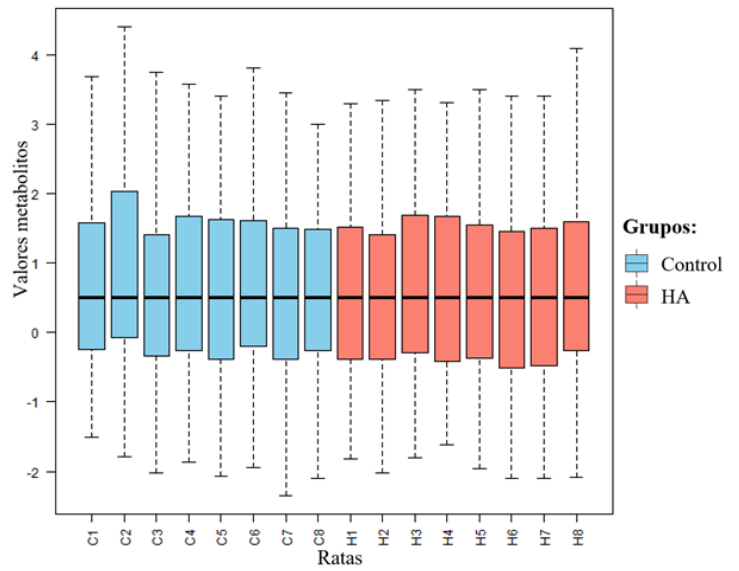
CX log y normalización mediana



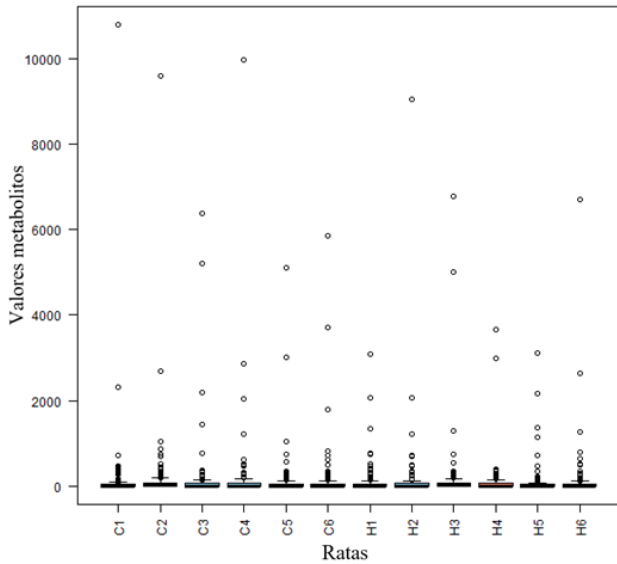
HP datos crudos



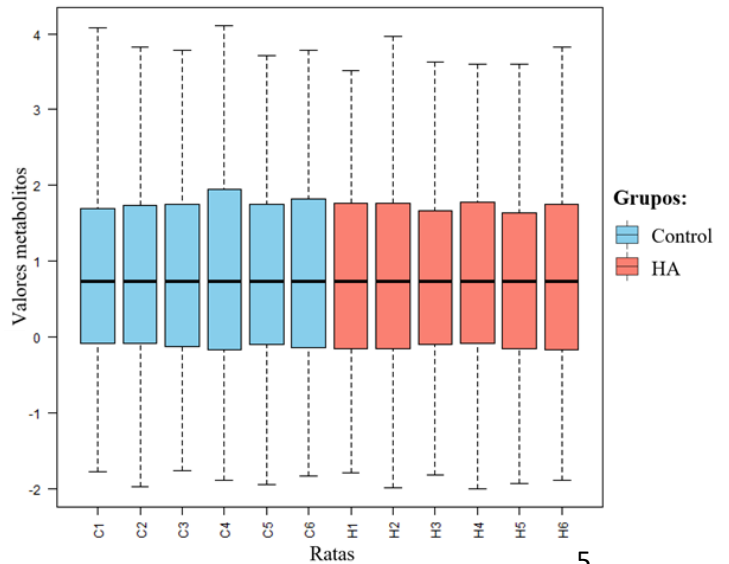
HP log y normalización mediana



PL2W datos crudos



PL2W log y normalización mediana



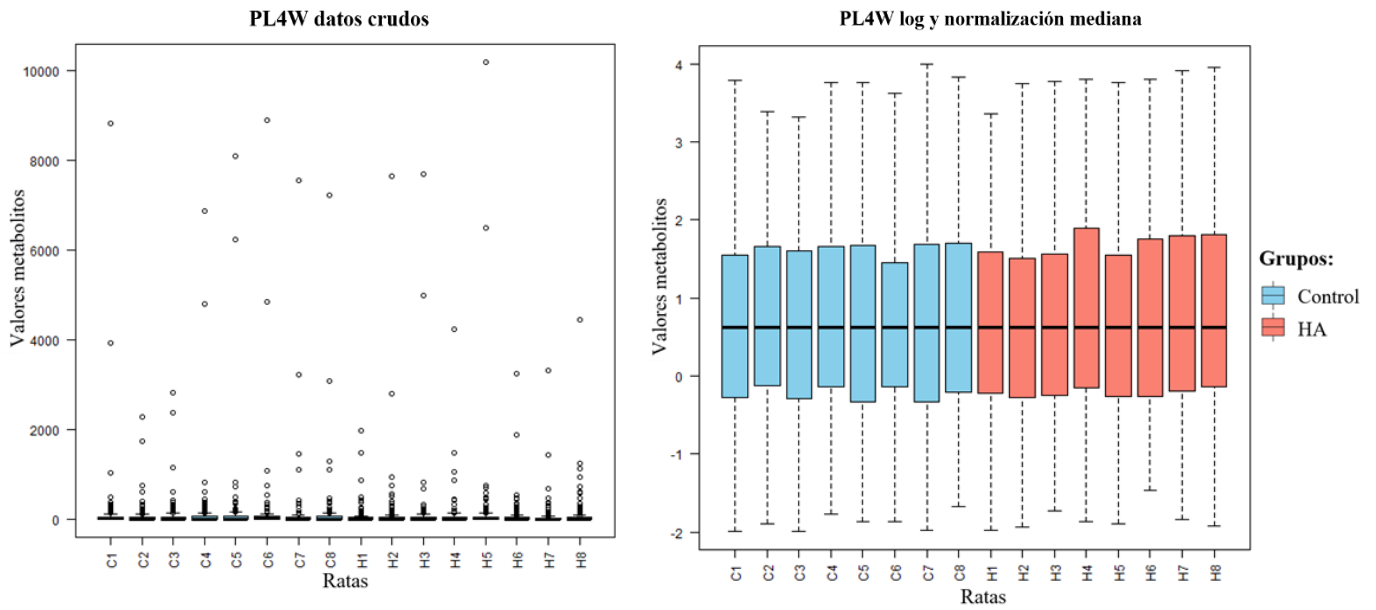


Figura Suplementaria 2. Diagramas de cajas y bigotes de valores correspondientes a muestras de CX, HP, PL2W y PL4W. A la izquierda se muestran los datos crudos y a la derecha los datos después de realizar la transformación logarítmica y la normalización por la mediana. **C**, control; **H**, HA.

Tabla Suplementaria 1. Metabolitos con cambios significativos en HA utilizando modelos lineales.

	CBLO	CX	HP	PL2W	PL4W
RP^(a)	4	0	0	1	7
RN^(b)	0	0	2	7	9
Total	4	0	2	8	16
Porcentaje^(c)	3,28%	0%	1,64%	6,56%	13,11%

^(a)Regulación positiva, mayor concentración en HA; ^(b)Regulación negativa, menor concentración en HA; ^(c) Porcentaje de metabolitos con cambios significativos entre ambas condiciones con respecto el total.

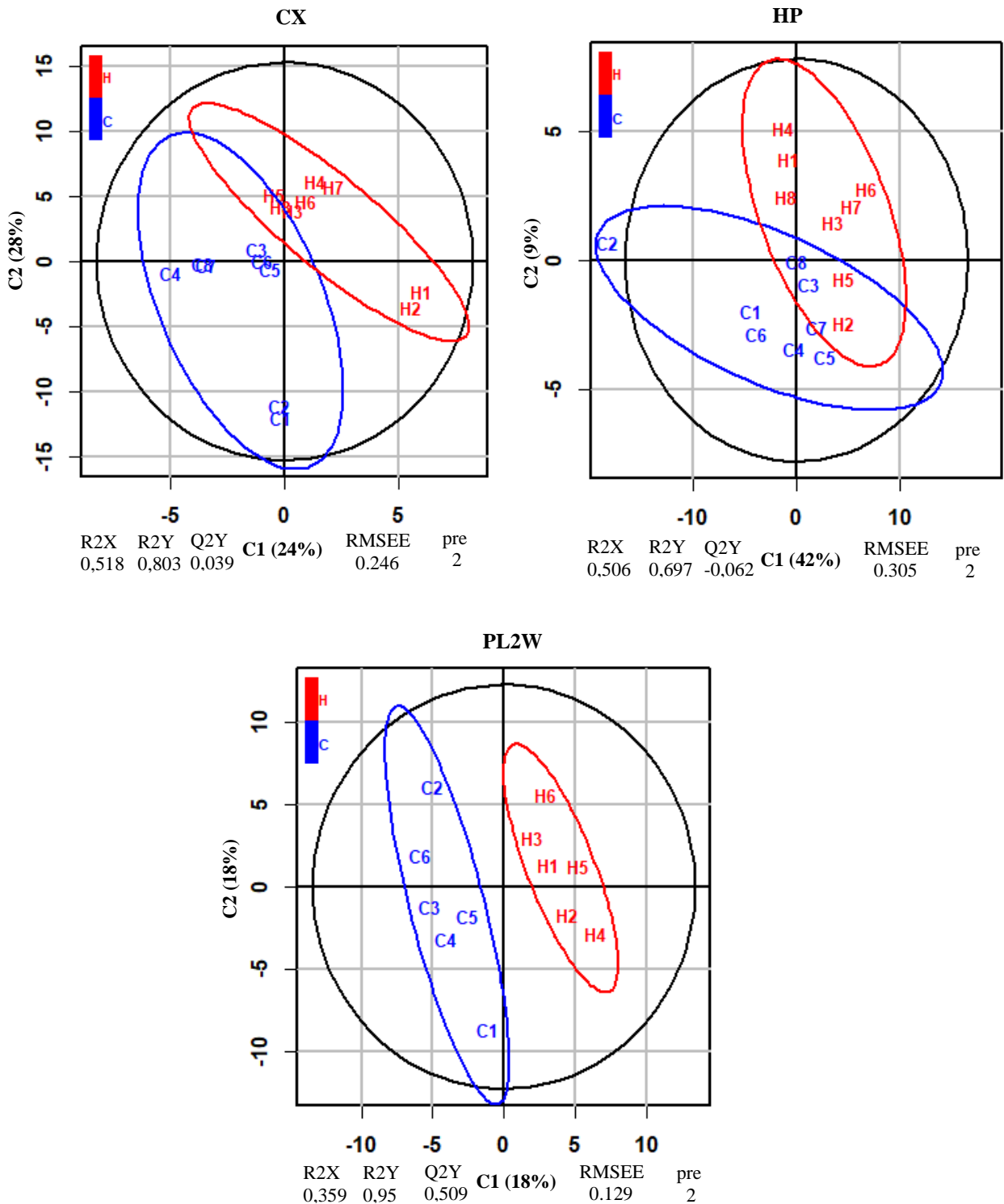


Figura Suplementaria 3. Gráfico de scores del modelo PLS-DA para las dos primeras componentes en CX, HP y PL2W. Las dos primeras componentes separan perfectamente las ratas por grupos. En el caso del PL2W la primera componente ya es capaz de explicar esta separación entre control e HA. C, control; H, HA; C1, primera componente; C2, segunda componente. Entre paréntesis, el porcentaje de varianza de los datos metabólicos explicado por cada componente.