

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA AGRONÒMICA
I DEL MEDI NATURAL



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



PRINCIPE FELIPE
CENTRO DE INVESTIGACION

Papel del receptor de glicina en la expresión en membrana de receptores ionotrópicos de glutamato en cerebelo e hipocampo. Alteraciones en modelos animales de encefalopatía hepática.

TRABAJO FIN DE GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

ALUMNO: David Canet López

TUTORES: Dr. Vicente Felipo Orts y Francisco Marco Jiménez

Curso académico: 2015-2016

València, Julio 2016



ALUMNO: David Canet López

TUTORES: Dr. Vicente Felipo Orts y Francisco Marco Jiménez

FECHA: València, Julio 2015

TÍTULO

Papel del receptor de glicina en la expresión en membrana de receptores ionotrópicos de glutamato en cerebelo e hipocampo. Alteraciones en modelos animales de encefalopatía hepática

RESUMEN

La encefalopatía hepática (EH) es un síndrome neuropsiquiátrico complejo, que se puede presentar en pacientes con enfermedades hepáticas crónicas o agudas. Se caracteriza por una progresiva alteración de funciones cognitivas, motoras y del sueño como consecuencia del fallo hepático y puede progresar en diferentes estadios hasta el coma y la muerte. Los mecanismos que conducen a las alteraciones neurológicas en la EH todavía no están bien establecidos pero comienzan a identificarse en modelos animales. La hipótesis más aceptada actualmente acerca de las bases neurobiológicas de la EH apuntan a una combinación sinérgica de dos factores: la elevada concentración de amonio o hiperamonemia, debida a la deficiente eliminación en el hígado de esta toxina y la neuroinflamación. Estos dos factores conducen a alteraciones en la neurotransmisión glutamatérgica que es responsable del deterioro cognitivo y motor. Uno de los mecanismos que podría contribuir a la alteración de la neurotransmisión es un cambio en la expresión en membrana de receptores de los neurotransmisores glutamato.

El tratamiento crónico con GMPc restaura la capacidad de aprendizaje y memoria en modelos animales de encefalopatía hepática. Recientemente, se ha descrito que el GMPc extracelular modula la función del receptor de glicina. El presente trabajo pretende analizar si un antagonista del receptor de glicina afecta a la expresión en membrana, en cerebelo e hipocampo, de receptores ionotrópicos (NMDA, AMPA) implicados en procesos de aprendizaje y memoria. Se utilizarán cortes de cerebro ex vivo para estudiar la expresión en membrana de dichos receptores y su implicación en el deterioro cognitivo y motor en modelos animales de encefalopatía hepática.

En este trabajo se ha visto que la inhibición del receptor de glicina modula la expresión en membrana de los receptores NMDA y AMPA y puede restaurar los niveles de expresión en membrana de algunas de sus subunidades en hiperamonemia crónica. Y al comparar los

resultados con estudios de GMPc, se puede afirmar que podría ser el mediador de los efectos del GMPc extracelular sobre la expresión en membrana de los receptores NMDA y AMPA en cerebelo e hipocampo.

PALABRAS CLAVE

Encefalopatía hepática, hiperamonemia, receptores ionotrópicos, NMDA, AMPA, expresión en membrana

STUDENT: David Canet López

PROFESSORS: Dr. Vicente Felipo Orts y Francisco Marco Jiménez

DATE: València, Julio 2015

TITLE

Glycine receptor role in membrane expression of glutamate ionotropic receptors in cerebellum and hippocampus. Alterations in animal models of hepatic encephalopathy.

ABSTRACT

Hepatic encephalopathy (HE) is a complex neuropsychiatric syndrome, which can be present in patients with acute or chronic liver disease. It is characterized by progressive alterations of cognitive functions, motor and sleep as a result of liver failure and it can progress at different stages to coma and death. The mechanisms that lead to neurological disorders in HE are not well established but they begin to be identified in animal models. The most accepted hypothesis about the neurobiological basis of the HE indicate a synergistic combination of two factors: the high concentration of ammonium or hyperammonemia, due to poor elimination of this toxin in the liver and neuroinflammation. These two factors lead to alterations in glutamatergic neurotransmission that are responsible of cognitive and motor impairment. One of the mechanisms that could contribute to altered neurotransmission is a change in membrane receptor expression of glutamate neurotransmitters.

Chronic treatment with cGMP restores the ability of learning and memory in animal models of hepatic encephalopathy. Recently, it has been described that extracellular cGMP modulates glycine receptor function. The aim of this study is to analyze whether a glycine receptor antagonist affects membrane expression of ionotropic receptors in cerebellum and hippocampus (NMDA, AMPA) involved in learning and memory processes. Ex vivo brain slices will be used to study membrane expression of these receptors and their involvement in cognitive and motor impairment in animal models of hepatic encephalopathy.

In this paper we have seen that inhibition of glycine receptor modulates membrane expression of NMDA and AMPA receptors and can restore the levels of membrane expression of some of its subunits in chronic hyperammonemia. Comparing the results with studies of cGMP, we can say that it could be the mediator of the effects of extracellular cGMP on the membrane expression of NMDA and AMPA receptors in cerebellum and hippocampus.

KEYWORDS

Hepatic encephalopathy, hyperammonemia, ionotropic receptors NMDA, AMPA, membrane expression

Agradecimientos

Agrair en primer lloc a les dues persones que han estat en mi, ajudant-me i ensenyant-me durant els tres mesos que he estat en el laboratori de Neurobiologia, a Lucas i Andrea. També, per supost, a totes les persones del laboratori que m'han fet sentir com a casa.

Com no, agrair a tota la meua família el suport durant tots aquests anys, sense ells tot açò hauria sigut impossible. Gràcies per suportar-me durant els moments més durs del curs i motivar-me en els moments més difícils.

I, finalment, agrair als meus companys i amics que han fet que aquests quatre anys en el Grau de Biotecnologia siguen molt especials. Eixes hores interminables en la biblioteca amb ells han fet possible aquest treball.

Gràcies.

“Si quieres ir rápido, camina solo; si quieres llegar lejos, ve acompañado”.

Índice

1. Introducción	1
1.1 Encefalopatía hepática.....	1
1.2 Modelos animales.....	2
1.3 Neurotransmisión glutamatérgica.....	3
1.4 Estudio del cerebelo e hipocampo.....	4
1.4.1 Cerebelo.....	4
1.4.2 Hipocampo.....	6
1.5 Receptor de Glicina.....	9
2. Hipótesis	10
3. Objetivos	10
4. Materiales y métodos	11
4.1 Modelo animal.....	11
4.2 Obtención de muestras.....	11
4.2.1 Hipocampo.....	11
4.2.2 Cerebelo.....	12
4.3 Tratamiento de los cortes.....	12
4.4 Determinación cantidad proteína.....	13
4.5 Análisis por <i>Western Blot</i>	13
4.6 Análisis estadístico.....	15
5. Resultados y discusión	16
5.1 Resultados de expresión en membrana de los receptores NMDA y AMPA en cerebelo .	16
5.1.1 Expresión en membrana del receptor NMDA: NR1, NR2A y NR2B.....	16
5.1.2 Expresión en membrana del receptor AMPA: GluR1 y GluR2.....	17
5.2 Resultados de expresión en membrana de los receptores NMDA y AMPA en hipocampo	20
5.2.1 Expresión en membrana del receptor NMDA: NR1, NR2A y NR2B.....	20
5.2.2 Expresión en membrana del receptor AMPA: GluR1 y GluR2.....	21
6. Conclusiones	24
7. Bibliografía	26

Índice de Figuras

Figure 1. Cerebelo, alteración de la vía Glu-NO-GMPc en EH.....	5
Figure 2. Laberinto en Y.	6
Figure 3. Hipocampo, alteración de la LTP en EH.	7
Figure 4. Laberinto acuático de Morris y laberinto radial.	8
Figure 5. Modulación del rGly por GMPc extracelular.....	9
Figure 6. Sistema de perfusión.	11
Figure 7. Crosslinker BS ³	15
Figure 8. Expresión en membrana de las subunidades NR1 (a) y NR2A (b) del receptor NMDA en cerebelo de ratas control e hiperamonémicas.	16
Figure 9. Expresión en membrana de la subunidad NR2B del receptor NMDA en cerebelo de ratas control e hiperamonémicas.	17
Figure 10. Expresión en membrana de las subunidades GluR1 (a) y GluR2 (b) del receptor AMPA en cerebelo de ratas control e hiperamonémicas.	18
Figure 11. Expresión en membrana de las subunidades NR1 (a) y NR2A (b) del receptor NMDA en hipocampo de ratas control e hiperamonémicas.	20
Figure 12. Expresión en membrana de la subunidad NR2B del receptor NMDA en hipocampo de ratas control e hiperamonémicas.	21
Figure 13. Expresión en membrana de las subunidades GluR1 (a) y GluR2 (b) del receptor AMPA en hipocampo de ratas control e hiperamonémicas.	22

Índice de Tablas

Tabla 1. Anticuerpos primarios y secundarios, y diluciones utilizadas.....	14
Tabla 2. Comparación de la expresión en membrana de las subunidades de NMDA y AMPA al tratar las ratas controles y hiperamonémicas con estricnina y GMPc (estudios anteriores).	23

Abreviaturas

°C: Grados Centígrados

μM: micromolar

AMPA: α-amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico

ANOVA: Análisis de la Varianza

BCIP: 1H-Indol-3-ol, 5-bromo-4-chloro-dihydrogen phosphate

BS³: Bis[sulfosuccinimidyl] Suberate

BSA: Albúmina de Suero Bovino

Ca²⁺: Ion Calcio

CaCl₂: Cloruro cálcico

CAMKII: protein quinasa dependiente de calcio/calmodulina

Cl⁻: Ion Cloro

CM: Calmodulina

CO₂: Dióxido de Carbono

EGTA: Etilen Glicol Ácido Tetraacético

EH: Encefalopatía Hepática

EHM: Encefalopatía Hepática Mínima

f.a.: fosfatasa alcalina

Glu-NO-GMPc: ruta glutamato-óxido nítrico-GMPc

GMPc: guanosín monofosfato cíclico

HCl: Ácido Clorhídrico

IL-6: Interleucina 6

IL-8: Interleucina 8

K⁺: Ion Potasio

KCl: Cloruro de Potasio

KH₂PO₄: Fosfato de Monopotasio

LTP: Potenciación a Largo Plazo

mA: miliAmperios

Mg⁺: Ion Magnesio

MgCl₂: Cloruro de Magnesio

Na⁺: Ion Sodio

NaCl: Cloruro de Sodio

NaF: Fluoruro de Sodio

NaHCO₃: Bicarbonato de Sodio

NBT: Tetrazolium, (3,3'-dimethoxy-4,4'-biphenylene)bis[2,(4-nitrophenyl)-5-phenyl-2H]

NMDA: N-metil-D-aspartato

NO: Óxido Nítrico

NOS: Óxido Nítrico Sintasa

O₂: Oxígeno

p/p: Porcentaje en peso

PCS: Porta-Caval Shunt (Anastomosis Porta-Cava)

PDE5: Fosfodiesterasa 5

PHES: Psychometric Hepatic Encephalopathy Score

PKG: Proteína Quinasa dependiente de GMPc

PVDF: Polifluoruro de Vinilideno

rGly: Receptor de Glicina

SDS: Dodecilsulfato de Sodio

SEM: Error Estándar de las Medias

sGC: Guanilato Ciclasa sintasa

TBS: Tris-buffered saline

TEMED: Tetrametiletilenediamina

TNF- α : Factor Necrosis Tumral α

Tris: Tris(hidroximetil)aminometano

VGCC: canales de calcio dependientes de voltaje

VGLUT: Vesículas sinápticas de glutamato

1. Introducción

1.1 Encefalopatía hepática

En nuestro organismo el hígado es el principal órgano encargado de la detoxificación. Cuando su función falla provoca la eliminación deficiente de compuestos tóxicos, estos se acumulan en el cerebro y causan diversas alteraciones neuropsiquiátricas. El conjunto de alteraciones reciben el nombre de encefalopatía hepática (EH). Los síntomas relacionados con la EH son la alteración de la actividad motora, la función cognitiva, la coordinación y el sueño, pudiendo progresar hasta el coma y la muerte (Felipo, 2013).

Las enfermedades relacionadas con el hígado afectan a millones de personas en todo el mundo, y la mayoría de estas personas desarrollan la encefalopatía hepática mínima (EHM), con síntomas más leves que la EH. Los pacientes pueden sobrevivir durante años sufriendo el progresivo deterioro de la función neurológica. Los síntomas relacionados son alteraciones cognitivas leves, déficit de atención, y alteraciones visuomotoras y de la coordinación manual, que al no ser tan evidentes se necesita de un test psicomotor para su evaluación (Ferenci *et al*, 2002).

Los pacientes con EHM son más propensos a sufrir accidentes laborales, domésticos y de tráfico, y están predispuestos a sufrir la EH (Felipo 2013). Por ello, se ha llegado al consenso de utilizar como batería de referencia para detectar la EHM, la batería de test psicométricos PHES (*Psychometric Hepatic Encephalopathy Score*) (Weissenborn *et al*, 2001).

Los principales factores que contribuyen al desarrollo de la EH son la hiperamonemia y la neuroinflamación. El fallo hepático o las enfermedades hepáticas impiden que el riñón utilice eficientemente el ciclo de la urea y, como consecuencia, no se elimine el amonio. Acumulándose éste en sangre y tejidos, e induciendo la hiperamonemia.

Diversos estudios apoyan la idea de que la alteración de la comunicación neuronal por una alteración en la neurotransmisión son los causantes de la EH (Timmerman *et al*. 2003; Felipo *et al*. 2012; Zhang *et al*. 2012). La hiperamonemia crónica afecta a los diferentes pasos en algunos sistemas de neurotransmisión, como son los sistemas glutamatérgico, dopaminérgico, serotoninérgico, GABAérgico y colinérgico; tanto en la cantidad, la concentración extracelular de neurotransmisor, la expresión en membrana, la fosforilación, la función del neurotransmisor en receptores y transmisores, y la señal de transducción asociada a estos receptores (Felipo, 2013).

Sin embargo, los efectos de la hiperamonemia son diferentes en las distintas áreas cerebrales. Por ejemplo, la hiperamonemia crónica en modelos animales aumenta el tono GABAérgico en cerebelo, pero lo reduce en cortex (Cauli *et al.* 2009a).

La hiperamonemia y la inflamación actúan sinérgicamente. Existe una correlación entre los niveles séricos de TNF- α y la severidad de la EH en pacientes con fallo hepático crónico (Odeh *et al.* 2004). Se demostró que al administrar oralmente una solución de aminoácidos que inducía hiperamonemia, se producía el deterioro de la función neuropsicológica durante la persistencia de la inflamación pero no después de su eliminación (Shawcross *et al.* 2004). También se mostró en estudios posteriores que hay una relación entre los niveles de las interleucinas 6 y 18 (IL-6 e IL-18) y el grado de EHM, pacientes con niveles más altos de estas dos interleucinas presentaron mayor grado de EHM. Esto sugiere que procesos inflamatorios relacionados con IL-6 e IL-18 pueden contribuir al deterioro cognitivo en la EHM. Ambos descubrimientos dan soporte a la idea que la hiperamonemia y la inflamación actúan sinérgicamente en la inducción de las alteraciones neurológicas en la EH.

Por sí misma, la hiperamonemia, induce la neuroinflamación. Se ha visto que ratas con hiperamonemia crónica pero sin fallo hepático, muestran activación de la microglía (macrófagos residentes en el sistema nervioso central) y neuroinflamación. El tratamiento de estas ratas con un anti-inflamatorio, el ibuprofeno, disminuye la neuroinflamación y restaura la función cognitiva (Rodrigo *et al.* 2010). También se ha visto que en cultivos de microglía, el amonio inducía la activación de la microglía y podría, así, inducir neurinflamación (Zemtsova *et al.* 2011).

1.2 Modelos animales

Para el estudio de la EH se ha elegido como modelo la rata, por la gran cantidad de literatura en las bases de datos, la alta disponibilidad de anticuerpos comerciales contra sus proteínas y por ser económicas en mantenimiento y espacio (Butterworth *et al.* 2009). Los modelos que se han desarrollado y se están utilizando actualmente son:

- **Inducción de hiperamonemia crónica sin fallo hepático:** en este modelo la rata se alimenta durante 3 semanas con una dieta rica en amonio, introduciendo acetato amónico (25% p/p) en la comida. Esta dieta provoca un aumento en el nivel de amonio, llegando a doblar los niveles en sangre y tejido. Gracias a este modelo se puede reproducir únicamente la hiperamonemia, permitiendo evadir otras

alteraciones asociadas al fallo hepático. La hiperamonemia se puede mantener largos periodos de tiempo (Azorín et al., 1989).

- **Anastomosis porta-cava (PCS):** consiste en realizar una intervención quirúrgica a la rata para cortar la vena porta, que suministra sangre al hígado, y unirla a la vena cava. Esta intervención impide que la sangre procedente del hígado pase a través del hígado y, por tanto, no se eliminan las sustancias tóxicas.
- **Ligadura biliar:** en este modelo se obstruye el conducto biliar con una o varias ligaduras, impidiendo el paso de la bilis al intestino. A parte del fallo hepático y la hiperamonemia, las ratas también presentan ictericia, hipertensión portal y fibrosis (Rodrigo et al, 2005).

1.3 Neurotransmisión glutamatérgica

La hiperamonemia altera distintos sistemas de neurotransmisión, y uno de ellos es la neurotransmisión glutamatérgica, en la que nos centraremos en este trabajo.

En esta neurotransmisión, el glutamato es el transmisor más importante para la función normal del cerebro. Casi todas las neuronas excitadoras del sistema nervioso central son glutamatérgicas y se estima que el 50% de todas las sinapsis del cerebro liberan este agente. El glutamato es un aminoácido no esencial que debe ser sintetizado en las neuronas, ya que no atraviesa la barrera hematoencefálica. Su precursor es la glutamina, que es liberada por las células gliales. Una vez la glutamina es captada en la terminación presináptica es metabolizada a glutamato por la glutamina en la mitocondria. El glutamato se empaqueta en vesículas sinápticas, denominadas VGLUT, y ya puede ser liberado. Se han identificado diferentes tipos de receptores de glutamato, pero los más importantes son los receptores de NMDA y los receptores de AMPA. Su nombre deriva de los agonistas que los activan: NMDA (N-metil-D-aspartato) y AMPA (α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol-propionato). Ambos son canales inotrópicos no selectivos que dejan pasar Na^+ , K^+ .

En cuanto a los receptores de NMDA, se activan cuando el glutamato y su co-activador, la glicina, se unen a él. Está compuesto por varias subunidades: NR1, NR2A, NR2B, NR2C y NR2C. Estos receptores se modulan por Mg^+ . Su importancia en la EH reside en que juegan un papel fundamental en la ruta glutamato-óxido nítrico-guanosín monofosfato cíclico (GMPC), implicada en procesos de aprendizaje y memoria (ambas alteradas en la EH).

Por otra parte, los receptores AMPA están formados por las subunidades GluR1, GluR2, GluR3 y GluR4, que se combinan para formar tetrámeros normalmente a partir de dos dímeros iguales. En el caso de cerebelo se ha visto que hay dos tipos de receptores AMPA, los de alta y baja afinidad. Los de baja afinidad permiten el transporte de Na⁺, K⁺ y Ca²⁺, en cambio, los de alta afinidad solo de Na⁺ y K⁺, debido a que contienen la subunidad GluR2, que no permite el paso de Ca²⁺ (Liu and Cull-Candy, 2005; Cabrera-Pastor et al, 2012).

Se ha visto que el receptor de NMDA coopera con los receptores AMPA en la modulación del grado y la duración de la activación de la vía glutamato-óxido nítrico-GMPc (Glu-NO-GMPc) en cerebelo in vivo (Fedele y Raiteri, 1996).

1.4 Estudio del cerebelo e hipocampo

Los estudios de EH se centran en hipocampo y cerebelo, ambas son las principales áreas del cerebro donde se producen más alteraciones inducidas por la hiperamonemia. Ambas están relacionadas con algún tipo de aprendizaje, en el caso del cerebelo con el aprendizaje en el laberinto en Y y el hipocampo relacionado con el aprendizaje espacial. Se ha visto que los dos tipos de aprendizajes están deteriorados en la EH y, por ello, se va a estudiar el hipocampo y el cerebelo. Las dos áreas se van a analizar por separado, ya que anteriores estudios han demostrado que las alteraciones de la EH son diferentes en las distintas áreas cerebrales (Cauli *et al.* 2009a).

1.4.1 Cerebelo

Una de las alteraciones inducidas en cerebelo por la hiperamonemia crónica es la alteración de la ruta Glu-NO-GMPc. Como se ve en la Figura 1, la hiperamonemia produce una mayor activación tónica del receptor NMDA, dando lugar a un aumento en la actividad de la protein quinasa dependiente de calcio/calmodulina (CAMKII) que dará lugar a una alteración en su localización y a un aumento de la fosforilación de la óxido nítrico sintasa (NOS) en la serina 847 reduciendo su actividad; la hiperamonemia crónica también induce una redistribución de la NOS, reduciendo su presencia en las membranas sinápticas. Esta alteración disminuirá la formación de óxido nítrico (NO), necesaria para la activación de la guanilil ciclasa (sGC) para formar GMPc (El-Mlili *et al.* 2008; Cauli *et al.* 2008; Felipo, 2013). Hay una menor síntesis de GMPc y esto se asocia a una alteración en el aprendizaje y la memoria, entre otras alteraciones (Corbalán *et al.* 2002).

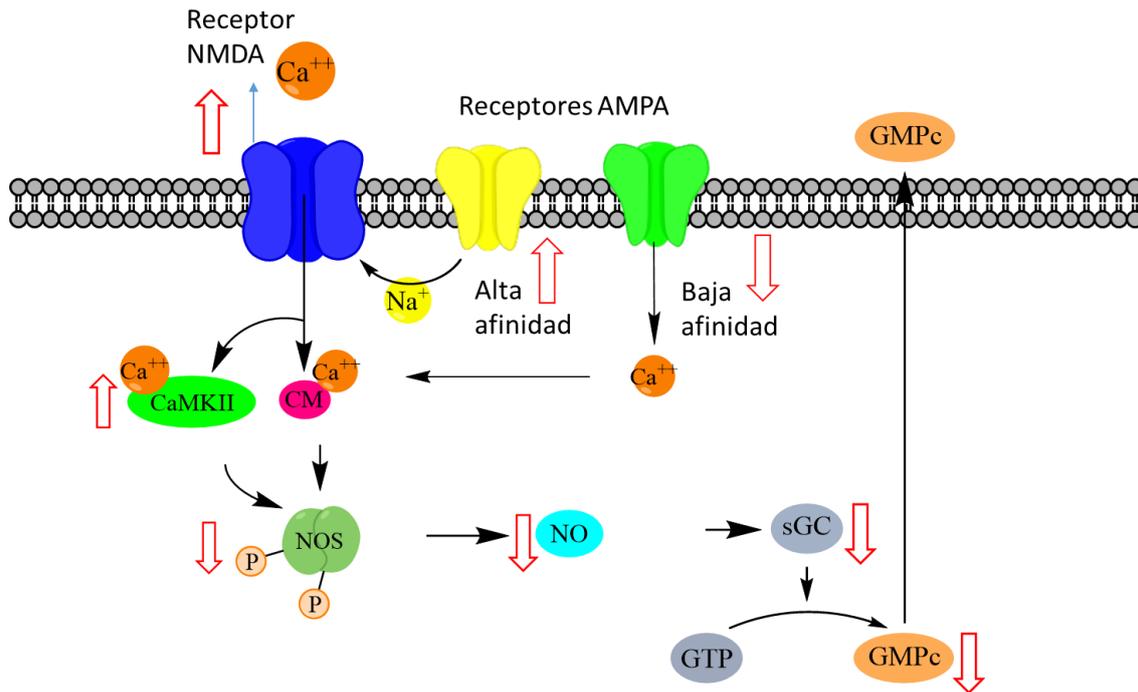


Figura 1. Cerebelo, alteración de la vía Glu-NO-GMPc en EH. La hiperamonemia crónica aumenta la activación tónica de los receptores NMDA en el cerebelo, provocando la activación de la CAMKII y aumentando así la fosforilación en la Ser847 de la NOS. Esta fosforilación reduce la actividad de la enzima y, por tanto, la formación de óxido nítrico y GMPc. La hiperamonemia crónica también altera la redistribución intracelular de la NOS, reduciendo su presencia en las membranas sinápticas (Felipo, 2013). Reduce la activación de la vía en respuesta a la activación de receptores AMPA de baja afinidad y aumenta la activación por receptores AMPA de alta afinidad (Cabrera-Pastor et al. 2012).

La hiperamonemia crónica disminuye el aprendizaje de una tarea de discriminación condicionada en el laberinto en Y (Erceg et al. 2005). Este laberinto permite el estudio del aprendizaje en las ratas; está formado por tres brazos del mismo tamaño y la rata empieza en uno de ellos, los otros dos contendrán comida según el color del laberinto, si es negro tendrá comida el brazo izquierdo y si es blanco, en el derecho, como puede verse en la Figura 2. Después del acondicionamiento de las ratas al laberinto durante 4 días, deberán aprender dónde está la comida por el color del laberinto. En experimentos llevados a cabo en ratas hiperamonémicas se vio que necesitaban más intentos para aprender el laberinto en Y que las ratas controles. Se hipotetizó era que la alteración de la ruta Glu-NO-GMPc y, por tanto, la disminución del GMPc extracelular eran responsables del deterioro cognitivo. Para comprobarlo se administró GMPc via intracerebral para normalizar los niveles de GMPc en las

ratas hiperamonémicas. El resultado fue que las ratas hiperamonémicas tratadas con GMPc recuperaban la habilidad de aprender en el laberinto en Y, y necesitaban de los mismos intentos que las controles, demostrando que la alteración de la ruta está implicada en la alteración del aprendizaje. Esto también permitió identificar la modulación de los niveles de GMPc extracelular como diana terapéutica en enfermedades que alteren el aprendizaje.

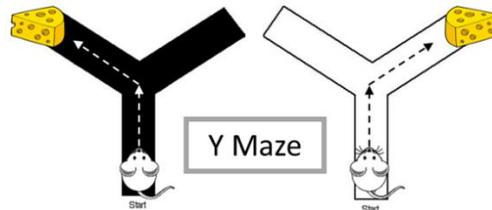


Figura 2. Laberinto en Y. Diseñado para evaluar el aprendizaje de discriminación condicionada en ratas.

También se ha demostrado en experimentos in vivo que la hiperamonemia crónica altera la modulación de la de la vía Glu-NO-GMPc por los receptores AMPA en cerebelo. Se aumenta la activación de la vía en respuesta a la activación de receptores AMPA de alta afinidad, debido a la alta entrada de Na^{2+} que activa al receptor de NMDA, y se reduce la activación por receptores AMPA de baja afinidad (Cabrera-Pastor et al. 2012).

En estudios posteriores se ha visto que en ratas hiperamonémicas la expresión en membrana de las subunidades de los receptores de membrana NMDA y AMPA está alterada, dando lugar a la alteración en la neurotransmisión y, por consiguiente, el aprendizaje en el laberinto en Y.

1.4.2 Hipocampo

La potenciación a largo plazo (LTP) consiste en un aumento persistente del componente excitador de la respuesta sináptica, que se traduce en un aumento de la eficacia sináptica que se mantiene en el tiempo. La LTP está considerada como base del aprendizaje espacial en hipocampo (Cooke y Bliss, 2006). Se ha comprobado que las ratas con hiperamonemia tienen el aprendizaje espacial alterado (Aguilar *et al.* 2000). Por ello, se considera la alteración de la LTP por la hiperamonemia como uno de los principales contribuyentes a la alteración del aprendizaje espacial.

En hipocampo, las alteraciones inducidas por la hiperamonemia crónica se han descrito en pasos posteriores de la ruta Glu-NO-GMPc como puede verse en la Figura 3. La proteína quinasa dependiente de GMPc (PKG) tiene menor afinidad por el GMPc formado, el cual es necesario para su activación. Al unirse una menor cantidad de GMPc a la PKG, hay una menor activación de la quinasa y esta no activa a la fosfodiesterasa-5 (PDE5) por fosforilación. La PDE5 es la encargada de disminuir los niveles de GMPc, pero al disminuir su actividad, la concentración de GMPc permanece alta. Y finalmente, se disminuye la LTP, que necesita del aumento y disminución del GMPc para su funcionamiento. Como consecuencia, se altera el aprendizaje espacial (Monfort et al, 2005; Monfort et al, 2007).

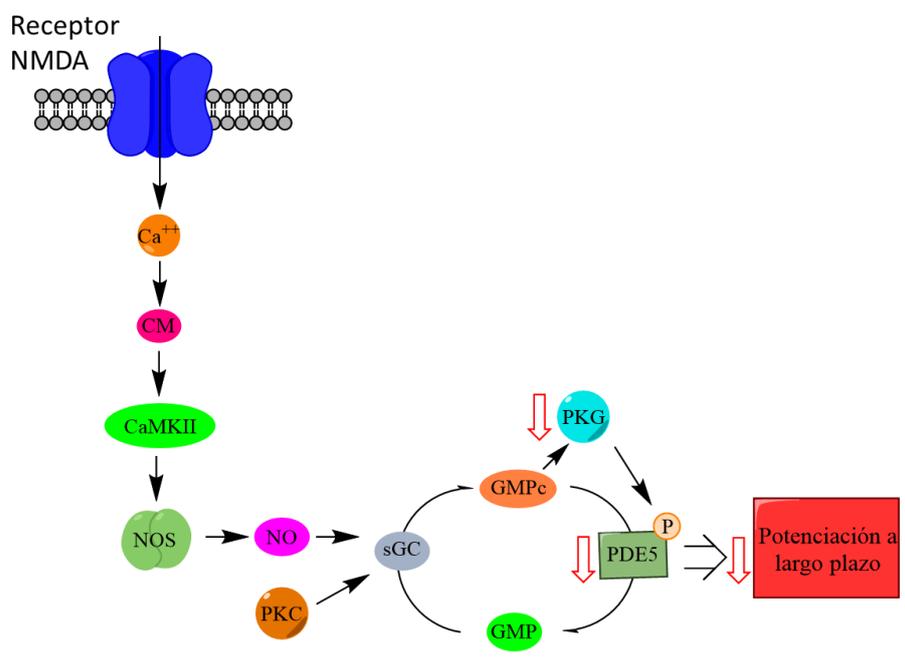


Figura 3. Hipocampo, alteración de la LTP en EH. La hiperamonemia crónica disminuye la afinidad de la PKG por el GMPc, esto produce una menor activación de la PDE5, y finalmente, disminuye la LTP asociada al aprendizaje espacial en hipocampo.

También se ha visto que la neuroinflamación altera la expresión en membrana de diversos receptores, entre ellos los NMDA y AMPA, alterando la LTP y la neurotransmisión, y causando una alteración en el aprendizaje espacial (Cabrera-Pastor et al. 2016).

La alteración de la ruta Glu-NO-GMPc resulta en una alteración del aprendizaje espacial en el laberinto acuático de Morris y el laberinto radial. Ambos laberintos que pueden verse en la Figura 4, están diseñados para estudiar el aprendizaje espacial en las ratas. El laberinto radial cuenta con 8 brazos en el que se sitúan 4 trozos de comida al final de cuatro de

los brazos (la comida se sitúa siempre en los mismos brazos) y la rata una vez situada en el centro debe guiarse por las marcas que hay en laberinto para entrar sólo en los brazos donde hay comida. A lo largo de los experimentos la rata debe realizar cada vez menos errores hasta llegar a la comida (Olton et al. 1976). Por otra parte, el laberinto acuático de Morris consiste en una piscina circular llena de agua en la que se sitúa una plataforma oculta que debe ser localizada por el animal guiándose por diferentes marcas espaciales. A lo largo de los ensayos debe reducir el tiempo de llegada a la plataforma al guiarse espacialmente por el laberinto (Morris et al. 1984).

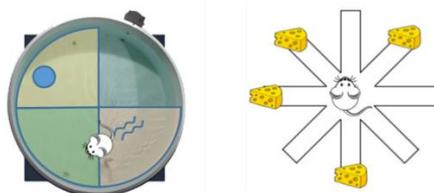


Figura 4. Laberinto acuático de Morris y laberinto radial. Laberintos diseñados para evaluar el aprendizaje espacial en ratas.

Se ha visto en otros estudios, al igual que en cerebelo, que el tratamiento con GMPc extracelular puede restaurar el aprendizaje espacial y, por tanto, restaurar la ruta Glu-NO-GMPc en hipocampo. En este estudio se vio que las ratas hiperamonémicas necesitaban más intentos que las ratas controles para aprender tanto el laberinto acuático de Morris como el radial. Se administró el tratamiento con GMPc extracelular durante 28 días, y al realizar los experimentos de aprendizaje, se vio que en las ratas hiperamonémicas tratadas, disminuía el número de errores (Cabrera-Pastor et al. 2016).

En diversos estudios en hipocampo se demuestra que en las ratas hiperamonémicas hay una alteración en la expresión en membrana de los receptores de membrana NMDA y AMPA, dando lugar a la alteración en la neurotransmisión y a la alteración del aprendizaje espacial. El tratamiento con diferentes compuestos para aumentar los niveles de GMPc, restaura la expresión de algunas subunidades y, esto se asocia con una restauración del aprendizaje (Hernández-Rabaza et al. 2015; Hernández-Rabaza et al. 2016; Cabrera-Pastor et al. 2016).

Con toda esta información se puede afirmar que el GMPc extracelular puede restaurar el aprendizaje en el laberinto en Y y el aprendizaje espacial, normalizando la expresión en membrana de receptores en cerebelo e hipocampo. Pero aún no se sabe a qué receptor de membrana se une el GMPc extracelular para inducir dichos efectos.

1.5 Receptor de Glicina

Uno de los candidatos como diana del GMPc extracelular es el receptor de glicina (rGly). Este receptor es un canal de Cl⁻ y media la transmisión sináptica inhibitoria entre interneuronas y las neuronas motoras al unirse su agonista, la glicina. También se encuentra en las neuronas presinápticas, donde modulan la liberación de los neurotransmisores. La unión de la glicina se antagoniza con la estricnina con una alta afinidad (Lynch W., 2009). Este compuesto, la estricnina, es un alcaloide utilizado como pesticida para matar invertebrados, roedores, pájaros, incluso animales más grandes. Provoca la sobreexcitación del sistema nervioso central al interferir en inhibidores de las neuronas motoras.

En anteriores estudios en cerebelo se ha visto que el GMPc extracelular puede modular al rGly inhibiéndolo, al igual que la estricnina. Y al interactuar con este receptor modificar la vía Glu-NO-GMPc por mecanismos aún desconocidos (Cabrera-Pastor et al. 2016). Por otra parte, en hipocampo estudios anteriores demuestran que el GMPc extracelular también puede unirse al rGly e inhibirlo. Esto se ha comprobado con experimentos de corrientes, primero se estudiaron las corrientes del canal activado y con estricnina, y luego, al aplicar el GMPc se veía como el efecto era similar al de la estricnina (Bukanova V. et al. 2013).

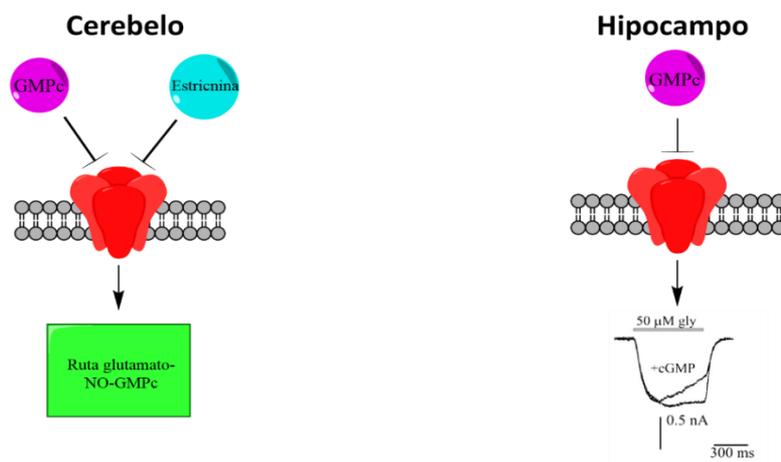


Figura 5. Modulación del rGly por GMPc extracelular. Anteriores estudios demuestran que el GMPc extracelular inhibe el rGly en cerebelo e hipocampo.

2. Hipótesis

En base a los estudios anteriores, se sabe que el GMPc extracelular modula la expresión de los receptores de membrana NMDA y AMPA, y esta modulación está implicada en la alteración del aprendizaje en el laberinto en Y y el aprendizaje espacial. Pero se desconoce cuál es el receptor de membrana a través del cual el GMPc extracelular realiza esta modulación.

Nuestro candidato es el rGly, ya que se ha demostrado que el GMPc extracelular lo inhibe. Nuestra hipótesis de funcionamiento es que al inhibir el receptor de glicina, disminuirán los niveles intracelulares de cloro modificando el potencial de membrana. Este cambio de potencial provocará a su vez la apertura o cierre de determinados canales de calcio dependientes de voltaje (VGCC) induciendo cambios en el calcio intracelular. Y de esta forma el GMPc extracelular modularía, a través del rGly, el inicio de numerosas vías de señalización que podrían dar lugar a cambios de la expresión en membrana de los receptores NMDA y AMPA.

3. Objetivos

- Analizar la modulación de la expresión en membrana de los receptores NMDA y AMPA al inhibir el receptor de glicina en cerebelo e hipocampo de ratas control
- Evaluar diferentes concentraciones del inhibidor (estricnina) sobre la expresión en membrana de los receptores NMDA y AMPA en hipocampo
- Estudiar los efectos inducidos por la hiperamonemia en los procesos anteriores

4. Materiales y métodos

4.1 Modelo animal

Para el experimento se eligió el modelo de hiperamonemia crónica sin fallo hepático. Las ratas han sido alimentadas con una dieta rica en amonio durante 3 semanas (Ratas Wistar macho, Charles River Laboratories, Barcelona, España).

4.2 Obtención de muestras

Se sacrificaron en cada repetición del experimento dos ratas, una control y otra hiperamonémica, por decapitación con guillotina. Se les extrajo el cerebelo e hipocampo y se introdujeron en solución Krebs (en mM: NaCl 119, KCl 2.5, KH₂PO₄ 1, NaHCO₃ 26.2, CaCl₂ 2.5 y glucosa 11), manteniéndolos a bajas temperaturas con hielo, y burbujando con carbógeno (95% O₂ y 5% de CO₂).

4.2.1 Hipocampo

Se realizaron cortes transversales de 400 μ M con una guillotina Chopper y se colocaron 10 cortes en cada pocillo del incubador (Campden Instruments, Ltd. Modelo 745). El incubador está acoplado a un sistema de perfusión que permite mantener los cortes ex vivo en condiciones fisiológicas, mientras se perfunde a un flujo constante tampón Krebs o los diferentes tratamientos.

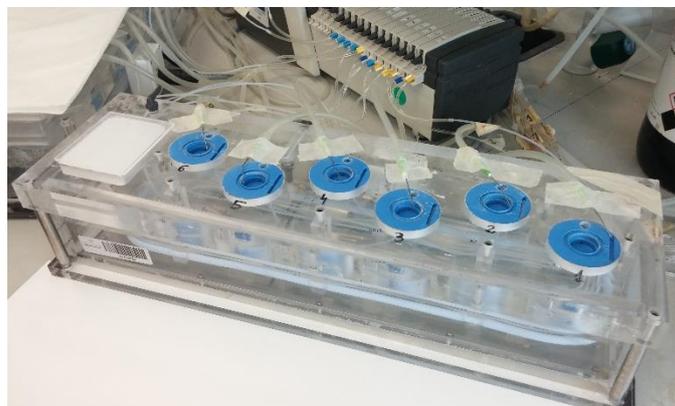


Figura 6. Sistema de perfusión. Permite mantener los cortes ex vivo en condiciones fisiológicas y perfundir los tratamientos.

4.2.2 Cerebelo

Para el cerebelo se utilizó el Vibrótomo (LEICA, Vt1000s), ya que el Chopper tiene menor precisión con esta área del cerebro. Luego se situaron 4 cortes en cada pocillo del incubador, menor número de cortes que en los de hipocampo, porque hay mayor cantidad de proteína.

4.3 Tratamiento de los cortes

En el incubador los cortes se perfunden con tampón Krebs a un flujo constante de 1 mL/min y la temperatura se mantiene a 35°C durante todo el proceso. Se dejaron las muestras en el incubador durante 10 minutos para que se estabilizaran. Luego se procedió a perfundir los tratamientos, las diferentes concentraciones de estricnina.

En cerebelo, uno de los pocillos, el basal, seguía recibiendo Krebs, y el otro pocillo se perfundía con estricnina 75 µM. En cuanto al hipocampo, el basal recibía Krebs y los otros pocillos recibían diferentes concentraciones de estricnina: 10, 30 y 100 µM. En cerebelo se eligió la concentración de 75 µM, porque en experimentos anteriores in vivo se demuestra que esta es la concentración óptima para inhibir el rGly. Por otra parte, en hipocampo se han elegido diferentes concentraciones porque no hay estudios previos que determinen la concentración óptima (Cabrera-Pastor et al. 2016).

Los experimentos de hipocampo y cerebelo se realizaron por separado, pero después de la perfusión de tratamientos se realizó el mismo procedimiento en ambos.

Tras la estabilización y el tratamiento, se transfirieron los cortes de cada pocillo a dos tubos distintos. Uno de ellos con el crosslinker BS³ (Bis[sulfosuccinimidyl] suberate, Thermo scientific) (Pierce, Rockford, IL) 2 mM, y el otro sólo con Krebs. El BS3 es un crosslinker que se unirá específicamente a los residuos de lisina de las proteínas de membrana, impidiendo su migración por el gel de electroforesis. Se mantuvieron los tubos en agitación continua a una temperatura de 4°C durante 30 minutos y, posteriormente, se detuvo la reacción añadiendo glicina (100 mM en Krebs) durante otros 10 minutos a 4°C.

Por último, se transfirieron los cortes a un tubo con 200 µL de tampón de fosforilación (Tris-HCl 66 mM pH 7.4, SDS 1%, EGTA 1 mM, Glicerol 10%, Leupeptina 0.2 mg/mL, NaF 1 mM, Na orto-vanadato 1 mM), y se homogenizaron por sonicación durante 20 segundos. Después,

se guardó una alícuota para la determinación de la cantidad de proteína y se almacenaron las muestras a -20°C para el posterior análisis por *western blot*.

4.4 Determinación cantidad proteína

Para analizar la misma cantidad de proteína en cada muestra, se cuantificó mediante el método colorimétrico del ácido bicinconínico (BCA Protein Assay Kit, Thermo). Se colocó una curva patrón con BSA (Albúmina de Suero Bovino). Se añadieron los reactivos Pierce® BSA Protein Assay Reagents A y B, y se incubó la placa a 37 °C durante 30 minutos. Por último se midió la absorbancia a 570 nm con el espectrofotómetro (Thermo scientific, Multiskan™ FC).

4.5 Análisis por Western Blot

Los receptores de membrana se cuantificaron mediante *western-blot*. Las subunidades elegidas para el estudio fueron NR1, NR2A, NR2B, GluR1 y GluR2. Para ello, los homogenados se diluyeron 1:2 en tampón 2x (Tris-HCl 0.5 M a pH 6.8, Glicerol 5%, SDS 10%, 2-Mercaptoetanol 2.5%, Bromofenol 1%) y se hirvieron a 100 °C durante 5 minutos en un *termoblock*. La cantidad de proteína por muestra fue de 75 o 150 µg según la proteína a analizar. Luego, se cargaron en geles de poliacrilamida de entre el 6 y el 8% para la realización de electroforesis y transferencia a membrana.

Los geles de electroforesis constan de dos partes. El “stacking” o parte superior (Tris Base 0.125 M, 0,1% SDS a pH 6.8, Acrilamida 3.9%, Bisacrilamida 0.015%, APS 0,04% y TEMED), que permite que las muestras se concentren antes de llegar a la parte de abajo o “separating” (Tris Base 0.4 M, 0.1% SDS, pH a 8.8, Acrilamida 8 %, Bisacrilamida 0.2%, APS 0.04% y TEMED), en el que las proteínas se separarán en función de su masa relativa. El tampón utilizado para la electroforesis fue el tampón “running” (Tris Base 0.3%, 0.02% SDS, Glicina 1.5%). Se utilizaron geles grandes de 25 pocillos

Una vez terminada la electroforesis se transfirieron las proteínas a membranas de PVDF o nitrocelulosa en tampón de transferencia (Tris Base 0.025 M, Glicina 0.05 M) y a una corriente de 250 mA por cubeta de transferencia.

Después, se bloqueó la membrana con una solución de leche en polvo al 5% en TBS-Tween (NaCl 0.15 M, Tris Base 50 mM, Tween-20 0.05%, pH 7.5) durante 45-60 minutos y se incubaron con el anticuerpo primario (Tabla 1) diluido en BSA al 5% en TBS-Tween overnight en agitación a 4°C. Se lavaron las membranas 3 veces cada 10 minutos con TBS-Tween y se incubó con el anticuerpo secundario (Tabla 1) correspondiente conjugado con fosfatasa alcalina, diluido también en la solución de BSA 5%, durante 1 hora, y se volvieron a lavar 3 veces con TBS-Tween. El siguiente lavado se hizo con tampón sustrato (NaCl 100 mM, MgCl₂ 5 mM, Tris-HCl 100 mM a pH= 9.5). Por último, se reveló utilizando el método de la fosfatasa alcalina (solución de de revelado: NaCl 100 mM, MgCl₂ 5 mM, 100 mM Tris-HCl, 0.6% stock NBT, 0.35% stock BCIP pH 9,5).

Tabla 1. Anticuerpos primarios y secundarios, y diluciones utilizadas

Anticuerpo 1° (casa comercial)	Dilución	Anticuerpo 2° (casa comercial)	Dilución
Anti NR1 (Millipore)	1:1000	Anti-IgG cabra-f.a.* contra IgG ratón (Sigma)	1:8000
Anti NR2A (Millipore)	1:1000	Anti-IgG cabra-f.a.* contra IgG conejo (Sigma)	1:4000
Anti NR2B (BDFarm)	1:1000	Anti-IgG cabra-f.a.* contra IgG conejo (Sigma)	1:4000
Anti GluR1 (Millipore)	1:500	Anti-IgG cabra-f.a.* contra IgG conejo (Sigma)	1:4000
Anti GluR2 (Upstate)	1:2000	Anti-IgG cabra-f.a.* contra IgG conejo (Sigma)	1:4000

*f.a.: Fosfatasa alcalina

Las membranas reveladas con las bandas ya visibles se capturaron con un escáner Hewlett Packard Scanjet 5300C y se cuantificó la intensidad de las bandas con el programa Alphamager 2200 (AlphaEaseFC 2200 for Windows, Cambridge, UK).

Para estudiar la expresión en membrana de receptores se utilizó el crosslinker. En el revelado aparecían dos bandas, en la primera sin el crosslinker avanzan todas las proteínas, en la segunda únicamente avanzan las citosólicas. Así las diferencias entre la intensidad de la banda negativa (sin BS^3) y positiva (BS^3) corresponderá a la cantidad de proteína de membrana (Figura 7). Los resultados se expresaron como porcentaje respecto a la rata control.



Figura 7. Crosslinker BS^3 . En la banda izquierda (sin BS^3) han avanzado todas las proteínas, en la banda derecha (con BS^3) avanzan únicamente las proteínas citosólicas.

4.6 Análisis estadístico

Se utilizó para la estadística el programa Prism 5 (GraphPad Software, Inc.). Se realizó una análisis de la varianza (ANOVA) seguido de un test t-Student en los casos que se compararon dos grupos y se consideró como significativo un valor de $p < 0.05$.

5. Resultados y discusión

5.1 Resultados de expresión en membrana de los receptores NMDA y AMPA en cerebelo

5.1.1 Expresión en membrana del receptor NMDA: NR1, NR2A y NR2B

En el cerebelo de ratas hiperamonémicas la expresión en membrana de las subunidades NR1 y NR2A está disminuida a un $59,5 \pm 13,2\%$ ($p < 0.05$) y a un $58,9 \pm 12,7\%$ ($p < 0.05$) respectivamente, y la subunidad NR2B está aumentada en un $203,8 \pm 38,1\%$ ($p < 0.05$) con respecto a las ratas control. El tratamiento con estricnina en controles reduce la expresión en NR1 a un $61,3 \pm 6,6\%$ ($p < 0.05$), no hay efecto significativo en NR2A y la expresión de la subunidad NR2B aumenta ($251,6 \pm 58,9\%$, $p < 0.05$). La estricnina en hiperamonémicas no tiene ningún efecto significativo en las subunidades NR1 y NR2A en cuanto a la expresión en membrana, pero en NR2B tiende a normalizar la expresión en un $118,0 \pm 42,7\%$ ($p < 0.05$) (Figura 8 y Figura 9).

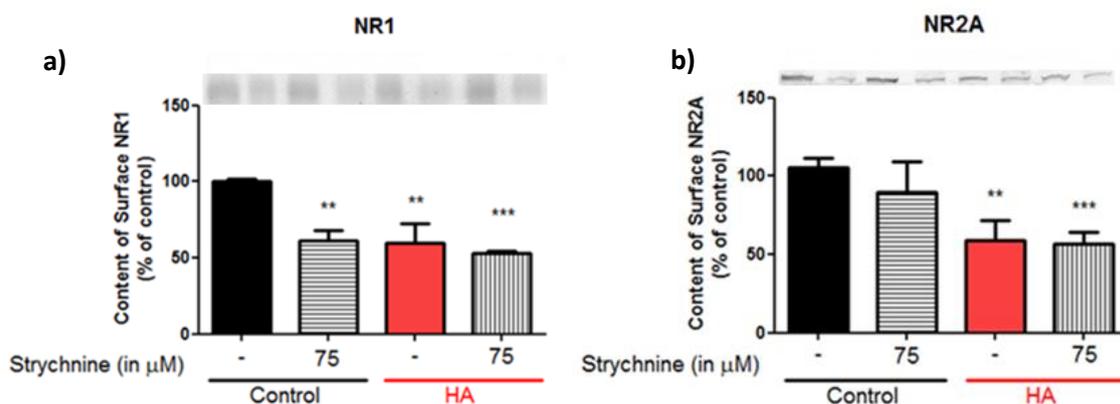


Figura 8. Expresión en membrana de las subunidades NR1 (a) y NR2A (b) del receptor NMDA en cerebelo de ratas control e hiperamonémicas. En ratas control el tratamiento con estricnina disminuye la expresión en membrana de NR1(a). En ratas hiperamonémicas la expresión en membrana de NR1 (a) y NR2A (b) está disminuida y el tratamiento con estricnina no modifica la expresión en membrana de estas subunidades. Los datos son la media \pm error estándar de (a) 8 y (b) 8 ratas por grupo. *diferencia significativa respecto al control ($p < 0.05$).

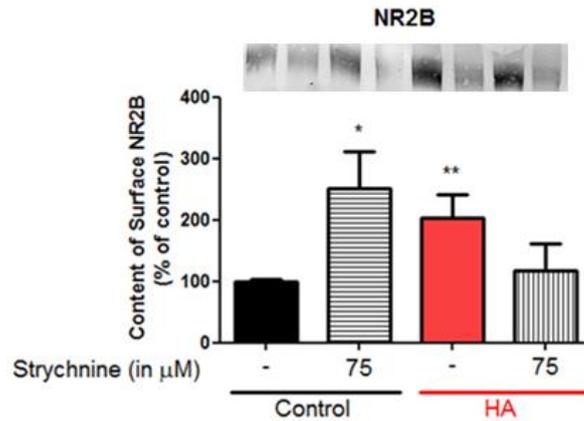


Figura 9. Expresión en membrana de la subunidad NR2B del receptor NMDA en cerebelo de ratas control e hiperamonémicas. En ratas control el tratamiento con estriquina aumenta la expresión de NR2B. En ratas hiperamonémicas la expresión en membrana de NR2B está aumentada y el tratamiento con estriquina tiende a normalizar su expresión en membrana. Los datos son la media \pm error estándar de 6 ratas por grupo. *diferencia significativa respecto al control ($p < 0.05$).

5.1.2 Expresión en membrana del receptor AMPA: GluR1 y GluR2

En cuanto al receptor AMPA, en las ratas hiperamonémicas, la expresión de la subunidad GluR1 está aumentada a un $271,2 \pm 93,3\%$ ($p < 0.05$) y la de GluR2 disminuida a un $75,78 \pm 8,3\%$ ($p < 0.05$). La aplicación del tratamiento de estriquina a las ratas control aumenta la expresión en membrana de GluR1 a un $312,9 \pm 105,7\%$ ($p < 0.05$) y la de GluR2 a un $61,8 \pm 8,6\%$ ($p < 0.05$). En las hiperamonémicas tratadas se observa una tendencia a normalizar la expresión en membrana de GluR1 y GluR2 a un $110,8 \pm 39,1\%$ ($p < 0.05$) y $96,2 \pm 22,3\%$ ($p < 0.05$), respectivamente (Figura 10).

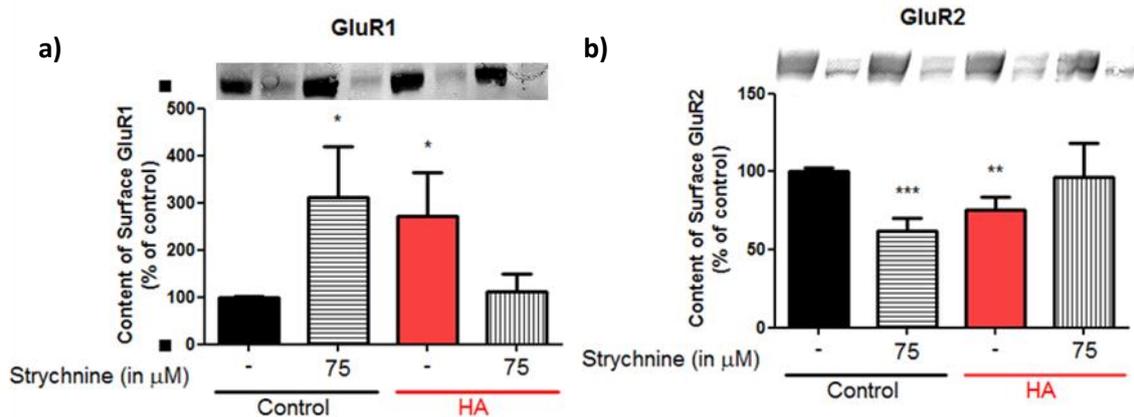


Figura 10. Expresión en membrana de las subunidades GluR1 (a) y GluR2 (b) del receptor AMPA en cerebelo de ratas control e hiperamonémicas. En ratas control el tratamiento con estricnina aumenta la expresión en membrana de la subunidad GluR1 (a) y disminuye la expresión de GluR2 (b). En ratas hiperamonémicas la expresión en membrana de GluR1 (a) está aumentada y la de GluR2 (b) está disminuida y el tratamiento con estricnina tiende a normalizar la expresión en membrana de ambas subunidades. Los datos son la media \pm error estándar de (a) 9 y (b) 19 ratas por grupo. *diferencia significativa respecto al control ($p < 0.05$).

La actividad de los receptores y su función depende de distintos factores: la síntesis, expresión y degradación, su localización subcelular, su unión a co-agonistas o fosforilación y por su concentración extracelular. Como se ha visto en los resultados hay una alteración en ratas con hiperamonemia crónica en la expresión en membrana basal de las subunidades de NMDA y AMPA, ya sea por una alteración en la síntesis, en el sistema de transporte a la membrana o el de degradación. Esta alteración dará lugar a una alteración en el funcionamiento de los receptores y, como consecuencia, a una alteración en la neurotransmisión que es el principal causante de la EH.

En estudios recientes se ha evaluado la expresión en membrana de ambos receptores, NMDA y AMPA. En este mismo laboratorio en un experimento con cortes de cerebelo, se ha visto que la expresión en membrana de las subunidades NR1, NR2A y GluR2 en ratas hiperamonémicas estaba disminuida y la de GluR1 aumentada (datos no publicados), confirmando nuestros resultados. En este estudio no se comprobó la expresión de NR2B.

La aplicación de estricnina a los cortes ex vivo modifica la expresión de NR2B, GluR1 y GluR2, revirtiendo la alteración producida por la hiperamonemia y, por consiguiente, podría mejorar la neurotransmisión. Esta modificación se produce a través de la inhibición del rGly, ya que la estricnina es un inhibidor específico de este receptor. En el experimento antes mencionado (cortes de cerebelo) se utilizó GMPc extracelular para ver si se revertía la alteración en la expresión en membrana de los receptores glutamatérgicos. Se vio que la aplicación de GMPc extracelular era capaz de revertir la expresión en las subunidades GluR1 y GluR2, de la misma forma que se ha visto en este trabajo con el tratamiento con estricnina (Tabla 2a).

También se hizo el mismo experimento in vivo, en el cual se aplicó GMPc extracelular con bombas osmóticas intracerebrales. La alteración en la expresión basal, en membrana en ratas hiperamonémicas, de las subunidades fue la misma, excepto de NR2A. La subunidad NR2B tampoco se estudió. El tratamiento con GMPc normalizaba la expresión de las subunidades GluR1 y GluR2, al igual que en nuestros resultados.

En otro estudio se comprobó el efecto del sildenafil sobre la expresión en membrana en animales con EH (Hernández-Rabaza et al. 2016). Este compuesto es un inhibidor de la PDE5 que es la encargada de la degradación del GMPc intracelular. De modo que este tratamiento produce un aumento de los niveles de GMPc tanto intracelular como extracelular. En este estudio la expresión en membrana de GluR1 y GluR2 en hiperamonemia coincide con nuestros resultados. Y el tratamiento con sildenafil normalizaba los valores de GluR1, y no de GluR2. Que no se module la expresión en membrana de GluR2 puede estar relacionado con el aumento del GMPc intracelular, ya que en los dos anteriores experimentos solo se aumenta el GMPc extracelular sobre la expresión en membrana.

La inhibición del rGly modula la expresión en membrana del receptor AMPA, y puede que también la subunidad NR2B del receptor NMDA, como se puede ver en nuestros resultados. Y al obtener los mismos resultados que en tratamientos con GMPc, se puede considerar el rGly como un fuerte candidato para ser el mediador de los efectos del GMPc extracelular.

5.2 Resultados de expresión en membrana de los receptores NMDA y AMPA en hipocampo

5.2.1 Expresión en membrana del receptor NMDA: NR1, NR2A y NR2B

Hay que recordar que en hipocampo se utilizaron diversas concentraciones de estricnina porque no hay estudios previos que determinen la concentración óptima para inhibir el rGly.

No se observa ninguna tendencia en la expresión en membrana de las subunidades NR1, NR2A ni NR2B al aplicar diferentes concentraciones de estricnina a control e hiperamonemia.

En hipocampo, la expresión basal en membrana de las subunidades NR1, NR2A y NR2B en ratas hiperamonémicas está aumentada a $141,5 \pm 16,8\%$ ($p < 0.05$), $149,5 \pm 25,3\%$ ($p < 0.05$) y $142,8 \pm 19,9\%$ ($p < 0.05$), respectivamente. Los tratamientos a controles aumentan la expresión en membrana significativamente de las tres subunidades, salvo la estricnina $30 \mu\text{M}$ en NR2A y la de $10 \mu\text{M}$ en NR2B. Los tratamientos con estricnina en los cortes de ratas con hiperamonemia no modifican el efecto producido por ésta, manteniendo los valores de expresión significativamente aumentados con respecto a controles (Figura 11 y Figura 12).

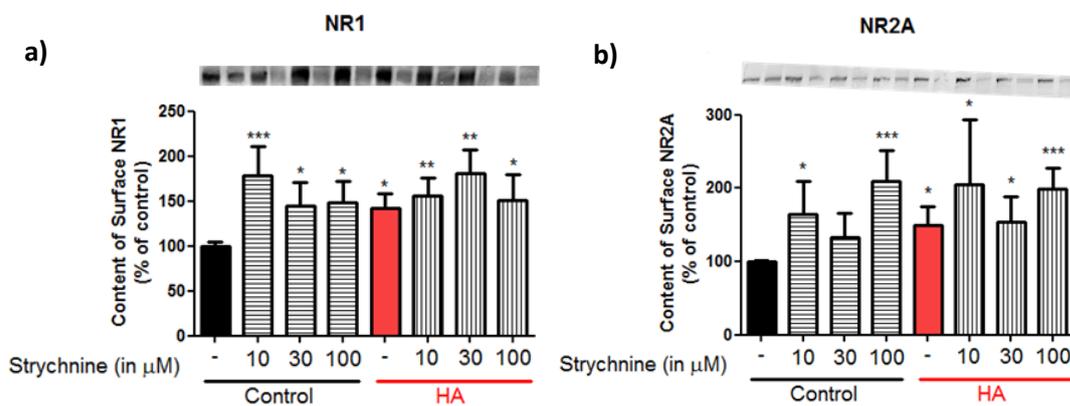


Figura 11. Expresión en membrana de las subunidades NR1 (a) y NR2A (b) del receptor NMDA en hipocampo de ratas control e hiperamonémicas. En ratas control el tratamiento con estricnina aumenta la expresión en membrana de ambas subunidades (en el caso de NR2A (b) a $30 \mu\text{M}$ no hay efecto). En ratas hiperamonémicas la expresión en membrana de NR1 (a) y NR2A (b) está aumentada y el tratamiento con estricnina no modifica su expresión en membrana. Los datos son la media \pm error estándar de (a) 13 y (b) 17 ratas por grupo. *diferencia significativa respecto al control ($p < 0.05$).

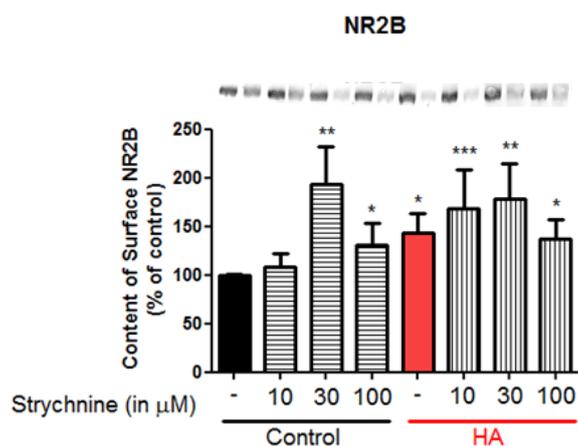


Figura 12. Expresión en membrana de la subunidad NR2B del receptor NMDA en hipocampo de ratas control e hiperamonémicas. En ratas control el tratamiento con estricnina aumenta la expresión de NR2B. En ratas hiperamonémicas la expresión en membrana de NR2B está aumentada y el tratamiento con estricnina no modifica el efecto de la hiperamonemia. Los datos son la media \pm error estándar de 22 ratas por grupo. *diferencia significativa respecto al control ($p < 0.05$).

5.2.2 Expresión en membrana del receptor AMPA: GluR1 y GluR2

En cuanto al receptor AMPA, la expresión basal de GluR1 en ratas hiperamonémicas está aumentada a $121,5 \pm 10,0\%$ ($p < 0.05$) y la de GluR2 disminuida a $71,2 \pm 16,2\%$ ($p < 0.05$).

Al aplicar los tratamientos tanto a los cortes controles como a los hiperamonémicos no se observa ningún efecto significativo en la subunidad GluR1.

En la subunidad GluR2 se observa una tendencia al aplicar diferentes concentraciones de estricnina en controles, a menor concentración se observa una mayor expresión en membrana del receptor (10 μM : $119,9 \pm 13,85\%$ ($p < 0.05$), 30 μM : $117,3 \pm 29,51\%$) y a mayor concentración, menor expresión. A la concentración de 100 μM se observa una disminución significativa de la expresión en membrana ($68,4 \pm 8,0\%$, $p < 0.05$).

En cuanto a los tratamientos en ratas hiperamonémicas a menor concentración de estricnina no hay efecto, se mantiene disminuida la expresión en membrana (10 μM : $65,45 \pm 16,93\%$ ($p < 0.05$), 30 μM : $58,53 \pm 22,4\%$ ($p < 0.05$)) y a mayor concentración aumenta. Es a 100 μM cuando se revierte la disminución producida por la hiperamonemia, aumenta la expresión en membrana a $170,5 \pm 34,5\%$ ($p < 0.05$) (Figura 13).

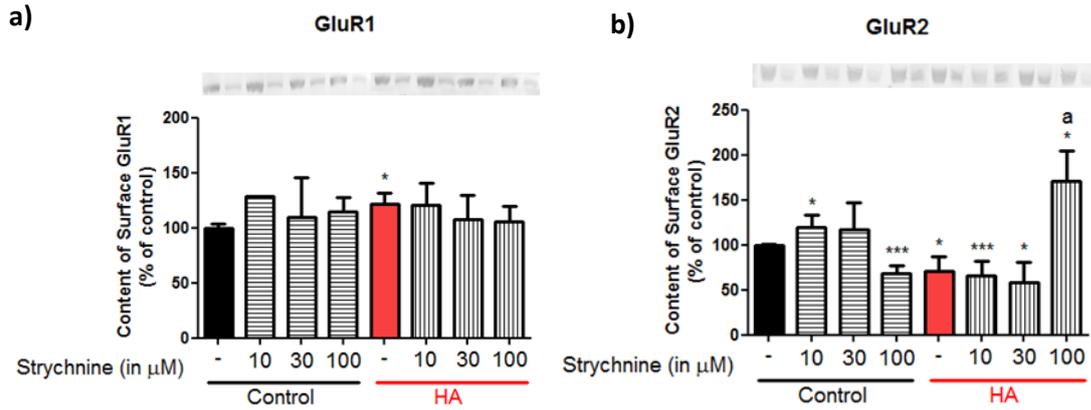


Figura 13. Expresión en membrana de las subunidades GluR1 (a) y GluR2 (b) del receptor AMPA en hipocampo de ratas control e hiperamonémicas. En ratas hiperamonémicas la expresión en membrana de GluR1 (a) está aumentada y la de GluR2 (b) está disminuida y el tratamiento con estriquina tiende a normalizar la expresión en membrana de ambas subunidades. Los datos son la media \pm error estándar de (a) 14 y (b) 14 ratas por grupo. *diferencia significativa respecto al control ($p < 0.05$). "a" diferencia significativa respecto a la hiperamonemia ($p < 0.05$).

Cabrera-Pastor et al. (2016) estudió si el tratamiento in vivo de GMPc extracelular revertía la expresión en membrana de NMDA y AMPA en hiperamonemia crónica. Se vio que la expresión en membrana basal de las subunidades NR1, NR2A y GluR1 estaba aumentada, y la de GluR2 disminuida, al igual que en nuestros resultados. Tras la aplicación del tratamiento con GMPc extracelular, se lograba normalizar la expresión de GluR1 y GluR2. Comparándolo con nuestros resultados (Tabla 2b), en GluR1 no se ve una modificación en la expresión, aunque a concentración de 100 μ M empieza a verse una tendencia a normalizar la expresión. Por otro lado, a altas concentraciones de estriquina se logra revertir el estado alterado de la hiperamonemia en la subunidad GluR2, pero también aumenta la expresión con respecto al control. Por tanto, se debería buscar una concentración más adecuada entre 30 μ M y 100 μ M, ya que se ve una tendencia según la concentración utilizada, a menores concentraciones se disminuye la expresión y a mayores se logra aumentar.

Al igual que en cerebelo hay una relación entre la expresión en membrana de las subunidades de AMPA con la inhibición del rGly, ya que se regula tanto por el tratamiento con estriquina como con GMPc. Esto sugiere que ambos compuestos deben actuar de la misma forma (inhibiendo), en el mismo lugar (rGly).

Tabla 2. Comparación de la expresión en membrana de las subunidades de NMDA y AMPA al tratar las ratas controles e hiperamoniémicas con estircnina y GMPc (estudios anteriores).

a)

Cerebelo	NR1		NR2A		GluR1		GluR2	
	Strych	GMPc	Strych	GMPc	Strych	GMPc	Strych	GMPc
Control	↓	↓	×	×	↑	↑	↓	↓
HA	×	×	×	×	▬	▬	▬	▬

b)

Hipocampo	NR1		NR2A		GluR1		GluR2	
	Strych	GMPc	Strych	GMPc	Strych	GMPc	Strych	GMPc
Control	↑	↑	×	×	×	×	×	×
HA	×	×	×	×	▬	▬	▬	▬

*   : Disminución/Aumento de la expresión en membrana por efecto del tratamiento

*  : El tratamiento no tiene efecto sobre la expresión en membrana de la subunidad

*  : El tratamiento normaliza la expresión en membrana de la subunidad

6. Conclusiones

En Cerebelo:

1. La expresión en membrana de las subunidades NR1, NR2A y GluR2 en ratas hiperamonémicas está disminuida respecto a las ratas control, mientras que la de NR2B y GluR1 están aumentadas.
2. El tratamiento con estricnina :
 - i. Reduce la expresión en membrana de NR1 y GluR2, y aumenta la de NR2B y GluR1 en ratas control.
 - ii. Tiende a normalizar la expresión en membrana de NR2B, GluR1 y GluR2 en hiperamonemia crónica.

En Hipocampo:

1. La expresión en membrana de las subunidades NR1, NR2A, NR2B y GluR1 en ratas hiperamonémicas está aumentada respecto a los controles, por el contrario la de GluR2 está disminuida.
2. La estricnina aumenta la expresión en membrana de las subunidades NR1, NR2A y NR2B en ratas controles, sin que se observe un efecto a diferentes concentraciones.
3. Se observa un efecto dosis en GluR2, la estricnina a bajas concentraciones aumenta su expresión en membrana y la disminuye a altas concentraciones en ratas controles. En hiperamonemia, a bajas concentraciones no hay efecto y se mantiene disminuida su expresión, mientras que a altas concentraciones la aumenta.

La inhibición del receptor de glicina:

- Modula la expresión en membrana de los receptores NMDA y AMPA.
- Restaura los niveles de expresión en membrana de algunas subunidades de los receptores NMDA y AMPA en hiperamonemia crónica.

Al comparar los resultados de expresión en membrana tras el tratamiento con GMPc extracelular, realizada en anteriores estudios con el de estricnina, se puede afirmar que:

El receptor de glicina podría ser el mediador de los efectos del GMPc extracelular sobre la expresión en membrana de los receptores NMDA (NR1 y NR2B) y AMPA (GluR1 y GluR2) en cerebelo e hipocampo, implicados en el aprendizaje.

7. Bibliografía

1. Aguilar, M., Miñarro, J. and Felipo, V. (2000). Chronic Moderate Hyperammonemia Impairs Active and Passive Avoidance Behavior and Conditional Discrimination Learning in Rats. *Experimental Neurology*, 161(2), pp.704-713.
2. Azorín, I., Miñana, M., Felipo, V. and Grisolia, S. (1989). A simple animal model of hyperammonemia. *Hepatology*, 10(3), pp.311-314.
3. Bukanova, J., Solntseva, E., Kondratenko, R. and Skrebitsky, V. (2014). Glycine receptor in hippocampal neurons as a target for action of extracellular cyclic nucleotides. *Neuroscience Letters*, 561, pp.58-63.
4. Butterworth, R., Norenberg, M., Felipo, V., Ferenci, P., Albrecht, J. and Blei, A. (2009). Experimental models of hepatic encephalopathy: ISHEN guidelines. *Liver International*, 29(6), pp.783-788.
5. Cabrera-Pastor, A., Hernandez-Rabaza, V., Taoro-Gonzalez, L., Balzano, T., Llansola, M. and Felipo, V. (2016). In vivo administration of extracellular cGMP normalizes TNF- α and membrane expression of AMPA receptors in hippocampus and spatial reference memory but not IL-1 β , NMDA receptors in membrane and working memory in hyperammonemic rats. *Brain, Behavior, and Immunity*.
6. Cabrera-Pastor, A., Llansola, M., Reznikov, V., Boix, J. and 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. *Neurochemistry International*, 61(1), pp.63-71.
7. Cabrera-Pastor, A., Taoro-Gonzalez, L. and Felipo, V. (2016). Hyperammonemia alters glycinergic neurotransmission and modulation of the glutamate-nitric oxide-cGMP pathway by extracellular glycine in cerebellum in vivo. *J. Neurochem.*, 137(4), pp.539-548.
8. Cauli, O., Mansouri, M., Agusti, A. and Felipo, V. (2009). Hyperammonemia Increases GABAergic Tone in the Cerebellum but Decreases It in the Rat Cortex. *Gastroenterology*, 136(4), pp.1359-1367.e2.
9. Cauli, O., Rodrigo, R., Boix, J., Piedrafita, B., Agusti, A. and Felipo, V. (2008). Acute liver failure-induced death of rats is delayed or prevented by blocking NMDA receptors in brain. *AJP: Gastrointestinal and Liver Physiology*, 295(3), pp.G503-G511.
10. Cauli, O., Rodrigo, R., Llansola, M., Montoliu, C., Monfort, P., Piedrafita, B., el Mlili, N., Boix, J., Agustí, A. and Felipo, V. (2009). Glutamatergic and gabaergic neurotransmission and neuronal circuits in hepatic encephalopathy. *Metabolic Brain Disease*, 24(1), pp.69-80.

11. Cooke, S. (2006). Plasticity in the human central nervous system. *Brain*, 129(7), pp.1659-1673.
12. Corbalán, R. (2002). Region selective alterations of soluble guanylate cyclase content and modulation in brain of cirrhotic patients. *Hepatology*, 36(5), pp.1155-1162.
13. El-Mlili, N., Rodrigo, R., Naghizadeh, B., Cauli, O. and 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. *Journal of Neurochemistry*, 106(3), pp.1440-1449.
14. Erceg, S., Monfort, P., Hernandez-Viadel, M., Llansola, M., Montoliu, C. and Felipo, V. (2005). Restoration of learning ability in hyperammonemic rats by increasing extracellular cGMP in brain. *Brain Research*, 1036(1-2), pp.115-121.
15. Felipo, V. (2013). Hepatic encephalopathy: effects of liver failure on brain function. *Nature Reviews Neuroscience*, 14(12), pp.851-858.
16. Felipo, V., Ordoño, J., Urios, A., El Mlili, N., Giménez-Garzó, C., Aguado, C., González-Lopez, O., Giner-Duran, R., Serra, M., Wassel, A., Rodrigo, J., Salazar, J. and Montoliu, C. (2012). Patients with minimal hepatic encephalopathy show impaired mismatch negativity correlating with reduced performance in attention tests. *Hepatology*, 55(2), pp.530-539.
17. Ferenci, P. (2002). Hepatic encephalopathy—Definition, nomenclature, diagnosis, and quantification: Final report of the Working Party at the 11th World Congresses of Gastroenterology, Vienna, 1998. *Hepatology*, 35(3), pp.716-721.
18. Hernandez-Rabaza, V., Agusti, A., Cabrera-Pastor, A., Fustero, S., Delgado, O., Taoro-Gonzalez, L., Montoliu, C., Llansola, M. and Felipo, V. (2015). Sildenafil reduces neuroinflammation and restores spatial learning in rats with hepatic encephalopathy: underlying mechanisms. *Journal of Neuroinflammation*, 12(1).
19. Hernandez-Rabaza, V., Cabrera-Pastor, A., Taoro-Gonzalez, L., Gonzalez-Usano, A., Agusti, A., Balzano, T., Llansola, M. and Felipo, V. (2016). Neuroinflammation increases GABAergic tone and impairs cognitive and motor function in hyperammonemia by increasing GAT-3 membrane expression. Reversal by sulforaphane by promoting M2 polarization of microglia. *Journal of Neuroinflammation*, 13(1).
20. Journal of Experimental Psychology: Animal behavior processes contents of volume 1, page III: Erratum. (1976). *Journal of Experimental Psychology: Animal Behavior Processes*, 2(3), pp.259-259.
21. Liu, S. and Cull-Candy, S. (2005). Subunit interaction with PICK and GRIP controls Ca²⁺ permeability of AMPARs at cerebellar synapses. *Nature Neuroscience*, 8(6), pp.768-775.

22. Monfort, P., Erceg, S., Piedrafita, B., Llansola, M. and Felipo, V. (2007). Chronic liver failure in rats impairs glutamatergic synaptic transmission and long-term potentiation in hippocampus and learning ability. *European Journal of Neuroscience*, 25(7), pp.2103-2111.
23. Monfort, P., Muñoz, M. and Felipo, V. (2005). Chronic hyperammonemia in vivo impairs long-term potentiation in hippocampus by altering activation of cyclic GMP-dependent-protein kinase and of phosphodiesterase 5. *Journal of Neurochemistry*, 94(4), pp.934-942.
24. Morris, R. (1984). Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *Journal of Neuroscience Methods*, 11(1), pp.47-60.
25. Odeh, M., Sabo, E., Srugo, I. and Oliven, A. (2004). Serum levels of tumor necrosis factor-alpha correlate with severity of hepatic encephalopathy due to chronic liver failure. *Liver International*, 24(2), pp.110-116.
26. Rodrigo, R., Cauli, O., Gomez-Pinedo, U., Agusti, A., Hernandez-Rabaza, V., Garcia-Verdugo, J. and Felipo, V. (2010). Hyperammonemia Induces Neuroinflammation That Contributes to Cognitive Impairment in Rats With Hepatic Encephalopathy. *Gastroenterology*, 139(2), pp.675-684.
27. Rodrigo, R., Jover, R., Candela, A., Compañ, A., Sáez-Valero, J., Erceg, S. and Felipo, V. (2005). Bile duct ligation plus hyperammonemia in rats reproduces the alterations in the modulation of soluble guanylate cyclase by nitric oxide in brain of cirrhotic patients. *Neuroscience*, 130(2), pp.435-443.
28. Shawcross, D., Davies, N., Williams, R. and Jalan, R. (2004). Systemic inflammatory response exacerbates the neuropsychological effects of induced hyperammonemia in cirrhosis. *Journal of Hepatology*, 40(2), pp.247-254.
29. Timmermann, L., Gross, J., Butz, M., Kircheis, G., Haussinger, D. and Schnitzler, A. (2003). Mini-asterix in hepatic encephalopathy induced by pathologic thalamo-motor-cortical coupling. *Neurology*, 61(5), pp.689-692.
30. Weissenborn, K., Ennen, J., Schomerus, H., Rückert, N. and Hecker, H. (2001). Neuropsychological characterization of hepatic encephalopathy. *Journal of Hepatology*, 34(5), pp.768-773.
31. Zemtsova, I., Görg, B., Keitel, V., Bidmon, H., Schrör, K. and Häussinger, D. (2011). Microglia activation in hepatic encephalopathy in rats and humans. *Hepatology*, 54(1), pp.204-215.
32. Zhang, L., Zheng, G., Zhang, L., Zhong, J., Wu, S., Qi, R., Li, Q., Wang, L. and Lu, G. (2012). Altered Brain Functional Connectivity in Patients with Cirrhosis and Minimal Hepatic Encephalopathy: A Functional MR Imaging Study. *Radiology*, 265(2), pp.528-536.