

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA
AGRONÒMICA I DEL MEDI NATURAL



Efecto del sildenafil sobre la neuroinflamación en ratas con encefalopatía hepática

TRABAJO FIN DE GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

ALUMNA: Andrea Ibáñez Grau

TUTORES: Ana Agustí y Vicente Felipo
TUTOR ACADÉMICO: Rafael Sirera Pérez

Curso Académico: 2015/2016

VALENCIA, 29 de Julio de 2016



AUTORA: Andrea Ibáñez Grau

TUTORES: Ana Agustí y Vicente Felipo

TUTOR ACADÉMICO: Rafael Sirera

LOCALIDAD Y FECHA: Valencia, 29 de julio de 2016

TÍTULO: Efecto del sildenafil sobre la neuroinflamación en ratas con encefalopatía hepática

RESUMEN

La Encefalopatía Hepática (EH) es un síndrome neuropsiquiátrico complejo producido como consecuencia de un fallo hepático agudo o crónico. La EH tiene 4 fases, empieza con alteraciones de la personalidad y atención, progresa con una disminución de la función cognitiva y motora y finalmente provoca coma y muerte. Este fallo hepático provoca una disminución de la función del hígado, y por tanto, de la correcta detoxificación, acumulándose diferentes sustancias en el organismo entre las que se encuentra el amonio. El amonio se acumula en sangre y tejidos y cuando alcanza el cerebro produce la EH. Los principales responsables de la EH son la hiperamonemia y la neuroinflamación. La vía glutamato, óxido nítrico, GMPc (Glu-NO-GMPc), implicada en la función cognitiva, está alterada en modelos animales de hiperamonemia y EH. Las ratas hiperamonémicas o con EH tienen menos GMPc extracelular, y esta disminución se correlaciona además con una disminución de la función cognitiva en una tarea de discriminación condicionada en un laberinto en Y, de manera que la vía Glu-NO-GMPc es un indicador del deterioro cognitivo. El sildenafil es un inhibidor de la fosfodiesterasa 5 (PDE5). La PDE5 degrada el GMPc a GMP y, por tanto el sildenafil normaliza la función de la vía Glu-NO-GMPc y hace que aumente el GMPc extracelular mejorando el deterioro cognitivo, llegando a niveles similares al control. Por otro lado, se ha demostrado que algunos marcadores inflamatorios están alterados en cerebelo de ratas con EH. El objetivo de este trabajo es analizar por inmunohistoquímica la progresión de algunos marcadores de neuroinflamación a las 4, 9 y 12 semanas en ratas con anastomosis porto-cava, modelo animal de EH, y ratas sham tratadas con sildenafil.

PALABRAS CLAVE: encefalopatía hepática, hiperamonemia, neuroinflamación, Glu-NO-GMPc, sildenafil.

AUTHOR: Andrea Ibáñez Grau

TUTOR: Ana Agustí and Vicente Felipo

PROFESSORS: Rafael Sirera

PLACE AND DATE: Valencia, 29th July 2016

TITLE: The effect of sildenafil on neuroinflammation in rats with hepatic encephalopathy

ABSTRACT

Hepatic encephalopathy (HE) is a complex neuropsychiatric syndrome produced as a result of a chronic or acute liver failure. The HE starts with personality alterations, cognitive impairment, producing, finally coma and death. This hepatic failure produces a decrease in the liver function and, therefore, an incorrect detoxification, accumulating several substances in the organism as ammonium. The ammonium is accumulated in the blood and tissues and when it arrives to the brain produces HE. Hyperammonemia and neuroinflammation are the main responsible of HE. The pathway of glutamate nitric oxide cGMP (Glu-NO-cGMP) involved in the cognitive function, is altered in hyperammonemia and HE model animals. Rats with hyperammonemia or HE showed a reduction of cGMP. The decrease of the function of this pathway correlates with impaired learning of a conditional discrimination task in a Y maze. Sildenafil is an inhibitor of phosphodiesterase 5 (PDE5). PDE5 degrades cGMP to GMP and, therefore, normalizes Glu-NO-cGMP pathway, produce an increase of extracellular cGMP improving the cognitive impairment, reaching similar levels of control rats. Moreover, it is observed an increase of neuroinflammatory brain markers in the HE rats. The aim of this work is analyze with immunohistochemistry the progression of some neuroinflammatory markers at 4, 9, and 12 weeks in rats with porta-caval shunt, an animal model of HE, and sham rats treated with sildenafil.

KEYWORDS: hepatic encephalopathy, hyperammonemia, neuroinflammation, Glu-NO-cGMP, sildenafil.

AGRADECIMIENTOS

Quiero dar las gracias a todos los que me han apoyado durante estos años, en especial a mis padres y mi hermano. Les agradezco la educación que me han dado ya que me ha permitido estar aquí y el amor incondicional, dando y no esperando nada a cambio.

También me gustaría dedicar este trabajo a Jordi que ha estado a mi lado en los buenos y malos momentos, aguantando mi estrés de todo el año así como a mis amigos y compañeros.

Mil gracias a Ana y Tiziano del laboratorio de Neurobiología del Centro de Investigación Príncipe Felipe que me han corregido este trabajo, que se han preocupado en cada momento y que me han enseñado diversas técnicas en el laboratorio.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 LA ENCEFALOPATÍA HEPÁTICA	2
1.2 PATOGÉNESIS DE LA ENCEFALOPATÍA HEPÁTICA	3
1.2.1 Hiperamonemia	3
1.2.2 Neuroinflamación.....	4
1.2.2.1 Iba1.....	4
1.2.2.2 IL-1β.....	5
1.2.2.3 IL-4.....	5
1.2.2.4 GFAP	5
1.2.3 Sinergismo amonio-inflamación.....	6
1.3 ALTERACIÓN DE LA VÍA GLUTAMATO-ÓXIDO NÍTRICO-GMPC.....	7
1.4 ESTRATEGIAS TERAPÉUTICAS EMERGENTES	9
1.4.1 Tratamiento con sildenafilo	9
2. OBJETIVOS.....	11
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	13
3.1 MODELO ANIMAL	13
3.2 TRATAMIENTO CON SILDENAFILO.....	14
3.3 PREPARACIÓN DE LA MUESTRA: PERFUSIÓN	14
3.4 TÉCNICAS INMUNOHISTOQUÍMICAS.....	15
3.4.1 Inmunohistoquímica a las 4 semanas.....	15
3.4.2 Inmunohistoquímica a las 9 y 12 semanas.....	16
3.5 CUANTIFICACIÓN.....	17
3.5.1 Iba1.....	17
3.5.2 GFAP	18
3.5.3 IL-1β.....	18
3.5.4 IL-4.....	18
3.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	19
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS	20

4.1	EFFECTOS DEL SILDENAFILO SOBRE LA ACTIVACIÓN DE LA MICROGLÍA EN CEREBELO DE RATAS PCS Y SHAM	21
4.1.1	El sildenafil normaliza la activación y el número de células de microglía en cerebelo de ratas PCS a las 4 semanas tras la operación.....	21
4.1.2	El sildenafil normaliza la activación de la microglía en cerebelo de ratas PCS y no afecta al número de células de microglía a las 9 semanas tras la operación	22
4.1.3	El sildenafil no produce ningún cambio en la activación de la microglía en cerebelo de ratas PCS y altera el número de células de microglía a las 12 semanas tras la operación	23
4.1.4	La microglía está activada a las 4, 9 y 12 semanas tras la operación y aumenta el número de células por mm ² únicamente a las 4 semanas. El sildenafil normaliza la activación sólo a las 4 y 9 semanas. Análisis de la progresión temporal.....	24
4.2	EFFECTOS DEL SILDENAFILO SOBRE EL CONTENIDO DE GFAP EN CEREBELO DE RATAS PCS Y SHAM.....	26
4.2.1	El sildenafil normaliza el área cubierta de GFAP en cerebelo de ratas PCS a las 4 semanas tras la operación	26
4.2.2	El sildenafil normaliza el área cubierta de GFAP en cerebelo de ratas PCS a las 9 semanas tras la operación	28
4.2.3	El sildenafil no produce ningún cambio en el área cubierta de GFAP en cerebelo de ratas PCS a las 12 semanas tras la operación.....	29
4.2.4	El contenido de GFAP aumenta a lo largo del tiempo en ratas PCS y el sildenafil normaliza los niveles a las 4 y 9 semanas	30
4.3	EFFECTOS DEL SILDENAFILO SOBRE EL CONTENIDO DE IL-1β EN CEREBELO DE RATAS PCS Y SHAM.....	32
4.3.1	El sildenafil normaliza el número de células que presentan IL-1 β en cerebelo de ratas PCS a las 4 semanas tras la operación	32
4.3.2	El sildenafil produce un cambio en el contenido de IL-1 β en cerebelo de ratas PCS a las 9 semanas tras la operación	33
4.3.3	El sildenafil no produce ningún cambio en el contenido de IL-1 β en cerebelo de ratas PCS a las 12 semanas tras la operación.....	34
4.3.4	El contenido de IL-1 β disminuye con el tiempo en ratas PCS y el sildenafil normaliza los niveles a las 4 y 9 semanas.....	35
4.4	EFFECTOS DEL SILDENAFILO SOBRE EL CONTENIDO DE IL-4 EN CEREBELO DE RATAS PCS Y SHAM.....	37

4.4.1	El sildenafil no produce ningún cambio en el contenido de IL-4 en células de Purkinje del cerebelo de ratas PCS a las 4 semanas tras la operación.....	37
4.4.2	El sildenafil disminuye el contenido de IL-4 en células de Purkinje del cerebelo de ratas PCS y sham a las 9 semanas tras la operación.....	38
4.4.3	El contenido de IL-4 en células de Purkinje disminuye en el tiempo en ratas PCS. E tratamiento con sildenafil aumenta los niveles a las 4 semanas y los disminuye a las 9 semanas tras la operación.....	39
5.	CONCLUSIÓN	41
6.	BIBLIOGRAFÍA.....	43

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Criterios de West-Haven para la EH	2
Tabla 2. Inclusión de las muestras en parafina	15
Tabla 3. Deshidratación de las muestras	16

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Formación y detoxificación de amoníaco mediante las enzimas glutaminasa y glutamina sintetasa	3
Figura 2. Contribución del amonio y de la neuroinflamación en la encefalopatía hepática)	7
Figura 3. Deterioro cognitivo en EHM.....	8
Figura 4. Técnica inmunohistoquímica ABC.....	17
Figura 5. El sildenafil normaliza la microglía en cerebelo de ratas PCS a las 4 semanas tras la operación.. ..	22
Figura 6. El sildenafil normaliza la activación de la microglía en cerebelo de ratas PCS a las 9 semanas tras la operación.....	23
Figura 7. El sildenafil no afecta en la activación de la microglía y altera el número de células en cerebelo de ratas PCS a las 12 semanas tras la operación.....	24
Figura 8. Progresión temporal de la activación y número de células por mm ² de microglía	25
Figura 9. El sildenafil normaliza el área cubierta de GFAP en cerebelo de ratas PCS a las 4 semanas tras la operación.	28
Figura 10. El sildenafil normaliza el área cubierta de GFAP en cerebelo de ratas PCS a las 9 semanas tras la operación.. ..	29
Figura 11. El sildenafil no afecta el área cubierta de GFAP en cerebelo de ratas PCS a las 12 semanas tras la operación.. ..	30
Figrua 12. Progresión temporal del área cubierta de GFAP.	31
Figura 13. El sildenafil normaliza el número de células que presentan IL-1 β en cerebelo de ratas PCS a las 4 semanas tras la operación.....	33
Figura 14. El sildenafil normaliza el contenido IL-1 β en cerebelo de ratas PCS a las 9 semanas tras la operación.....	33
Figura 15. El sildenafil no afecta en el contenido IL-1 β en cerebelo de ratas PCS a las 12 semanas tras la operación... ..	35
Figura 16. Progresión temporal del contenido de IL-1 β	36
Figura 17. El sildenafil no afecta en el contenido de IL-4 en células Purkinje del cerebelo de ratas PCS a las 4 semanas tras la operación.....	38

Figura 18. El sildenafil disminuye el contenido de IL-4 en células Purkinje del cerebelo de ratas PCS y sham a las 9 semanas tras la operación	39
Figura 19. Progresión temporal del contenido de IL-4.....	40

ABREVIATURAS

ABC: Avidin-Biotin Complex (Complejo Avidina-biotina)

BDL: Bile duct ligation (ligadura del conducto biliar)

BHE: Barrera hematoencefálica

CaMKII: Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II (proteína quinasa dependiente de calcio/calmodulina)

COX2: Ciclooxygenasa 2

DAB: Diaminobenzidina

EH: Encefalopatía Hepática

EHM: Encefalopatía Hepática Mínima

FHA: Fallo hepático agudo

FHC: Fallo hepático crónico

GABA: Ácido γ -aminobutírico

GFAP: proteína ácida fibrilar glial

GMPc: Guanosín monofosfato cíclico

GS: Glutamina Sintetasa

Iba1: Ionized calcium binding adaptor molecule 1 (molécula adaptadora de unión a calcio ionizado tipo 1)

IL: Interleuquina

iNOS: óxido nítrico sintasa inducible

LPS: Lipopolisacáridos

M: Molar

NMDA: N-metil-D-aspartato

NO: Óxido nítrico

PB: Phosphate Buffer (tampón fosfato)

PBS: Phosphate-buffered saline (tampón fosfato salino)

PCS: Porto-caval shunt (anastomosis porto-cava)

PDE: Fosfodiesterasa

PGE2: Prostaglandina E2

PTA: PBS + Tritón+ Albúmina

SEM: Standard error of the mean (error estándar de la media)

Ser: Serina

SNC: Sistema Nerviosos central

SNc: Sustancia negra pars compacta

TFG: Trabajo fin de grado

VTA: Ventral tegmental area (área tegmental ventral)

1. Introducción

1.1 LA ENCEFALOPATÍA HEPÁTICA

El hígado es un órgano vital que tiene funciones metabólicas, de almacenamiento, de detoxificación e inmunológicas. El hígado sintetiza proteínas, glúcidos y lípidos; actúan como órgano de depósito de numerosas sustancias útiles para el organismo (glucógeno, vitaminas, hierro...) y elimina la mayoría de compuestos tóxicos (fármacos y otros productos químicos) (Segarra, 2007). Cuando el hígado falla debido a un fallo hepático agudo (FHA) o crónico (FHC) este no funciona adecuadamente de manera que los compuestos tóxicos pueden alcanzar el cerebro y afectar a la función cerebral. La encefalopatía hepática (EH) es el término usado para describir las alteraciones en la función cerebral que resultan de un fallo hepático. Los diferentes tipos de fallos hepáticos (agudos o crónicos) llevan a diferentes alteraciones neurológicas y cerebrales y, por tanto, a diferentes formas de EH, cada una de ellas mediadas por diferentes mecanismos y requieren diferentes tratamientos (Felipo, 2013).

Las manifestaciones clínicas de la EH pueden ser extremadamente heterogéneas, con síntomas que abarcan desde un rendimiento cognitivo normal hasta estados de confusión, estupor o coma. Dentro de estos extremos, los pacientes con EH pueden tener síntomas como déficit de atención, deterioro de la memoria, cambios en el ciclo vigilia-sueño, así como manifestaciones físicas, tales como temblor, mioclonía, hiperreflexia y asterixis (Aldridge *et al.*, 2015). Por este motivo han surgido diversas escalas para la valoración clínica de los grados de EH, siendo los criterios de West-Haven los más ampliamente utilizados en la práctica clínica (Tabla 1) (Cortés y Córdoba, 2012).

Tabla 1. Criterios de West-Haven para la EH

Grados	Nivel de conciencia	Hallazgos clínicos	Hallazgos neurológicos
0	Normal	Ninguno	Ninguno (valorar EHM)
1	Confusión leve	Cambio de humor, conducta inapropiada, déficit de atención, dificultad para elaborar ideas, irritabilidad, alteraciones del ciclo sueño/vigilia	Temblor o asterixis leve
2	Letargia	Desorientación temporal, gran dificultad para practicar tareas mentales, cambio marcado de la personalidad	Asterixis manifiesta, dificultad para hablar
3	Estupor	Imposibilidad de realizar tareas mentales, desorientación en tiempo y espacio, amnesia, habla ininteligible, agitación psicomotriz	Rigidez muscular y clonus, hiperreflexia
4	Coma	Coma	Postura descerebración

Se pueden distinguir dos tipos principales de EH: (i) EH aguda, caracterizada por una repentina pérdida de la función hepática y que, por tanto, conduce a una rápida progresión de los síntomas (edema cerebral e incremento de la presión intracraneal) y (ii) EH crónica, debida a un fallo hepático crónico asociado a una cirrosis, hepatitis o hipertensión portal. Además, existe una forma no clínica en el que el paciente no tiene síntomas evidentes de EH, la Encefalopatía Hepática Mínima (EHM). La EHM cursa con alteraciones en la actividad y coordinación motora, en la función cognitiva y en el ciclo sueño-vigilia, disminuyendo la calidad de vida de estos pacientes y haciéndolos propensos a sufrir accidentes laborales, domésticos y de tráfico junto a una predisposición a sufrir la forma clínica de la enfermedad (Felipo 2013).

1.2 PATOGÉNESIS DE LA ENCEFALOPATÍA HEPÁTICA

Para diseñar tratamientos efectivos para la EH se requiere entender los mecanismos fundamentales de las alteraciones neurológicas. Los dos principales responsables de la EH son la hiperamonemia e inflamación.

1.2.1 Hiperamonemia

El amonio es un subproducto del metabolismo del nitrógeno, y su formación en el cuerpo es una consecuencia de la acción de la enzima glutaminasa localizada dentro de los enterocitos del intestino delgado y colon, así como por la acción de un elevado número de bacterias productoras de ureasa localizadas en el intestino. El amonio producido en el intestino es absorbido y pasa a la circulación portal hepática y es transportado al hígado donde, bajo condiciones fisiológicas normales, entra en el ciclo de la urea y es metabolizado. El amonio que no se detoxifica por esta vía se detoxifica gracias a la glutamina sintetasa (GS), una enzima encontrada en los hepatocitos que rodean las venas hepáticas, así como en astrocitos o músculo y que cataliza la conversión de amonio y glutamato en glutamina (Fig.1). Mientras que el hígado es esencial en el control homeostático de los niveles de amonio en sangre, otros órganos como el cerebro, el músculo y el riñón, también son conocidos por jugar un papel en su regulación. El hígado puede reducir su capacidad de metabolizar amonio y esto ejerce una carga de amoniaco en los tejidos extrahepáticos lo cual puede resultar en una hiperamonemia, hasta 5 veces mayor a los niveles normales de amonio en la sangre (Ott y Vilstrup, 2014).

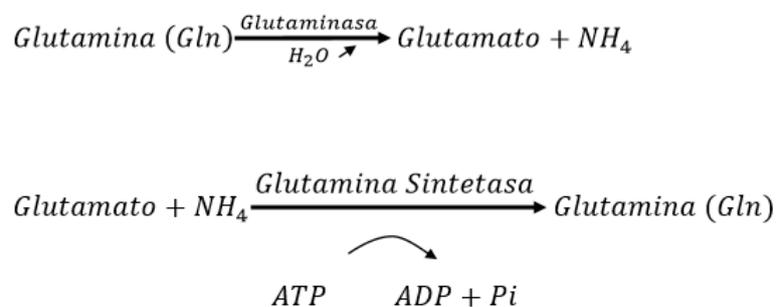


Figura 1. Formación y detoxificación de amoniaco mediante las enzimas glutaminasa y glutamina sintetasa

1.2.2 Neuroinflamación

La neuroinflamación es la respuesta inflamatoria en el cerebro y se caracteriza por la activación de la microglía y la producción en el cerebro de mediadores pro-inflamatorios. Las células endoteliales vasculares, junto con los astrocitos, son los componentes mayoritarios en la barrera hematoencefálica (BHE). Las células endoteliales liberan diferentes mediadores pro-inflamatorios en el cerebro cuando están estimuladas por una inflamación sistémica. Además, las células de la microglía son los macrófagos del cerebro y pueden ser activados por mediadores pro-inflamatorios, liberando varios tipos de quimiocinas con propiedades inflamatorias. Estos mecanismos contribuyen al desarrollo de la neuroinflamación en el cerebro (Luo *et al.*, 2015).

Se ha demostrado, mediante animales de experimentación, que la neuroinflamación juega un papel importante en la patogénesis de la EH producida por cirrosis. Los déficits motores como enlentecimiento psicomotor e hipoquinesia son algunos signos comúnmente presentados en pacientes cirróticos con EH. Estos signos se reproducen en modelos animales de EH como el modelo de anastomosis porto-cava (PCS) o el de ligadura biliar (BDL). Un estudio realizado por Cauli *et al.* (2007) reveló que las ratas PCS mostraron un incremento en los niveles de IL-6 y de las actividades de la ciclooxigenasa-2 (COX2) y óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) en el córtex cerebral, indicando la presencia de neuroinflamación. El tratamiento con un anti-inflamatorio, ibuprofeno, puede normalizar las actividades de la COX-2 y de la iNOS y restaurar la capacidad de aprendizaje de una tarea de discriminación condicionada en un laberinto en Y en ratas PCS. Además, las ratas BDL mostraron una activación de la microglía en el cerebelo, incrementando los niveles de iNOS, IL-1 β y prostaglandina E2 (PGE2) afectando a las funciones cognitivas y motoras de las ratas. Similarmente, el ibuprofeno mejora la neuroinflamación y restaura las funciones cognitivas y motoras de ratas BDL. Estos hallazgos indican que la neuroinflamación produce alteraciones cognitivas y motoras en modelos animales de EH y que los tratamientos anti-inflamatorios pueden mejorar los déficits cognitivos en pacientes cirróticos con EH. Sin embargo, en pacientes cirróticos con EH, la activación de la microglía no ha demostrado estar correlacionada con un incremento en la expresión de TNF- α , IL-1 β e IL-6 en el córtex cerebral (Luo *et al.*, 2015).

Los marcadores inflamatorios en los que nos vamos a centrar en el presente trabajo de fin de grado son: Iba1, IL-1 β , IL-4 y GFAP.

1.2.2.1 Iba1

Iba1 es una proteína de unión al calcio y que es específica de microglía/macrófago.

La microglía tiene un papel importante en la reparación del tejido y en la defensa del sistema nervioso. Cuando el cerebro está dañado, la microglía ramificada (reposo) rápidamente se transforma hasta un estado activado que se caracteriza por presentar un cambio morfológico (de estrellada a ameboides), proliferar, migrar, liberar una variedad de citoquinas y presentar una función de fagocitosis. (Imai y Kohsaka, 2002). En este estado activado es cuando Iba1 se expresa. (Ohsawa *et al.*, 2004).

Se ha demostrado que en ratas con EH, el amonio induce la activación de la microglía y ésta expresa la proteína Iba1 que se encarga de transducir las señales de calcio para la

reorganización del citoesqueleto y, por tanto, permite cambios morfológicos y de migración celular (Zemtsova *et al.*, 2011)

1.2.2.2 IL-1 β

La IL-1 β es una citoquina pro-inflamatoria que tiene efectos pleiotrópicos en varias células, además de estar implicada en el dolor, en la inflamación crónica y aguda y en desórdenes autoinmunes. Esta IL-1 β tiene funciones homeostáticas en el organismo como en la regulación de la alimentación, el sueño y la temperatura. Sin embargo, la sobreproducción de IL-1 β está implicada en los cambios patofisiológicos que ocurren durante enfermedades como la osteoartritis, la esclerosis múltiple y la enfermedad de Alzheimer. La IL-1 β es liberada por queratinocitos, fibroblastos, sinoviocitos, células neuronales, endoteliales e inmunes como macrófagos y mastocitos y por células gliales como células Schwann, microglía y astrocitos y es un mediador importante de la respuesta inflamatoria. Participa, también en la proliferación celular, diferenciación y apoptosis (Ren y Torres, 2009).

1.2.2.3 IL-4

La IL-4 es una citoquina anti-inflamatoria pleiotrópica producida principalmente por células T activadas, mastocitos, basófilos y eosinófilos. La IL-4 regula la proliferación celular, la apoptosis y la expresión de numerosos genes en varios tipos celulares incluyendo los linfocitos, macrófagos y fibroblastos así como células endoteliales y epiteliales (Luzina *et al.*, 2012). La IL-4 derivada de células T participa en algunas funciones cerebrales como la memoria y el aprendizaje; se observa menos capacidad cognitiva en tareas de aprendizaje espacial en ausencia de esta citoquina, por lo que su presencia es beneficiosa.

Algunos estudios recientes demuestran que la IL-4 actúa en los macrófagos como un agente anti-inflamatorio y es capaz de disminuir la producción de citoquinas inflamatorias como TNF- α . Además, la IL-4 tiene un papel importante en la alergia y en enfermedades inmunológicas donde es secretada por células T para inducir la activación de células B. También influye en enfermedades neurológicas como el Alzheimer, la esclerosis múltiple y en glioblastoma multiforme. En la enfermedad del Alzheimer, el tratamiento con IL-4 puede revertir ciertos aspectos de esta patología en modelos animales (Gadani *et al.*, 2012).

1.2.2.4 GFAP

GFAP es la proteína ácida fibrilar glial y es una proteína fibrosa que forma los filamentos intermedios del citoesqueleto en células gliales como los astrocitos y células de Schwann.

Los astrocitos son células gliales que se encuentran en el sistema nervioso central (SNC) y que tienen un papel importante en las funciones cerebrales, como la provisión de nutrientes y soporte mecánico a las neuronas, la regulación del transporte de iones y neurotransmisores en el cerebro.

En pacientes con EH, los astrocitos son las células más afectadas debido a la exclusiva localización de GS en el SNC. La comunicación entre los astrocitos y las neuronas llevan a la liberación de varios factores neurotróficos para mantener la homeóstasis del SNC. La activación de los astrocitos está implicada en la patogénesis de varias enfermedades

neurodegenerativas como el Alzheimer o en encefalopatías. Aunque los astrocitos activados secretan diferentes factores neurotróficos para la supervivencia neuronal, una rápida activación puede iniciar una respuesta inflamatoria llevando a una muerte neuronal y a un daño cerebral. Después de la activación, los astrocitos secretan varias sustancias neurotóxicas y expresan más GFAP, que es una proteína marcadora de astrogliosis. En varias enfermedades neuroinflamatorias, el incremento en la expresión de GFAP representa una activación de la astrogliosis (Brahmachari *et al.*, 2006).

1.2.3 Sinergismo amonio-inflamación

En una cirrosis se presenta tanto inflamación sistémica como hiperamonemia. A nivel celular, TNF- α e IL-6 influyen en la permeabilidad de la BHE, y las células endoteliales cerebrovasculares incrementan la entrada de amonio cuando se exponen a TNF- α *in vitro*. La hiperamonemia conduce a la acumulación de lactato en el cerebro, y tanto la inflamación sistémica como la acumulación de lactato en el cerebro, activan a la microglía e incrementan la producción de TNF- α , IL-1 β e IL-6. Por tanto, se cree que el amonio actúa junto con la inflamación de una manera sinérgica en la patogénesis de la EH (Fig.2) (Luo *et al.*, 2015).

Marini *et al.* (2006) encontraron que los ratones con hiperamonemia crónica exhibían déficits motores y cognitivos cuando se trataban con lipopolisacáridos (LPS). Además, la hiperamonemia crónica inducía la activación de la microglía y la subsecuente neuroinflamación que estaban asociados con los déficits cognitivos y motores de ratas BDL. En un estudio por Jover *et al.* (2006) aunque tanto ratas BDL y ratas BDL alimentadas con amonio presentaban una activación de la microglía en el cerebro, las ratas alimentadas con amonio demostraron déficits motores severos comparado con las ratas BDL. Igualmente, pacientes cirróticos con inflamación sistémica e hiperamonemia también mostraron un deterioro significativo de las funciones motoras y cognitivas. Felipo *et al.* (2012) han descubierto que el efecto sinérgico de la hiperamonemia y la inflamación eran suficientes para inducir deterioro cognitivo en pacientes cirróticos con EH mínima. Esto demuestra que hay una relación sinérgica entre la hiperamonemia y la inflamación en la patogénesis de la EH. (Luo *et al.*, 2015).

La hiperamonemia en sí induce neuroinflamación. Las ratas con hiperamonemia crónica pero sin fallo hepático muestran activación de la microglía y neuroinflamación, especialmente en el cerebelo (Rodrigo *et al.*, 2010). El tratamiento de estas ratas con un anti-inflamatorio restaura la función cognitiva, lo que sugiere que la neuroinflamación inducida por hiperamonemia tiene un papel importante en el deterioro neurológico en EHM (Felipo, 2013).

La inflamación exagera los déficits cognitivos inducidos por hiperamonemia y la hiperamonemia reduce la coordinación motora en ratas con inflamación. La combinación de la hiperamonemia y la inflamación induce un deterioro cognitivo leve en humanos incluso en ausencia de enfermedad hepática (Felipo, 2013).

En microglía en cultivo, el amonio regula Iba1, el cual está incrementado en el cerebro de pacientes con EH. Por tanto, el amonio puede actuar directamente en la microglía para inducir su activación pero puede también inducir neuroinflamación a través de efectos periféricos que son, entonces transducidos al cerebro. Esto puede ocurrir transfiriendo citoquinas pro-inflamatorias desde la sangre al cerebro produciendo que la BHE sea más permeable, o por infiltración directa de las células inmunes de la sangre. Las citoquinas de la

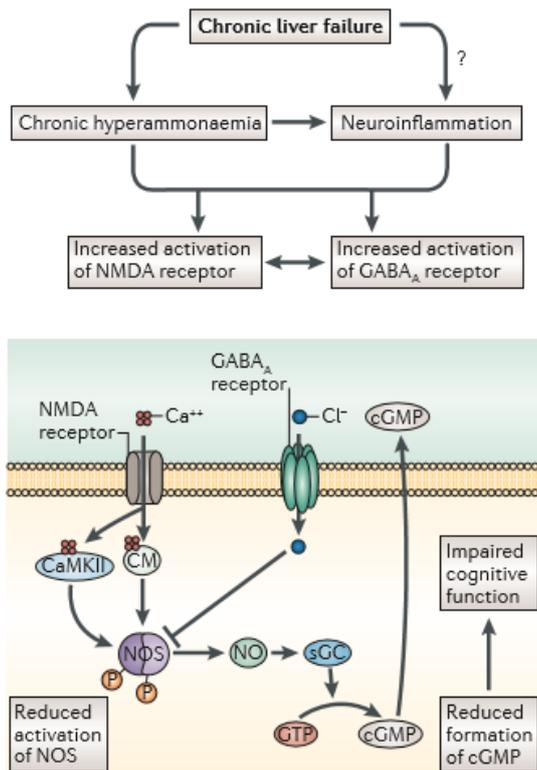


Figura 3. Deterioro cognitivo en EHM. La hiperamonemia crónica reduce la función de la vía glutamato-óxido nítrico-GMPc y aumenta la activación de los receptores NMDA y GABA tipo A, llevando a un incremento de la actividad de la proteína quinasa dependiente de calmodulina/ calcio (CaMKII) la cual fosforila (P) la óxido nítrico sintasa neuronal (NOS) reduciendo su actividad y la formación de NO. Esto produce una baja actividad de la guanilato ciclasa soluble y una reducción en la síntesis de GMPC lo que lleva a una reducción de la capacidad de aprendizaje. La neuroinflamación daña la función de esta vía en el cerebelo (Felipo, 2013)

La hiperamonemia crónica incrementa la activación de los receptores NMDA en el cerebelo, incrementando el calcio en neuronas postsinápticas. El calcio se une a la calmodulina y a la proteína quinasa II dependiente de calcio (CaMKII) incrementando la fosforilación de la óxido nítrico sintasa (NOS) neuronal en Ser847. Esto reduce la actividad de la enzima y, por tanto, de la formación del óxido nítrico (NO) y GMPC. La menor formación de GMPC en el cerebelo está relacionada con la reducción en la capacidad de aprendizaje. La restauración de los niveles extracelulares de GMPC en el cerebelo restaura el aprendizaje en ratas con EH y esto se puede conseguir inhibiendo la fosfodiesterasa 5 (PDE 5), que es una enzima que juega un papel importante en la regulación de los niveles de GMPC (Erceg *et al.*, 2005).

Por otro lado, la neuroinflamación también disminuye la función de la vía en ratas PCS o con hiperamonemia. Tanto las ratas PCS como las hiperamonémicas presentan una activación de la microglía y un aumento de la neuroinflamación en cerebelo. Se observa un aumento de marcadores inflamatorios como la actividad de la COX-2 o iNOS y de los niveles de PGE2 e interleucinas inflamatorias como IL-6 y TNF- α . Esta neuroinflamación contribuye a la disminución de la función de la vía. El tratamiento con un fármaco anti-inflamatorio reduce la activación de la microglía y la neuroinflamación en el cerebelo y restaura el aprendizaje (Felipo, 2013).

Se conocen 11 familias génicas diferentes para las PDE (PDE1-PDE11). De entre ellas, la PDE5 es una enzima que se expresa altamente en las células de Purkinje y en otras áreas

cerebrales como el hipocampo, en la sustancia negra y en el cerebelo. La PDE5 es responsable de la degradación de los nucleótidos cíclicos, produciendo GMP a partir de GMPc. Por tanto, esta enzima reduce la concentración de GMPc por lo que cuando funciona incorrectamente puede contribuir a una enfermedad neurodegenerativa. La inhibición de la PDE5 produce una acumulación de GMPc y por tanto, puede inhibir la neuroinflamación y mejorar las funciones cognitivas (Peixoto *et al.*, 2015).

1.4 ESTRATEGIAS TERAPÉUTICAS EMERGENTES

Los tratamientos para pacientes con EH pretenden reducir los niveles de amonio reduciendo la ingesta de proteínas y la producción de amoniaco por la flora intestinal usando antibióticos no absorbibles (neomicina) o disacáridos (lactulosa) los cuales también reducen la absorción de amoniaco acidificando el lumen intestinal.

Estudios recientes han demostrado que la rifaximina es más efectiva que la neomicina para el tratamiento de EHM. La rifaximina es capaz de modificar el metabolismo bacteriano y los metabolitos, incrementando el nivel de ácidos grasos. También es capaz de reducir la inflamación periférica. Los probióticos reducen los niveles de amoniaco y producen una mejora en los test psicométricos en pacientes con EHM. Los probióticos son mejor tolerados y presentan menos efectos adversos que la lactulosa y pueden ser útiles para profilaxis y tratamiento de EH. Nuevos compuestos que pueden incrementar la eliminación de amoniaco son L-ornitina-L-aspartato, ornitina fenilacetato y AST-120, un absorbente carbón microsérico. Su efectividad en el tratamiento de EH aún tiene que ser demostrada (Felipo, 2013).

Una de las estrategias terapéuticas consiste en reducir la neuroinflamación. El ibuprofeno reduce la neuroinflamación y restaura la capacidad de aprendizaje y la hipoquinesia en ratas con EHM. Los inhibidores de p38 también efectúan una función anti-inflamatoria ya que reducen la activación de la microglía y por tanto, restauran las funciones tanto cognitivas como motoras (Agustí *et al.*, 2011).

También se han descrito nuevas aproximaciones terapéuticas en dianas específicas en el cerebro que podrían mejorar las funciones cognitivas y motoras en pacientes con EHM.

Los inhibidores de la PDE5 producen un aumento de los niveles de GMPc en el cerebelo y han demostrado restaurar las funciones cognitivas en ratas con EHM. Estos inhibidores han sido usados para tratar la disfunción eréctil en muchos pacientes cirróticos sin mostrar efectos secundarios (Felipo, 2013).

1.4.1 Tratamiento con sildenafil

El sildenafil es un fármaco usado para el tratamiento de la disfunción eréctil masculina. Se trata de un inhibidor de la PDE5. Los inhibidores de la PDE5 aumentan los niveles de GMPc en el cerebro y ofrecen una mejora de las capacidades cognitivas y de la memoria, reducen la muerte neuronal producida por un daño cerebrovascular, disminuyen el daño de la sustancia blanca y regulan las respuestas inflamatorias en ratas con esclerosis múltiple (Raposo *et al.*, 2013). Estudios recientes han demostrado que el sildenafil tiene una acción anti-inflamatoria, reduciendo los niveles de citoquinas pro-inflamatorias y COX-2 y protegiendo la

estructura de mielina. Sin embargo el mecanismo por el cual el sildenafil tiene un papel neuroprotector no se sabe con certeza (Raposo *et al.*, 2013).

Se piensa que la manipulación farmacológica de la vía Glu-NO-GMPc puede restaurar la capacidad de aprendizaje. Erceg *et al.* (2005). demostraron que el sildenafil normaliza la función de esta vía aumentando el GMPc y por tanto, mejorando las funciones cognitivas en ratas con EH. El sildenafil es un inhibidor de la PDE5 y, por tanto, se usa para mejorar la función cerebral en modelos animales de EH, además se ha demostrado que reduce la neuroinflamación en hipocampo y mejora la capacidad cognitiva en un modelo de ratón transgénico de Alzheimer. El sildenafil también reduce los niveles de IL-1 β en cerebelo en un modelo inflamatorio de ratón y restaura el aprendizaje de una tarea condicional de laberinto en Y, principalmente modulada en cerebelo, en ratas PCS. Las ratas PCS muestran un incremento de los niveles de IL-1 β y TNF- α en el hipocampo y estos niveles se pueden revertir con el tratamiento con sildenafil. Este tratamiento no afecta a la cantidad de IL-1 β y de TNF- α en ratas controles pero sí que lo reduce a niveles normales en ratas PCS. Además, se ha demostrado, mediante inmunohistoquímica, que el sildenafil reduce la activación de la microglía en hipocampo en ratas PCS, además de restaurar el aprendizaje espacial (Hernandez-Rabaza *et al.*, 2015).

2. Objetivos

Los objetivos de este trabajo final de grado son los siguientes:

1. Evaluar la neuroinflamación en cerebelo de ratas PCS que es un modelo animal de EH y ratas sham (controles) analizando mediante inmunohistoquímica los marcadores inflamatorios Iba1, IL-4, IL-1 β y GFAP.
2. Evaluar la progresión de cada uno de estos marcadores inflamatorios a las 4, 9 y 12 semanas en el cerebelo de ratas PCS y sham.
3. Estudiar cómo afecta el tratamiento con sildenafil a los marcadores inflamatorios Iba1, IL-4, IL-1 β y GFAP en cerebelo de ratas PCS y sham.

3. Material y métodos

3.1 MODELO ANIMAL

En este TFG se utilizaron ratas albinas macho de la cepa Wistar (*Rattus norvegicus*) suministradas por Charles River. Los animales se estabularon en jaulas en un ambiente controlado: ciclo de 12 horas de luz (7h-19h) y 12 h de oscuridad (19h-7h), 23 ± 1 °C de temperatura y una humedad del $55 \pm 5\%$. Los animales se alimentaron con piensos comerciales y tuvieron libre acceso a agua y comida.

Se utilizaron 4 grupos experimentales: (i) ratas controles con una operación simulada (sham), (ii) ratas sham tratadas con sildenafil, (iii) ratas sometidas a una anastomosis portocava (PCS) y (iv) ratas PCS tratadas con sildenafil. En este trabajo se empleó el modelo PCS que consiste en una cirugía en la que se hace una conexión entre la vena porta, que suministra la mayor parte de la sangre al hígado, y la vena cava según el procedimiento descrito por Lee y Fisher (1961). La nueva conexión impide que la sangre del intestino pase a través del hígado de manera que se disminuye la detoxificación de sustancias.

3.2 TRATAMIENTO CON SILDENAFILO

Las ratas fueron tratadas con sildenafil purificado a partir de Viagra y suministrado en la bebida a una concentración de 50 mg/L. El tratamiento empezó 1 semana después de la cirugía PCS o sham.

3.3 PREPARACIÓN DE LA MUESTRA: PERFUSIÓN

4 semanas después de la operación, se anestesiaron las ratas con pentobarbital de sodio y se llevó a cabo una perfusión transcardíaca con 0,9% de solución salina seguido de paraformaldehído al 4% en tampón fosfato a 0,1 M (pH 7.4). Se extrajeron los cerebros y se fijaron en la misma solución fijadora durante 24 horas a 4° C. Se hicieron cortes horizontales con el micrótopo de 5 micrómetros tras incluir las muestras en parafina (Tabla 2) y se montaron en los portaobjetos.

Tanto a las 9 como a las 12 semanas después de la operación, se anestesiaron las ratas con pentobarbital de sodio y se llevó a cabo una perfusión transcardíaca con 0,9% de solución salina seguido de paraformaldehído al 4% en tampón fosfato a 0,1 M (pH 7.4). Se extrajeron los cerebros y se realizaron cortes coronales de 30 micrómetros con un vibrátomo sin inclusión en parafina.

Tabla 2. Inclusión de las muestras en parafina

Reactivo	Duración (horas)
Formalin	1:00
Ethanol 70%	00:45
Ethanol 90%	00:45
Ethanol Absolute	00:45
Ethanol Absolute	1:00
Ethanol Absolute	1:00
Ethanol Absolute	1:00
Xylene	00:45
Xylene	1:00
Xylene	1:15
Histowax (parafina)	1:00
Histowax (parafina)	1:00
Histowax (parafina)	1:00

3.4 TÉCNICAS INMUNOHISTOQUÍMICAS

3.4.1 Inmunohistoquímica a las 4 semanas

Las secciones de tejido se procesaron con Envision Flex+kit (DAKO) bloqueando la actividad peroxidasa endógena durante 5 minutos, se realizó una recuperación antigénica a 95° durante 20 minutos y posteriormente se incubaron con el anticuerpo primario. La IL-4 se incubó durante 40 minutos a una dilución 1:50, GFAP (listo para usar) durante 20 minutos, Iba1 30 minutos a dilución 1:300 y la IL-1 β 30 minutos a 1:100. Posteriormente se incubó con el anticuerpo secundario que contiene peroxidasa durante 20 minutos (listo para usar) y se visualizó mediante diaminobenzidina (DAB) la cual se incubó durante 10 minutos. Los cortes se contratiñeron con hematoxilina durante 5 minutos para marcar los núcleos. Por último, se realizó una deshidratación (Tabla 3) y se procedió a cubrir los portaobjetos. Las muestras se escanearon con el programa Panoramic Scanner con el fin de cuantificarlas.

Tabla 3. Deshidratación de las muestras

Reactivos	Duración (horas)
96% ETHANOL 4	00:30
99,9% ETHANOL 2	01:00
99,9% ETHANOL 3	01:00
99,9% ETHANOL 4	01:00
EXIT SOLVENT	02:00

3.4.2 Inmunohistoquímica a las 9 y 12 semanas

Se realizó una inmunohistoquímica mediante el complejo avidina-biotina-peroxidasa (ABC) para corroborar la presencia y la cantidad de los marcadores inflamatorios en el cerebro. (Fig. 4)

Para ello, se escogieron 3 cortes de cerebelos por animal, se pusieron en una placa 6x4 y se realizaron 3 lavados de 5 minutos con tampón fosfato (PB) 0,1 M y en agitación. Para eliminar la actividad de la peroxidasa endógena se utilizó peróxido de hidrógeno (H₂O₂) al 3% diluido en PB durante 15 minutos. Después se realizaron 3 lavados de 5 minutos con una solución de tampón fosfato salino (PBS) 0,1 M + Tritón 0,1 % + Albúmina 0,1 % (PTA). Para el bloqueo, se usó suero de cabra, que es el suero con el que se había obtenido el anticuerpo secundario, al 6% con PTA durante una hora. Con este procedimiento se consigue mejorar la penetración de los anticuerpos y reducir las uniones inespecíficas. Posteriormente las muestras se incubaron con el anticuerpo primario Iba1 (1:200), GFAP (1:400), IL-4 (1:200) o IL-1 β (1:200) en PTA junto con el suero a 1:100 a una temperatura de 4°C durante toda la noche. Una vez finalizada la incubación, los cortes de cerebelo se lavaron con PTA 3 veces durante 5 minutos y posteriormente se incubó con el anticuerpo secundario biotinilado a dilución 1:200 en PTA. Se quitó el exceso de anticuerpo secundario mediante 3 lavados con PBS 0,1 M de 5 minutos y se incubaron los cerebelos con el complejo avidina-biotina-peroxidasa (ABC) durante una hora en oscuridad. El ABC fue preparado media hora antes para permitir la formación del complejo avidina-biotina y las diluciones fueron de 1:100 de avidina y 1:100 de biotina con la solución PBS 0,1M. Tras el lavado con PB 0,1M se reveló mediante DAB durante 5 minutos. Para la preparación del DAB se añadió 20 mg de DAB cada 100 mL de PB, se llevó a agitación y se añadió 3 μ L de H₂O₂. Una vez revelado, se realizaron 3 lavados de 5 minutos con PB. Cada uno de los cortes se puso en el correspondiente portaobjetos y se llevó a cabo la deshidratación mediante alcoholes de graduación creciente (alcohol al 50% durante 3 minutos, al 70% durante 5, al 90% durante 7 y al 100%, 10 minutos), posteriormente se aclaró con xilol durante 10 minutos, y se procedió al montaje de los portaobjetos mediante Entellan. Las muestras se escanearon con el programa Panoramic Scanner con el fin de cuantificarlas.

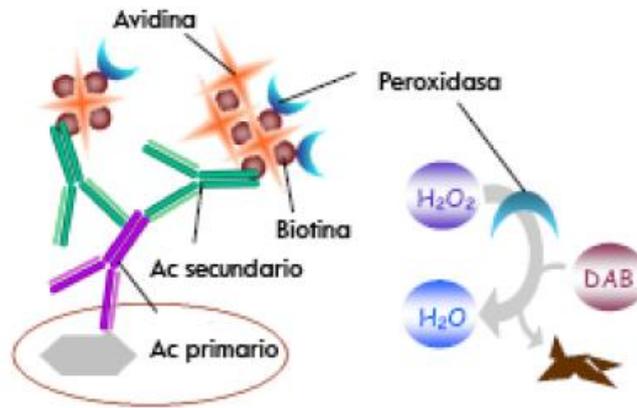


Figura 4. Técnica inmunohistoquímica ABC

3.5 CUANTIFICACIÓN

Para la cuantificación de cada uno de los marcadores inflamatorios se usaron dos programas: Pannoramic Viewer e Image J. El primero de ellos es un programa que permite visualizar las imágenes escaneadas del portaobjetos y se usó para realizar fotos de cada una de las muestras. ImageJ es un programa de análisis y procesamiento de imágenes. En la mayoría de casos, las imágenes se procesaron modificando el fondo, el contraste y convirtiendo a 8 bit, para poder cuantificarlas. El fondo de la imagen se corrige mediante un algoritmo y éste se basa en corregir la desigual iluminación de la foto. El contraste se mejora aumentándolo. El área cerebral en la que se ha centrado este estudio es el cerebelo.

Cada uno de los marcadores inflamatorios se estudió a las 4, 9 y 12 semanas después de la operación con el fin de observar su evolución. Por tanto, para cada una de las semanas (4, 9 y 12) se observó cada uno de los marcadores inflamatorios (Iba1, GFAP, IL-4 e IL-1 β) en los 4 grupos de animales (sham, sham + sildenafil, PCS y PCS + sildenafil).

3.5.1 Iba1

Para Iba1, el marcador de la microglía, se cuantificó tanto el número de células a las 4, 9 y 12 semanas como la activación de ésta en la sustancia blanca del cerebelo. La microglía que está activada tiene una morfología amebode mientras que la que no está activada presenta ramificaciones por lo que una forma activada tendrá un perímetro menor.

Para la cuantificación del número de microglía se realizaron 20 fotos con Pannoramic Viewer a 30X de cada uno de los animales. De cada una de estas fotos, mediante el programa ImageJ se contaron manualmente el número de células utilizando la función "cell counter". Los resultados se expresaron como células/mm² y se normalizaron respecto al control. Este procedimiento se realizó para cada una de las semanas. Para la semana 4 se han usado 3 animales de cada grupo y para las semanas 9 y 12 se han usado 2 de cada grupo.

Para calcular la activación, se realizaron 20 fotos por animal a 56X, un aumento superior al anterior ya que en este caso interesa observar la morfología de la célula. Las fotos se modificaron mejorando el fondo de la imagen, el contraste y la conversión a 8 bit. A las imágenes resultantes se les aplicó un filtro de intensidad llamado Default White así como un

filtro de tamaño de 1500-20000 píxeles con el fin de escoger únicamente a la microglía. Posteriormente se revisaron cada una de las imágenes para comprobar que, efectivamente, se había seleccionado microglía. Los resultados se pasaron a micrómetros y posteriormente se expresaron en porcentaje respecto al control. El procedimiento se realizó para cada una de las semanas

3.5.2 GFAP

Para el marcador de astrocitos (GFAP), se cuantificó el área cubierta de GFAP en la fotografía a las 4, 9 y 12 semanas.

Para conocer la cantidad de GFAP total se hicieron 20 fotos a 56x en la sustancia blanca del cerebelo con Panoramic Viewer de cada uno de los animales. Estas fotografías, mediante ImageJ, se modificaron mejorando el fondo y el contraste, y realizando una conversión a 8 bit. Posteriormente, se aplicó un filtro de intensidad llamado Triangle White y, en este caso no se aplicó un filtro de tamaño. Los resultados se expresaron en porcentaje respecto al control. Para la semana 4 se usaron 3 animales de cada grupo y para la 9 y 12 se usaron 2 de cada grupo.

3.5.3 IL-1 β

Para la citoquina pro-inflamatoria IL-1 β , se cuantificó el número de células que presentan la citoquina a las 4 semanas y el área cubierta de esta en la imagen a las 9 y 12 semanas.

Para analizar la IL-1 β a las 4 semanas se realizaron 20 fotografías por animal en la sustancia blanca del cerebelo con Panoramic Viewer y mediante el programa ImageJ se ha contado manualmente el número de células que expresan IL-1 β . Los resultados se han expresado en células/mm² y posteriormente se han pasado a porcentaje respecto al control (sham).

Para analizar la IL-1 β las 9 y 12 semanas se realizaron 20 fotografías por animal con Panoramic Viewer, se procesaron con el programa ImageJ de manera que se mejoró el fondo, el contraste y se convirtió a 8 bit. A las imágenes se les ha aplicado un filtro de intensidad llamado Triangle White sin aplicar un filtro de tamaño. Los resultados se han expresado en porcentaje respecto al control (sham).

Para el estudio a la semana 4 se han usado 3 animales de cada grupo y para la 9 y 12 se han usado 2 de cada grupo.

3.5.4 IL-4

Para la cuantificación de la IL-4, se midió la intensidad de las células Purkinje de cada imagen; significando una mayor intensidad, mayores niveles de IL-4. El procedimiento se ha realizado a las 4 y 9 semanas.

Para la cuantificación a las 4 semanas de esta citoquina anti-inflamatoria, se realizaron 10 fotos de la capa de Purkinje a 56X por animal con Panoramic Viewer. Para cada una de las imágenes, se rodearon las células Purkinje manualmente con el programa ImageJ, se realizó una reversión de cada imagen y se midió la intensidad de cada célula. La imagen se revirtió

para que una intensidad mayor corresponda a un valor mayor. Para la cuantificación a las 9 semanas el procedimiento fue el mismo pero las células de Purkinje no fueron rodeadas manualmente, ya que se realizó un filtro de intensidad llamado Min Error con un tamaño de filtro de 800-4000 píxeles. Los resultados se expresaron en porcentaje respecto a los controles.

3.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico se realizó mediante el software Graph Pad Prism 4. Los datos obtenidos de la cuantificación se analizaron mediante one-way ANOVA y se compararon todos los pares de columnas mediante test Bonferroni. Los p-value menores de 0,05 se consideraron estadísticamente significativos representados por asterisco “*”, los p-value menores de 0,01 con 2 “**” y los menores de 0,001 con 3 asteriscos “***”. Los resultados se expresan como media \pm error estándar de la media (SEM).

4. Resultados y discusión de los resultados

4.1 EFECTOS DEL SILDENAFILO SOBRE LA ACTIVACIÓN DE LA MICROGLÍA EN CEREBELO DE RATAS PCS Y SHAM

4.1.1 El sildenafil normaliza la activación y el número de células de microglía en cerebelo de ratas PCS a las 4 semanas tras la operación

Se analizó el perímetro y el número de células/mm², expresado en porcentaje respecto a las sham, de la microglía midiendo la expresión de Iba1 en sustancia blanca de cerebelo a las 4 semanas (Fig. 5, a, b, c, d).

Se observan diferencias en la morfología en los distintos grupos experimentales. Las ratas PCS presentan una microglía con forma ameboide, típica de microglía activada (Fig. 5, c) mientras que las ratas sham presentan una morfología ramificada (Fig. 5, a) típica de microglía en reposo o no activada. Las ratas PCS tratadas con sildenafil muestran una morfología similar a las ratas sham (Fig. 5d), más ramificada. El tratamiento con sildenafil en las ratas sham no produjo ningún efecto sobre la morfología respecto a las ratas sham (Fig. 5b) tratadas con vehículo.

En ratas PCS el perímetro de la microglía está disminuido de manera significativa comparado con las ratas sham ($77 \pm 4\%$ ($p < 0,05$)). El tratamiento con sildenafil aumenta el perímetro significativamente en las ratas PCS ($123 \pm 6\%$ ($p < 0,001$)) (Fig. 5 e).

En ratas PCS el número de células de microglía en la sustancia blanca del cerebelo está incrementada comparado con las sham ($130 \pm 5\%$ ($p < 0,001$)). El tratamiento con sildenafil reduce el número de células en ratas PCS ($103 \pm 3\%$ ($p < 0,001$)) hasta niveles similares a los de las ratas sham. El tratamiento con sildenafil no produce ningún cambio significativo en las ratas sham (Fig. 5 f).

Estos resultados indican que el tratamiento con sildenafil es capaz de revertir la activación de microglía así como reducir el número de células en ratas PCS.

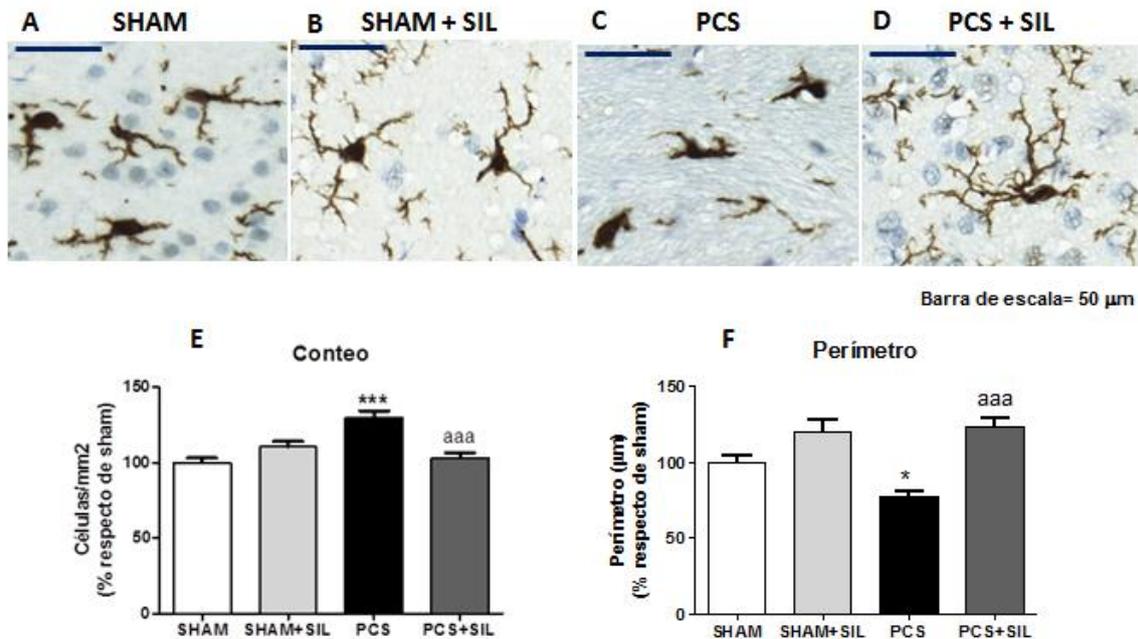


Figura 5. El sildenafil normaliza la microglía en cerebelo de ratas PCS a las 4 semanas tras la operación. Se muestran imágenes representativas de la morfología de la microglía en la sustancia blanca del cerebelo a las 4 semanas en ratas sham (A-D). Se midió el perímetro de la microglía en cerebelo de ratas y se expresó en porcentaje respecto a las ratas sham (E). Se cuantificó el número de células por mm^2 y se expresó en porcentaje respecto a las ratas sham (F). Los valores son la media \pm SEM de 3 ratas por grupo. Los valores significativamente diferentes de las ratas sham se indican con asteriscos, * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$. Los valores significativamente diferentes respecto de las ratas PCS se indican con "a". aaa $p < 0.001$. Sham= control operada, sham sil= control operada tratada con sildenafil, PCS= PCS tratada con vehículo, PCS SIL = PCS tratada con sildenafil.

4.1.2 El sildenafil normaliza la activación de la microglía en cerebelo de ratas PCS y no afecta al número de células de microglía a las 9 semanas tras la operación

Se analizó el perímetro y el número de células/ mm^2 , expresado en porcentaje respecto a las sham, de la microglía midiendo la expresión de Iba1 en sustancia blanca de cerebelo a las 9 semanas (Fig. 6, a, b, c, d).

Los diferentes grupos de ratas presentan diferencias en la morfología. Las ratas PCS presentan una forma ameboide (Fig. 6, c) mientras que las ratas sham tiene una forma ramificada (Fig. 6, a). Las ratas PCS tratadas con sildenafil tienen una microglía similar a las ratas sham (Fig 6, d) mientras que el sildenafil en las ratas sham produce una microglía ameboide.

El perímetro de la microglía en las ratas PCS está disminuido de manera significativa ($83 \pm 2 \%$ ($p < 0.001$)) respecto a las ratas sham. El tratamiento con sildenafil produce un aumento significativo en el perímetro de las ratas PCS ($93 \pm 2 \%$ ($p < 0.01$)) (Fig. 6 e).

En ratas PCS no se observa una diferencia significativa en el número de células de microglía en la sustancia blanca del cerebelo ($108 \pm 4 \%$). El tratamiento con sildenafil tampoco produce ningún cambio significativo en ratas PCS ($96 \pm 4 \%$) ni en ratas sham (Fig. 6 f).

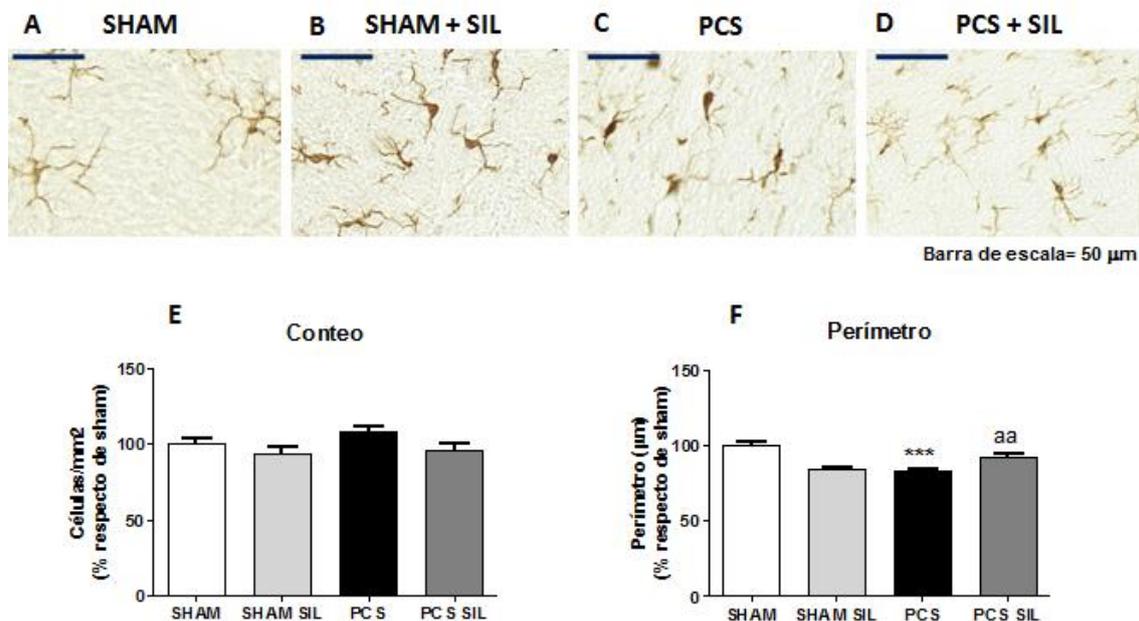


Figura 6. El sildenafil normaliza la activación de la microglía en cerebelo de ratas PCS a las 9 semanas tras la operación. Se muestran imágenes representativas de la morfología de la microglía en la sustancia blanca del cerebelo a las 9 semanas (A-D). Se midió el perímetro de la microglía en cerebelo de ratas y se expresó en porcentaje respecto a las ratas sham (e). Se cuantificó el número de células por mm² y se expresó en porcentaje respecto a las ratas sham (f). Los valores son la media ± SEM de 2 ratas por grupo. Los valores significativamente diferentes de las ratas sham se indican con asteriscos, *** p < 0.001. Los valores significativamente diferentes respecto de las ratas PCS se indican con "a". aa p < 0.01. Sham= control operada, sham sil= control operada tratada con sildenafil, PCS= PCS tratada con vehículo, PCS SIL = PCS tratada con sildenafil.

4.1.3 El sildenafil no produce ningún cambio en la activación de la microglía en cerebelo de ratas PCS y altera el número de células de microglía a las 12 semanas tras la operación

Se analizó el perímetro y el número de células/mm², expresado en porcentaje respecto a las sham, de la microglía midiendo la expresión de Iba1 en sustancia blanca de cerebelo a las 12 semanas (Fig. 7, a, b, c, d).

La microglía de las ratas PCS tiene una forma ameboides (Fig. 7, c) mientras que las ratas sham presentan una morfología ramificada (Fig. 7, a). Las ratas PCS tratadas con sildenafil muestran una morfología similar a las ratas PCS (Fig. 7 d) por lo que el sildenafil no produce un cambio en la morfología de las ratas PCS. El tratamiento con sildenafil en las ratas sham no produjo ningún efecto sobre la morfología respecto a las ratas sham (Fig. 7 b) tratadas con vehículo.

El perímetro de la microglía de las ratas PCS está disminuido de manera significativa comparado con las ratas sham (79 ± 8% (p < 0,05)). El tratamiento con sildenafil no produce un cambio significativo en el perímetro de la microglía en ratas PCS (83 ± 3 %) ni en el de las ratas controles (106 ± 6 %) (Fig. 7 e).

En ratas PCS el número de células de microglía tiene una tendencia a aumentar pero no es significativo respecto a sham (135 ± 8%). El tratamiento con sildenafil aumenta el

número de células por mm² en ratas PCS (185 ± 12 % (p<0,001)) y no produce ningún cambio significativo en las ratas sham (Fig. 7 f).

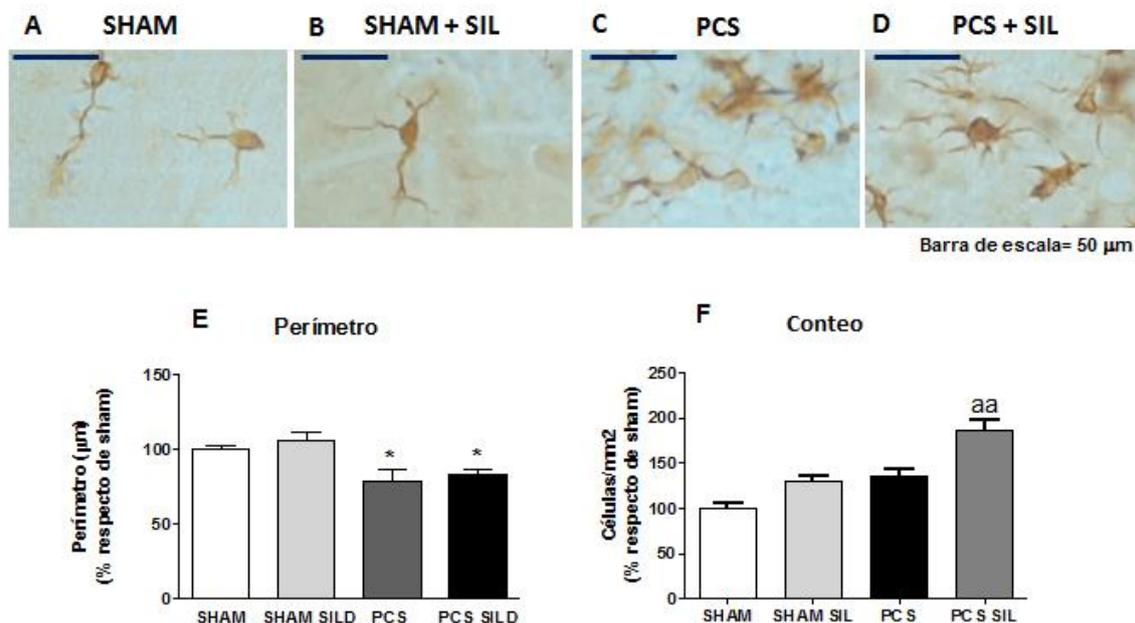


Figura 7. El sildenafil no afecta en la activación de la microglía y altera el número de células en cerebelo de ratas PCS a las 12 semanas tras la operación. Se muestran imágenes representativas de la morfología de la microglía en la sustancia blanca del cerebelo a las 12 semanas (A-D). Se midió el perímetro de la microglía en cerebelo de ratas y se expresó en porcentaje respecto a las ratas sham (e). Se cuantificó el número de células por mm² y se expresó en porcentaje respecto a las ratas sham (f). Los valores son la media ± SEM de 2 ratas por grupo. Los valores significativamente diferentes de las ratas sham se indican con asteriscos, * p< 0.05. Los valores significativamente diferentes respecto de las ratas PCS se indican con "a". aa p< 0.01. Sham= control operada, sham sil= control operada tratada con sildenafil, PCS= PCS tratada con vehículo, PCS SIL = PCS tratada con sildenafil.

4.1.4 La microglía está activada a las 4, 9 y 12 semanas tras la operación y aumenta el número de células por mm² únicamente a las 4 semanas. El sildenafil normaliza la activación sólo a las 4 y 9 semanas. Análisis de la progresión temporal

Si analizamos la progresión temporal de la activación de microglía, así como el número de células por mm² observamos que el número de células de microglía por mm² en la sustancia blanca del cerebelo a las 4 semanas está aumentado en ratas PCS con EH. Sin embargo, a las 9 y 12 semanas no hay una alteración en el número de células de la microglía en ratas PCS. A las 9 semanas se produce una disminución del número de células por mm² en ratas PCS respecto a las 4 semanas y a las 12 se produce un aumento respecto a las 9 semanas. Las ratas PCS tratadas con sildenafil, a las 4 y 9 semanas presentan un número de células por mm² de microglía similares a las ratas controles. A las 4 semanas, el sildenafil produce una disminución del número de células por mm² mientras que a las 9 semanas el sildenafil no produce ningún cambio significativo en ratas PCS. A las 12 semanas el sildenafil produce un aumento en el número de células por mm² tanto en ratas PCS como en las ratas controles (Fig. 8 a).

El perímetro expresado en porcentaje respecto a las ratas sham indica que la microglía permanece activada en ratas PCS con EH a lo largo de las semanas. El sildenafil a las 4 y a las 9

semanas reduce la activación de la microglía siendo más significativa la reducción a las 4 semanas. Sin embargo, a las 12 semanas las ratas con EH tratadas con sildenafil presentan una microglía activada. Con este resultado se podría deducir que el sildenafil disminuye su capacidad de reducir la activación de la microglía a lo largo del tiempo (Fig. 8 b).

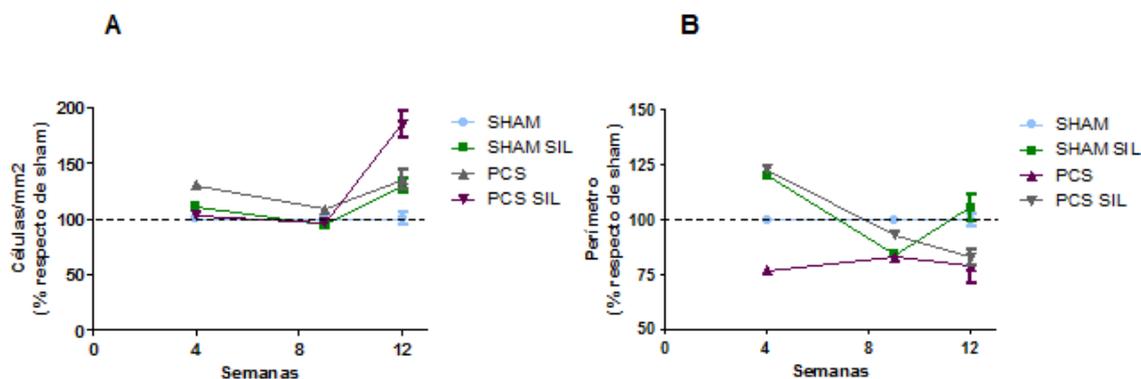


Figura 8. Progresión temporal de la activación y número de células por mm² de microglía. Se cuantificó el número de células por mm² y se expresó en porcentaje respecto a las ratas sham a las 4, 9 y 12 semanas (a). Se midió el perímetro de la microglía en cerebelo de ratas y se expresó en porcentaje respecto a las ratas sham a las 4, 9 y 12 semanas (b). Los valores son la media ± SEM. Sham= control operada, sham sil= control operada tratada con sildenafil, PCS= PCS tratada con vehículo, PCS SIL = PCS tratada con sildenafil.

La microglía presenta una función inmune en el sistema nervioso central supervisando el microambiente de posibles cambios en la señalización, de patógenos y daños. La microglía tiene diferentes morfologías y dependen de la función que desempeñe (Aguzzi *et al.*, 2013). Cuando no existe daño cerebral, la microglía se encuentra ramificada y proporciona el microambiente adecuado participando en la neurotransmisión y manteniendo la integridad sináptica. (Evilsizor *et al.*, 2015). Al producirse un daño la microglía presenta una forma ameboide y ejerce funciones de protección y un papel inflamatorio fagocitando restos celulares. En la activación, la microglía prolifera, migra hacia el lugar del daño, libera citotoxinas con el fin de producir la muerte de células vecinas y secreta factores de crecimiento (Kreutzberg *et al.*, 1996).

En nuestro estudio hemos observado que el número de células de microglía por mm² varía a lo largo de las semanas. Esto podría formar parte de una respuesta neuroprotectora que se adapta a lo largo del tiempo ya que se observa un aumento del número de células/mm² en ratas PCS a las 4 semanas mientras que a las 9 y 12 semanas disminuye. Por lo tanto podría ser un proceso adaptativo. La activación de la microglía, sin embargo, permanece en el tiempo lo que sugiere que no es el único responsable del aumento del número de células por mm² en cerebelo de ratas PCS ya que, como he mencionado, se observa un aumento del número de células por mm² únicamente a las 4 semanas.

Diversos estudios demuestran que las ratas PCS presentan una neuroinflamación que se observa con un incremento en la activación de la microglía y de los niveles de marcadores inflamatorios en el cerebro. Se conoce que la microglía produce respuestas inflamatorias en el cerebro dado que son las primeras células inmunes residentes del SNC. La microglía puede ser activada por varios factores incluyendo glutamato, citoquinas pro-inflamatorias, LPS así como

potasio extracelular. La microglía activada, a su vez, puede liberar las citoquinas proinflamatorias IL-1 α , IL-1 β y TNF- α (Jayakumar *et al.*, 2015).

La activación de la microglía también se ha estudiado en animales modelos de EH crónica debida a una ligadura del ducto biliar (BDL). Sin embargo, un estudio reciente no observó activación de la microglía en modelo BDL de EH crónica (Jayakumar *et al.*, 2015).

Rodrigo *et al.* (2010) demostraron que la hiperamonemia crónica o moderada o BDL resultó en una activación de la microglía, un incremento de iNOS así como un aumento en los niveles cerebrales de IL-1 β , prostaglandina E2 y estos cambios estaban asociados con un deterioro de las funciones cognitivas y motoras.

Hernandez-Rabaza *et al.* (2015) demostraron que las ratas PCS, en las que la operación se realizó en la primera semana y se sacrificó en la semana 10, muestran una activación de la microglía en hipocampo ya que presentaban una reducción del perímetro de las células así como un aumento de los niveles de IL-1 β y TNF- α . Se les suministró un tratamiento con sildenafil 4 semanas después de la operación y se observó que el sildenafil reduce la activación de la microglía en ratas PCS y normaliza los niveles de IL-1 β y TNF- α y que, además, se asoció con una normalización de la expresión de los receptores glutamato y GABA y una mayor habilidad de aprendizaje espacial.

En nuestro estudio en cerebelo de ratas PCS, en tratamiento con sildenafil normaliza la activación y el número de células/mm² de microglía en las ratas PCS a las 4 semanas, así como la activación a las 9 semanas lo que sugiere que al comienzo de la enfermedad el sildenafil es más efectivo. A las 12 semanas, el tratamiento con sildenafil en las ratas PCS no produce una disminución de la activación de la microglía. Además produce un aumento del número de células/mm². El sildenafil a las 12 semanas parece estar produciendo en la microglía un aumento de su respuesta.

Dennis *et al.* (2014) estudiaron la proliferación de la microglía en la zona subventricular de alcohólicos crónicos con EH. Para ello analizaron tejido cerebral humano de alcohólicos crónicos con cirrosis y EH (n=9), alcohólicos sin EH (n=4) y controles (n=4) mediante inmunohistoquímica. En total, 4/9 casos con EH presentaron células positivas con el marcador proliferativo, Ki-67 en sus cerebros. Se observó que la microglía en aquellos que presentaba mayor proliferación, tenían una morfología activada y unos mayores niveles de IL-6 y en aquellos que presentaban menor proliferación, la microglía en la sustancia blanca estaba menos activada. Estos estudios sugerían que la proliferación de la microglía puede formar parte de una respuesta neuroprotectora en EH.

4.2 EFECTOS DEL SILDENAFILO SOBRE EL CONTENIDO DE GFAP EN CEREBELO DE RATAS PCS Y SHAM

4.2.1 El sildenafil normaliza el área cubierta de GFAP en cerebelo de ratas PCS a las 4 semanas tras la operación

Se midió el contenido de GFAP en la sustancia blanca de cerebelo a las 4 semanas y se expresó en porcentaje respecto a las sham (Fig. 9, a, b, c, d).

Se observan diferencias en el contenido de GFAP en los distintos grupos experimentales. Las ratas PCS presentan una mayor área cubierta de GFAP (Fig. 9, c) respecto a las ratas sham (Fig. 9, a). Las ratas PCS tratadas con sildenafil muestran una menor área cubierta de GFAP comparado con las ratas PCS (Fig. 9 d). El tratamiento con sildenafil en las ratas sham no produjo ningún efecto sobre la cantidad de GFAP respecto a las ratas sham (Fig. 9 b) tratadas con vehículo.

En ratas PCS el área cubierta de GFAP es significativamente más alto que en ratas sham ($121 \pm 4 \%$ ($p < 0,01$)). El tratamiento con sildenafil disminuye el área cubierta por GFAP en las ratas PCS de forma significativa ($91 \pm 3 \%$ ($p < 0,001$)). El tratamiento con sildenafil no produce ningún cambio significativo en las ratas sham ($104 \pm 4\%$) (Fig. 9, e).

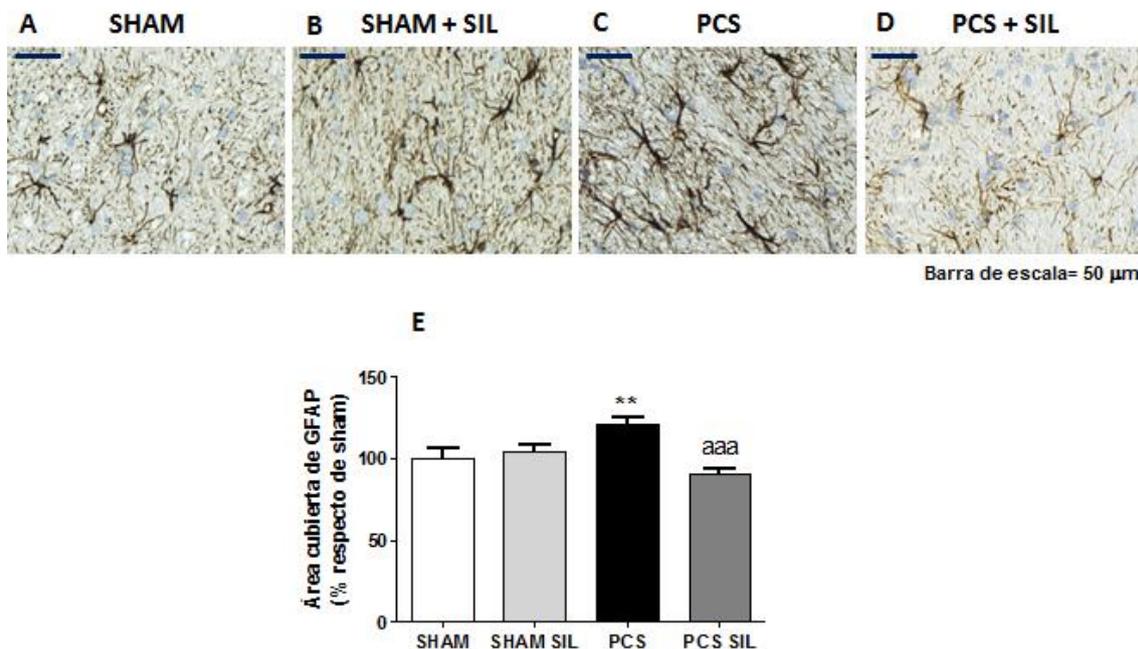


Figura 9. El sildenafil normaliza el área cubierta de GFAP en cerebelo de ratas PCS a las 4 semanas tras la operación. Se muestran imágenes representativas de astrocitos en la sustancia blanca del cerebelo a las 4 semanas (A-D). Se midió el contenido de GFAP en cerebelo de ratas y se expresó en porcentaje respecto a las ratas sham (E). Los valores son la media \pm SEM de 3 ratas por grupo. Los valores significativamente diferentes de las ratas sham se indican con asteriscos, ** $p < 0.01$. Los valores significativamente diferentes respecto de las ratas PCS se indican con "a". aaa $p < 0.001$. Sham= control operada, sham SIL= control operada tratada con sildenafil, PCS= PCS tratada con vehículo, PCS SIL = PCS tratada con sildenafil.

4.2.2 El sildenafil normaliza el área cubierta de GFAP en cerebelo de ratas PCS a las 9 semanas tras la operación

Se midió el contenido de GFAP en la sustancia blanca de cerebelo a las 9 semanas y se expresó en porcentaje respecto a las sham (Fig. 10, a, b, c, d).

El contenido de GFAP varía en los distintos grupos experimentales. Las ratas PCS presentan un mayor contenido de GFAP (Fig. 10, c) comparado con las ratas sham (Fig. 10, a). El tratamiento con sildenafil en las ratas PCS produce una reducción del área cubierta de GFAP (Fig. 10 d) mientras que en las ratas sham no produjo ningún efecto sobre la cantidad de GFAP (Fig. 10 b).

El área cubierta de GFAP de las ratas PCS es más alto que en ratas sham ($126 \pm 3 \%$ ($p < 0,001$)). El sildenafil la disminuye GFAP en las ratas PCS ($85 \pm 6 \%$ ($p < 0,001$)) mientras que en las ratas sham no produce ningún cambio significativo ($100 \pm 5 \%$) (Fig. 10, e).

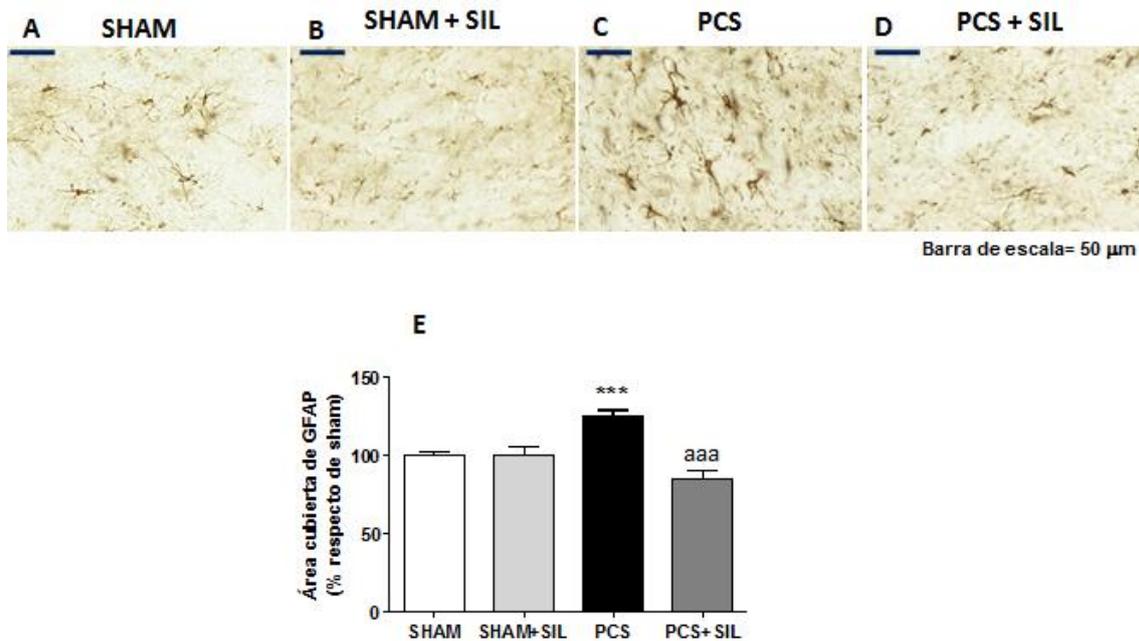


Figura 10. El sildenafil normaliza el área cubierta de GFAP en cerebelo de ratas PCS a las 9 semanas tras la operación. Se muestran imágenes representativas de astrocitos en la sustancia blanca del cerebelo a las 9 semanas (A-D). Se midió el contenido de GFAP en cerebelo de ratas y se expresó en porcentaje respecto a las ratas sham (e). Los valores son la media \pm SEM de 2 ratas por grupo. Los valores significativamente diferentes de las ratas sham se indican con asteriscos, *** $p < 0.001$. Los valores significativamente diferentes respecto de las ratas PCS se indican con "a". aaa $p < 0.001$. Sham= control operada, sham SIL= control operada tratada con sildenafil, PCS= PCS tratada con vehículo, PCS SIL = PCS tratada con sildenafil.

4.2.3 El sildenafil no produce ningún cambio en el área cubierta de GFAP en cerebelo de ratas PCS a las 12 semanas tras la operación

Se midió el contenido de GFAP en la sustancia blanca de cerebelo a las 12 semanas y se expresó en porcentaje respecto a las sham (Fig. 11, a, b, c, d).

El contenido de GFAP difiere en los distintos grupos experimentales. Las ratas PCS tienen una mayor área cubierta de GFAP (Fig. 11, c) comparado con las ratas sham (Fig. 11, a). Las ratas PCS tratadas con sildenafil presentan una menor área cubierta de GFAP respecto a las ratas PCS (Fig 11 d). El sildenafil en las ratas sham produce un aumento sobre la cantidad de GFAP respecto a las ratas sham (Fig. 11 b) tratadas con vehículo.

El área cubierta de GFAP en el cerebelo de las ratas PCS es más alto que en ratas sham ($127 \pm 4\%$ ($p < 0,05$)). El tratamiento con sildenafil no produce ningún cambio significativo en el área cubierta por GFAP ni en las ratas PCS ($120 \pm 8\%$) ni en las ratas sham ($113 \pm 8\%$) (Fig. 11, e).

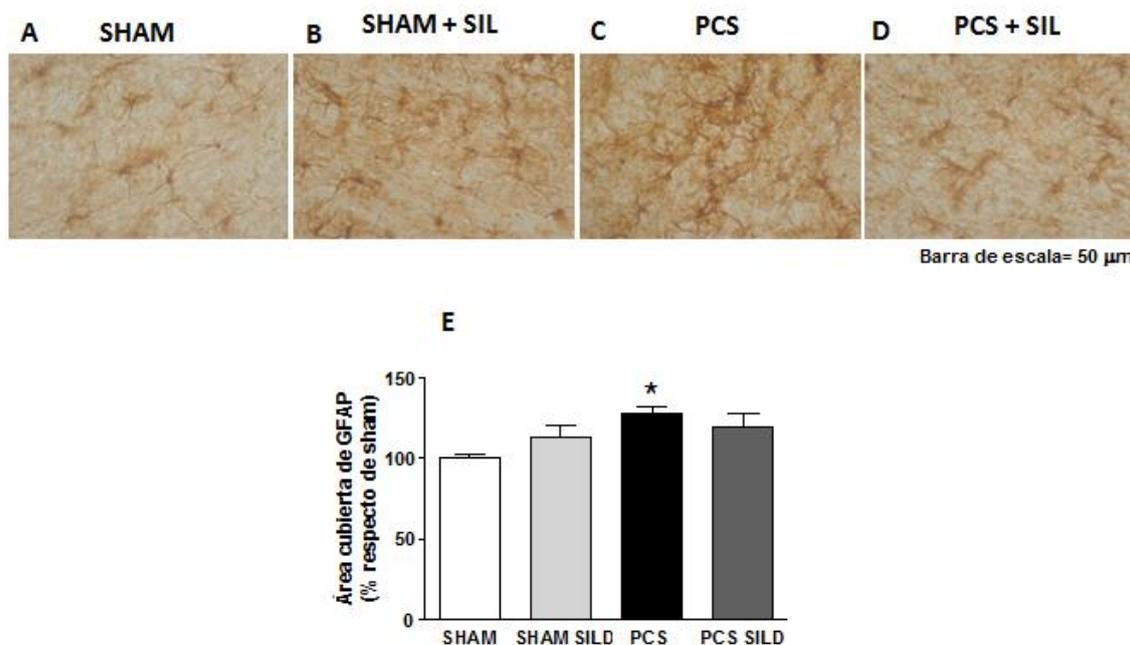


Figura 11. El sildenafil no afecta el área cubierta de GFAP en cerebelo de ratas PCS a las 12 semanas tras la operación. Se muestran imágenes representativas de astrocitos en la sustancia blanca del cerebelo a las 12 (A-D). Se midió el contenido de GFAP en cerebelo de ratas y se expresó en porcentaje respecto a las ratas sham (E). Los valores son la media \pm SEM de 2 ratas por grupo. Los valores significativamente diferentes de las ratas sham se indican con asteriscos, * $p < 0.05$. Sham= control operada, sham SIL= control operada tratada con sildenafil, PCS= PCS tratada con vehículo, PCS SIL = PCS tratada con sildenafil.

4.2.4 El contenido de GFAP aumenta a lo largo del tiempo en ratas PCS y el sildenafil normaliza los niveles a las 4 y 9 semanas

Los astrocitos ocupan cerca de un tercio del volumen de la corteza cerebral y participan en diversos procesos esenciales para el funcionamiento del cerebro, mantienen y regulan el medio extracelular, participan en la captación de radicales libres, la retención de metales, la modulación de la respuesta inmunitaria y la inflamación, e influyen en la excitabilidad neuronal y la neurotransmisión así como en la desintoxicación de un grupo de sustancias químicas, incluido el amonio. Estas células presentan diferentes cambios morfológicos, durante la cirrosis hepática se presenta astrocitosis Alzheimer tipo II. Se ha documentado que en la EH los astrocitos presentan una expresión alterada de proteínas específicas de astrocitos como GFAP y enzimas como la GS (A.L. Márquez-Aguirre *et al.*, 2009).

Se acepta que la causa fundamental de la alteración en los astrocitos es el aumento en la tasa de amoniaco en sangre, procedente de la digestión de las proteínas, insuficientemente depurado debido a la disfunción hepatocelular y a las conexiones portosistémicas en el caso de la cirrosis hepática (J. Aguilar Reina, 2012).

En nuestro estudio observamos que el contenido de GFAP en la sustancia blanca del cerebelo está aumentado a lo largo de las semanas. GFAP aumenta progresivamente en el tiempo en ratas PCS con EH. A las 4 y 9 semanas tras la operación, el tratamiento con sildenafil en las ratas PCS disminuye la cantidad de GFAP. A las 12 semanas, el tratamiento con sildenafil no produce una variación en la cantidad de GFAP en los astrocitos en ratas PCS (Fig. 12).

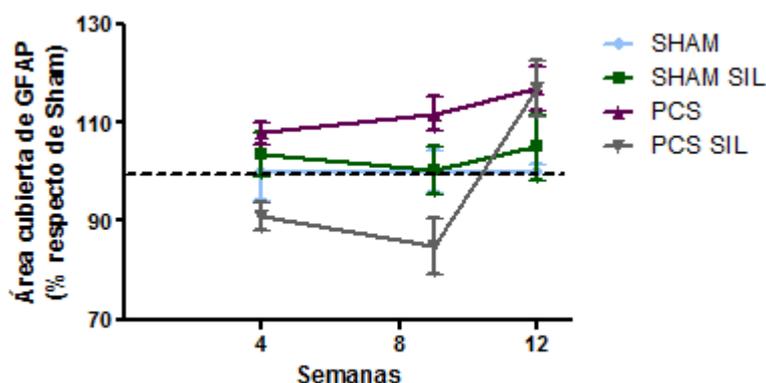


Figura 12. Progresión temporal del área cubierta de GFAP. Se midió el área cubierta de GFAP en cerebelo de ratas y se expresó en porcentaje respecto a las ratas sham a las 4, 9 y 12 semanas (b). Los valores son la media \pm SEM. Sham= control operada, sham sil= control operada tratada con sildenafil, PCS= PCS tratada con vehículo, PCS SIL = PCS tratada con sildenafil.

En nuestro estudio, GFAP aumenta a lo largo de las semanas en ratas PCS posiblemente debido a que los astrocitos, como respuesta a un daño del SNC, cambian a nivel molecular, celular y funcional. Después de un daño, los astrocitos proliferan, hinchan su núcleo, acumulan glucógeno e incrementan GFAP. Según el grado de la severidad de la lesión se produce mayor o menor producción de GFAP. Este aumento progresivo en el área cubierta por GFAP a lo largo de las 4, 9 y 12 semanas tras la operación podría deberse a una mayor severidad en la activación de astrocitos. Cuanto más tiempo ha pasado desde la operación más severa es la EH. El tratamiento con sildenafil disminuye la cantidad de GFAP en ratas PCS a las 4 y 9 semanas y, por tanto, el tratamiento contribuye a la reducción de la neuroinflamación. A las 12 semanas el tratamiento con sildenafil administrado a las ratas PCS con EH no produce una reducción de la cantidad de astrocitos. Es posible que el tratamiento con sildenafil estuviera aumentando la proliferación ya que tanto en las ratas controles como en las ratas con EH el tratamiento produce una mayor área cubierta por GFAP.

O.E. Hiba *et al.* (2016) estudió en ratas BDL en un estado cirrótico (4 semanas después de la operación), la expresión de GFAP en astrocitos en diferentes áreas cerebrales como la sustancia pars compacta (SNc), en el área tegmental ventral (VTA), en hipocampo, en estriado dorsal y en el córtex cerebral por inmunohistoquímica. Se demostró que en ratas BDL comparado con las controles (sham), se produce una disminución de la reactividad de los astrocitos correspondiendo a una pérdida de la expresión de GFAP en SNc, VTA, en el hipocampo y en el estriado dorsal, mientras que en el córtex cerebral los astrocitos expresan un incremento de la expresión de GFAP comparado con los controles. Este estudio demuestra

las diferentes respuestas en los astrocitos que dependen de la especificidad del área investigada.

Hernández-Rabaza *et al.* (2016) demostró que las ratas hiperamonémicas presentaban una mayor activación de los astrocitos en el hipocampo. Para ello se hizo un análisis de GFAP. Además los astrocitos presentaban una morfología alterada y un incremento de la longitud del perímetro respecto a las controles.

De acuerdo con Hernández-Rabaza *et al.* (2016) en nuestro modelo animal de EH (PCS) observamos un aumento de los niveles de GFAP, en este caso en cerebelo. Además el sildenafil produce una disminución de estos niveles a las 4 y 9 semanas por lo que podría estar reduciendo la activación de los astrocitos en la sustancia blanca del cerebelo.

4.3 EFECTOS DEL SILDENAFILO SOBRE EL CONTENIDO DE IL-1 β EN CEREBELO DE RATAS PCS Y SHAM

4.3.1 El sildenafil normaliza el número de células que presentan IL-1 β en cerebelo de ratas PCS a las 4 semanas tras la operación

Se midió el número de células que presentan IL-1 β en la sustancia blanca de cerebelo a las 4 semanas y se expresó en porcentaje respecto a las sham (Fig. 13, a, b, c, d).

Se observan diferencias en el contenido de IL-1 β en los distintos grupos experimentales. Las ratas PCS presentan un número más alto de células que presentan IL-1 β (Fig. 13, c) respecto a las ratas sham (Fig. 13, a). Las ratas PCS tratadas con sildenafil muestran un menor número de células que contienen IL-1 β comparado con las ratas PCS (Fig. 13 d). El tratamiento con sildenafil en las ratas sham no produjo ningún efecto sobre el número de células que presentan IL-1 β respecto a las ratas sham (Fig. 13 b) tratadas con vehículo.

En ratas PCS el número de células que contienen IL-1 β presenta una tendencia a aumentar comparado con las ratas sham ($152 \pm 24 \%$). El tratamiento con sildenafil disminuye significativamente el número de células que presentan IL-1 β ($78 \pm 7 \%$ ($p < 0,01$)). El tratamiento con sildenafil en las ratas sham no produce ningún cambio significativo (Fig. 13, e).

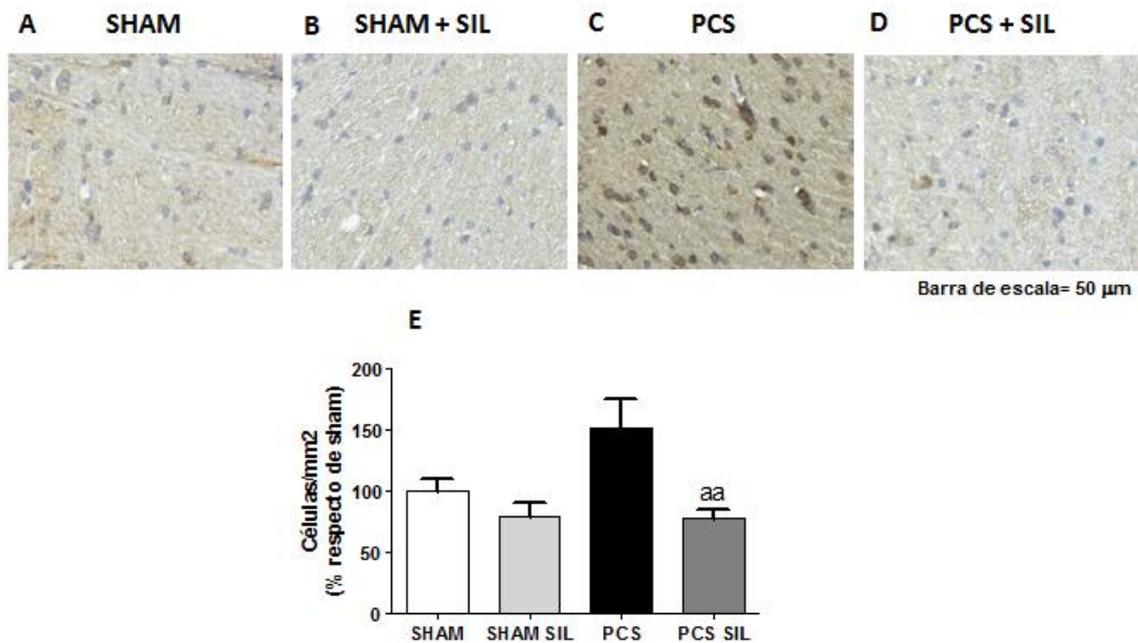


Figura 13. El sildenafil normaliza el número de células que presentan IL-1 β en cerebelo de ratas PCS a las 4 semanas tras la operación. Se muestran imágenes representativas de células que expresa IL-1 β en la sustancia blanca del cerebelo a las 4 semanas (A-D). Se midió el número de células que presentan IL-1 β en cerebelo de ratas y se expresó en porcentaje respecto a las ratas sham (E). Los valores son la media \pm SEM de 3 ratas por grupo. Los valores significativamente diferentes respecto de las ratas PCS se indican con "a", aa, $p < 0,01$. Sham= control operada, sham SIL= control operada tratada con sildenafil, PCS= PCS tratada con vehículo, PCS SIL = PCS tratada con sildenafil.

4.3.2 El sildenafil produce un cambio en el contenido de IL-1 β en cerebelo de ratas PCS a las 9 semanas tras la operación

Se midió el área cubierta de IL-1 β en la sustancia blanca de cerebelo a las 9 semanas y se expresó en porcentaje respecto a las sham (Fig. 14, a, b, c, d).

El área cubierta de IL-1 β en las ratas PCS (Fig. 14, c) es similar a las ratas sham (Fig. 14, a). El tratamiento con sildenafil en ratas PCS disminuye el área cubierta por IL-1 β (Fig. 14 d) mientras que en las ratas sham no produjo ningún efecto (Fig. 43 b).

En ratas PCS no se produce un cambio significativo comparado con las ratas sham (111 \pm 7 %). El tratamiento con sildenafil disminuye el área cubierta por IL-1 β en ratas PCS (80 \pm 10 % ($p < 0,01$)) y no produce ningún cambio significativo en las ratas sham (Fig. 14, e).

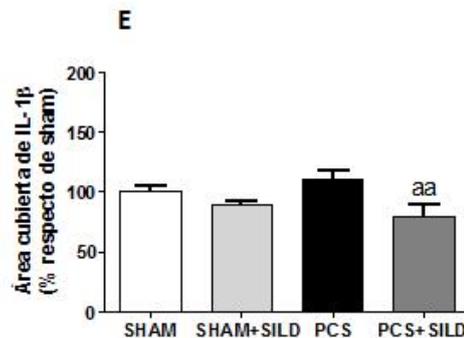
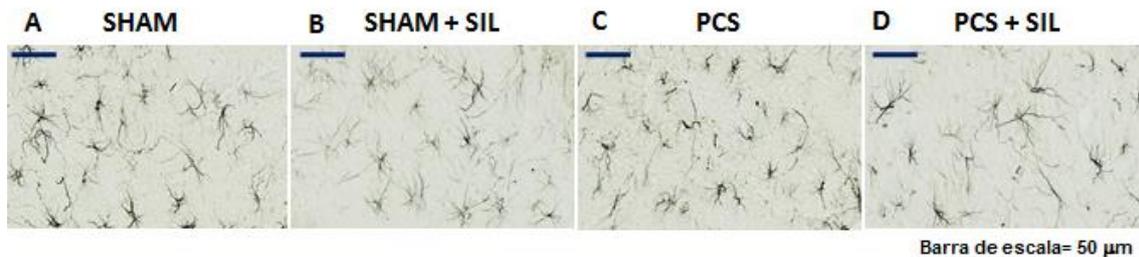


Figura 14. El sildenafil normaliza el contenido IL-1 β en cerebelo de ratas PCS a las 9 semanas tras la operación. Se muestran imágenes representativas de células que expresan IL-1 β en la sustancia blanca del cerebelo a las 9 semanas (A-D). Se midió el número de células que presentan IL-1 β en cerebelo de ratas PCS y se expresó en porcentaje respecto a las ratas sham (E). Los valores son la media \pm SEM del número de 2 ratas por grupo. Los valores significativamente diferentes respecto de las ratas PCS se indican con “a”, aa, $p < 0,01$. Sham= control operada, sham SIL= control operada tratada con sildenafil, PCS= PCS tratada con vehículo, PCS SIL = PCS tratada con sildenafil.

4.3.3 El sildenafil no produce ningún cambio en el contenido de IL-1 β en cerebelo de ratas PCS a las 12 semanas tras la operación

Se midió el área cubierta de IL-1 β en la sustancia blanca de cerebelo a las 12 semanas y se expresó en porcentaje respecto a las sham (Fig. 15, a, b, c, d).

El contenido de IL-1 β difiere en los distintos grupos. Las ratas PCS presentan una mayor área cubierta de IL-1 β (Fig. 15, c) respecto a las ratas sham (Fig. 15, a). Las ratas PCS tratadas con sildenafil muestran un área cubierta de IL-1 β similar a las ratas PCS (Fig. 15 d) mientras que en las ratas sham no produjo ningún efecto sobre el área cubierta de IL-1 β respecto a las ratas sham (Fig. 15, b) tratadas con vehículo.

El área cubierta por IL-1 β es significativamente más alta en ratas PCS que en ratas sham ($149 \pm 6 \%$ ($p < 0,001$)). El tratamiento con sildenafil no produce ningún efecto sobre el área cubierta de IL-1 β ni en ratas PCS ($128 \pm 13 \%$ ($p < 0,001$)) ni en las ratas sham (Fig. 15, e).

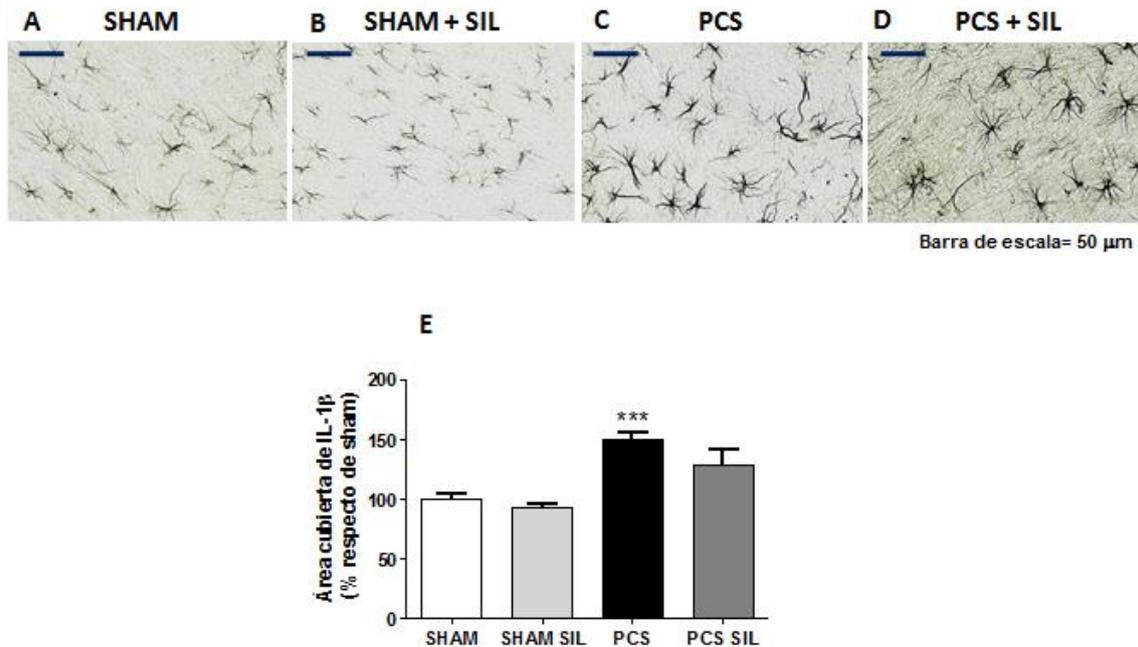


Figura 15. El sildenafil no afecta en el contenido IL-1 β en cerebelo de ratas PCS a las 12 semanas tras la operación. Se muestran imágenes representativas de células que expresan IL-1 β en la sustancia blanca del cerebelo a las 12 semanas (A-D). Se midió el número de células que presentan IL-1 β en cerebelo de ratas PCS y se expresó en porcentaje respecto a las ratas sham (E). Los valores son la media \pm SEM de 2 ratas por grupo. Los valores significativamente diferentes de las ratas sham se indican con asteriscos. ***, $p < 0,001$. Sham= control operada, sham SIL= control operada tratada con sildenafil, PCS= PCS tratada con vehículo, PCS SIL = PCS tratada con sildenafil.

4.3.4 El contenido de IL-1 β disminuye con el tiempo en ratas PCS y el sildenafil normaliza los niveles a las 4 y 9 semanas

La IL-1 β es una citoquina pro-inflamatoria liberada por diferentes tipos celulares, entre ellos células gliales como células Schwann, microglía y astrocitos. Es un mediador importante de la respuesta inflamatoria. La IL-1 β se expresa a niveles bajos en el SNC pero incrementa rápidamente en respuesta a un estrés, daño o invasión patogénica. Los astrocitos y la microglía son una fuente importante de esta citoquina y, una vez secretada puede estimular su propia producción de una manera autocrina o paracrina uniéndose a los receptores de la IL-1. Esto asegura una producción constitutiva de IL-1 β por la microglía activada. (D. K. Kaushik *et al.*, 2013).

En nuestro estudio cuando analizamos la progresión en el tiempo de IL-1 β observamos que a las 4 semanas tras la operación, la IL-1 β en la sustancia blanca del cerebelo en ratas PCS está aumentada. Disminuye a las 9 semanas llegando a niveles próximos a los controles. Sin embargo, a las 12 semanas la citoquina vuelve a estar aumentada. Probablemente aumentando el número de muestras (n) a las 9 semanas las ratas PCS mostrarían un aumento significativo de la IL-1 β y se observaría una disminución progresiva de esta citoquina en el tiempo. El tratamiento con sildenafil, reduce los niveles de esta citoquina pro-inflamatoria tanto a las 4 como a las 9 semanas. Sin embargo, a las 12 semanas no se observa que el tratamiento disminuya significativamente el contenido de IL-1 β (Fig. 16).

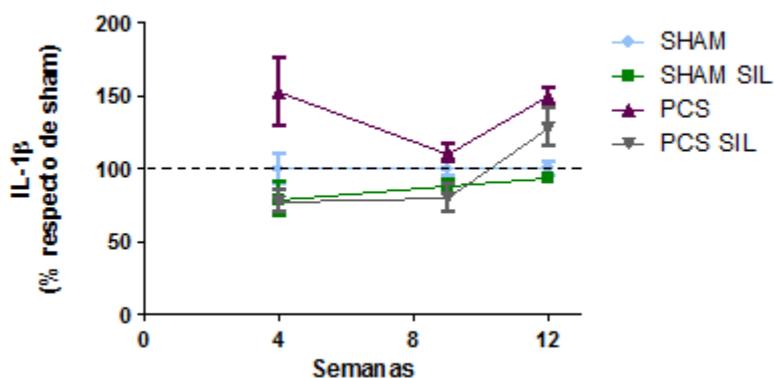


Figura 16. Progresión temporal del contenido de IL-1 β . Se midió el número de células que presentan IL-1 β a las 4 semanas y el área cubierta de GFAP a las 9 y 12 semanas en cerebelo de ratas y se expresó en porcentaje respecto a las ratas sham. Los valores son la media \pm SEM. Sham= control operada, sham sil= control operada tratada con sildenafil, PCS= PCS tratada con vehículo, PCS SIL = PCS tratada con sildenafil.

G. Wright *et al.* (2014) estudió en ratas BDL y sham que fueron sacrificadas 1, 2 y 4 semanas después de la operación, mediante inmunohistoquímica la activación de la microglía, de los astrocitos, del estrés celular y de la expresión de mediadores pro-inflamatorios, entre ellos la IL-1 β . Se observó que la IL-1 β en el cerebro anterior no presentaba ninguna diferencia significativa entre los grupos animales a lo largo de las semanas.

Hernandez-Rabaza *et al.* (2016) estudiaron la activación de la microglía analizando por inmunohistoquímica y Western Blot marcadores pro-inflamatorios como la IL-1 β en ratas hiperamonémicas y controles. Se observó que la hiperamonemia inducía la activación de los astrocitos y de la microglía en el cerebelo y además esta citoquina pro-inflamatoria está incrementada en el cerebelo de las ratas hiperamonémicas.

Hernandez-Rabaza *et al.* (2015) estudiaron la neuroinflamación en hipocampo en ratas con EHM. Para ello determinaron marcadores inflamatorios, entre ellos la IL-1 β por Western Blot y por Inmunohistoquímica y demostraron que el contenido de IL-1 β en hipocampo estaba incrementado en ratas PCS comparado con las ratas controles. Además se les suministró en la bebida a las ratas sildenafil y se observó que no afectaba en los niveles de esta citoquina en ratas controles mientras que en ratas PCS reducía su contenido a niveles normales. Por otro lado, demostraron que este incremento en IL-1 β alteraba la neurotransmisión GABAérgica y glutamatérgica en hipocampo y reducía el aprendizaje espacial de las ratas con EHM. El sildenafil redujo la neuroinflamación y restauró la capacidad de aprendizaje.

De acuerdo con Hernández-Rabaza *et al.* (2015) en nuestro modelo animal PCS de EH observamos un aumento de IL-1 β en ratas PCS y el tratamiento con sildenafil consigue normalizar estos niveles en este caso en cerebelo.

4.4 EFECTOS DEL SILDENAFILO SOBRE EL CONTENIDO DE IL-4 EN CEREBELO DE RATAS PCS Y SHAM

4.4.1 El sildenafil no produce ningún cambio en el contenido de IL-4 en células de Purkinje del cerebelo de ratas PCS a las 4 semanas tras la operación

Se midió la intensidad de la IL-4 en células Purkinje del cerebelo a las 4 semanas y se expresó en porcentaje respecto a las sham (Fig. 17, a, b, c, d).

Se observan diferencias en el contenido IL-4 en los distintos grupos experimentales. Las ratas PCS presentan un mayor contenido de IL-4 (Fig. 17, c) respecto a las ratas sham (Fig. 17, a). Las ratas PCS tratadas con sildenafil no muestran una diferencia en el contenido de IL-4 comparado con las ratas PCS (Fig. 17 d). El tratamiento con sildenafil en las ratas sham no produce ningún cambio sobre la cantidad de IL-4 respecto a las ratas sham (Fig. 17 b) tratadas con vehículo.

En ratas PCS la intensidad de la IL-4 en las células de Purkinje es significativamente más alta que en ratas sham ($100,8 \pm 0,15 \%$ ($p < 0,01$)). El tratamiento con sildenafil no produce ningún cambio significativo en la intensidad de IL-4 en las ratas PCS ($101 \pm 0,17 \%$) ni en las ratas sham ($99,5 \pm 0,2\%$ ($p < 0,001$)) (Fig. 17, e).

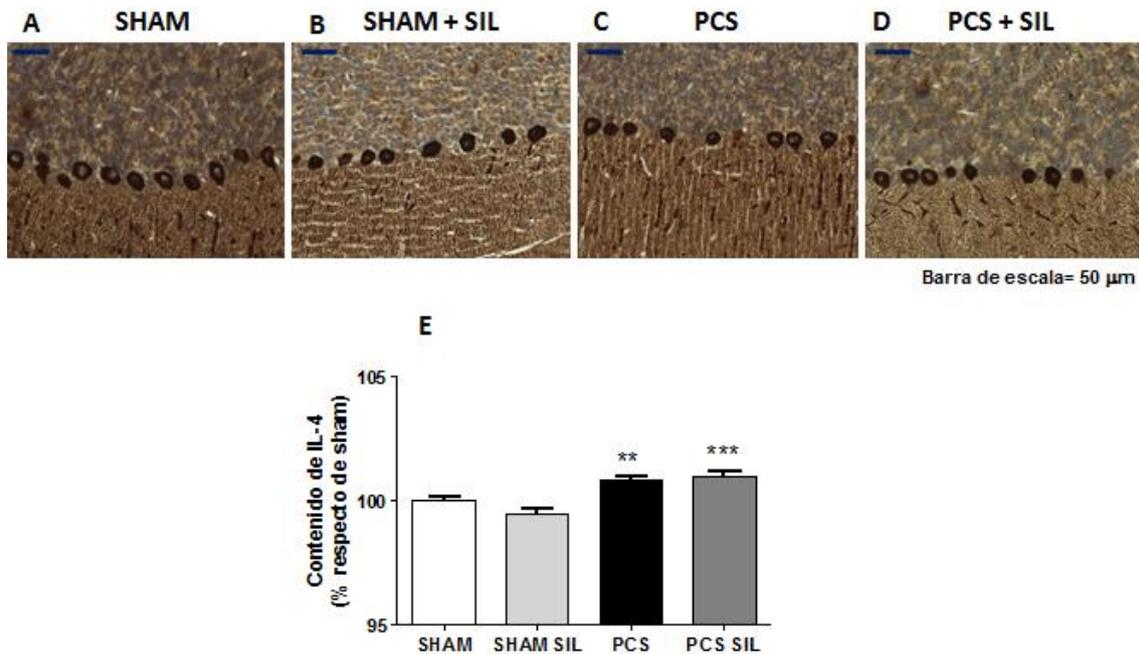


Figura 17. El sildenafil no afecta en el contenido de IL-4 en células Purkinje del cerebelo de ratas PCS a las 4 semanas tras la operación. Se muestran imágenes representativas de células de Purkinje en el cerebelo a las 4 semanas (A-D). Se midió el número de células que presentan IL-4 en cerebelo de ratas PCS y se expresó en porcentaje respecto a las ratas sham (e). Los valores son la media \pm SEM del número de 3 ratas por grupo. Los valores significativamente diferentes de las ratas sham se indican con asteriscos. **, $p < 0,01$, ***, $p < 0,001$. Sham= control operada, sham SIL= control operada tratada con sildenafil, PCS= PCS tratada con vehículo, PCS SIL = PCS tratada con sildenafil.

4.4.2 El sildenafil disminuye el contenido de IL-4 en células de Purkinje del cerebelo de ratas PCS y sham a las 9 semanas tras la operación

A las 9 semanas tras la operación se midió la intensidad de la IL-4 en células Purkinje del cerebelo y se expresó en porcentaje respecto a las sham (Fig. 18, a, b, c, d).

Se observan diferencias entre los distintos grupos experimentales. El contenido de IL-4 en las ratas PCS está disminuido (Fig. 18, c) comparado con las ratas sham (Fig. 18, a). El sildenafil disminuye el contenido de IL-4 en las ratas PCS (Fig. 18 d) y en las ratas sham (Fig. 19, b).

En ratas PCS la intensidad de la IL-4 en las células de Purkinje tiene una leve tendencia a disminuir comparado con ratas sham ($99 \pm 0,3 \%$). El tratamiento con sildenafil disminuye significativamente la intensidad de IL-4 en las ratas PCS ($98 \pm 0,3 \%$ ($p < 0,001$)) y en las ratas sham ($98 \pm 0,4\%$ ($p < 0,001$)) (Fig. 18, e).

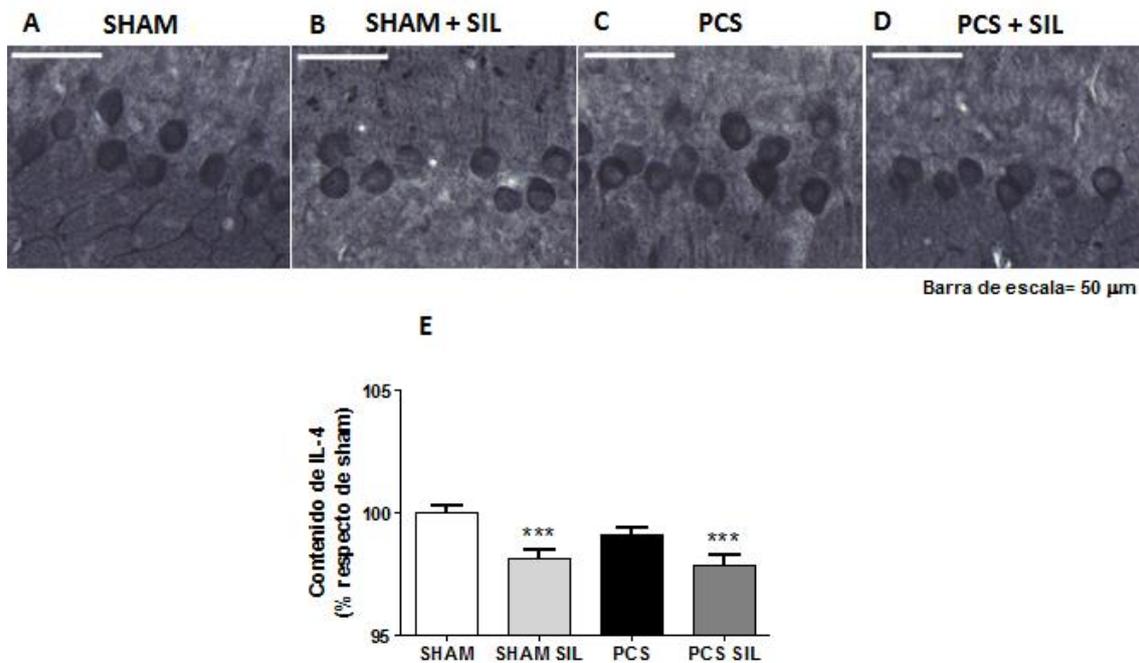


Figura 18. El sildenafil disminuye el contenido de IL-4 en células Purkinje del cerebelo de ratas PCS y sham a las 9 semanas tras la operación. Se muestran imágenes representativas de células de Purkinje en el cerebelo a las 9 semanas (A-D). Se midió el número de células que presentan IL-4 en cerebelo de ratas PCS y se expresó en porcentaje respecto a las ratas sham (E). Los valores son la media \pm SEM del número de 2 ratas por grupo. Los valores significativamente diferentes de las ratas sham se indican con asteriscos. ***, $p < 0,001$. Sham= control operada, sham SIL= control operada tratada con sildenafil, PCS= PCS tratada con vehículo, PCS SIL = PCS tratada con sildenafil.

4.4.3 El contenido de IL-4 en células de Purkinje disminuye en el tiempo en ratas PCS. E tratamiento con sildenafil aumenta los niveles a las 4 semanas y los disminuye a las 9 semanas tras la operación

La IL-4 es una citoquina anti-inflamatoria ya que disminuye la síntesis de citoquinas pro-inflamatorias. Su presencia y papel en el cerebro está empezando a ser investigada y los datos de diversos estudios muestran que esta molécula puede ser producida por las células de la microglía y, posiblemente por las neuronas. Se ha propuesto que la IL-4 puede reducir la inflamación promoviendo el fenotipo de microglía M2 y contribuyendo a la muerte del fenotipo M1 de la microglía (Mori *et al.*, 2016) El fenotipo M1 puede producir citoquinas pro-inflamatorias, ROS, y NO contribuyendo a la disfunción de la red neural en el SNC mientras que el fenotipo M2 expresa citoquinas y receptores implicados en la inhibición de la inflamación y en la restauración de la homeóstasis (Nakagawa y Chiba, 2014).

En nuestro estudio observamos que la IL-4 está incrementada en las células de Purkinje a las 4 semanas de manera significativa mientras que a las 9 semanas se produce una disminución de esta citoquinas en las ratas con EH. Las ratas PCS tratadas con sildenafil presentan un aumento de esta citoquina comparado con las ratas controles. Sin embargo, a las 9 semanas el tratamiento con sildenafil está produciendo una disminución significativa en el contenido de esta citoquina tanto en las ratas controles como en las PCS. En todos los grupos de ratas, exceptuando sham, se aprecia una disminución de esta citoquina anti-inflamatoria en el tiempo (Fig. 19)-

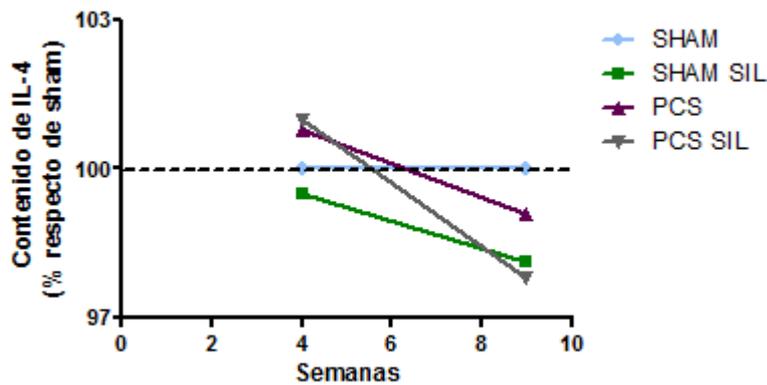


Figura 19. Progresión temporal del contenido de IL-4. Se midió el contenido de IL-4 a las 4 y 9 semanas en las células Purkinje del cerebelo de ratas y se expresó en porcentaje respecto a las ratas sham. Los valores son la media \pm SEM. Sham= control operada, sham sil= control operada tratada con sildenafil, PCS= PCS tratada con vehículo, PCS SIL = PCS tratada con sildenafil.

Se observa que en ratas PCS se produce una alteración en los niveles de esta citoquina anti-inflamatoria a lo largo de las semanas. La IL-4 tiene efectos anti-inflamatorios y es una citoquina que tiene la habilidad de inducir la muerte en la microglía activada, además de atenuar la proliferación de astrocitos. Los niveles de IL-4 se incrementan en las primeras 24 horas después de un daño cerebral para prevenir la producción de factores inflamatorios incluyendo TNF e IL-1 (Elvisor *et al.*, 2015). A las 4 semanas los niveles de IL-4 en ratas PCS podrían estar aumentados debido a una fase anti-inflamatoria inicial que tiene como objetivo prevenir los factores inflamatorios. A las 9 semanas, la IL-4 está disminuida en las ratas PCS por lo que no está ejerciendo un papel anti-inflamatorio. Esto podría ser una consecuencia de unos niveles mayores de citoquinas pro-inflamatorias como la IL-1 β debido a la enfermedad. El sildenafil aumenta los niveles de IL-4 en ratas con EH por lo que el tratamiento está ejerciendo una acción anti-inflamatoria al principio del inicio de la enfermedad. Sin embargo, a las 9 semanas el tratamiento con sildenafil produce una disminución en los niveles de estas citoquinas tanto en las ratas controles como en las ratas que presentan EH.

Hernandez-Rabaza *et al.* (2015) estudiaron si las ratas PCS mostraban una neuroinflamación en el hipocampo. Evaluaron la activación de la microglía así como diferentes marcadores inflamatorios mediante Inmunohistoquímica y Western Blot y observaron que la IL-4 no se veía significativamente afectada en ratas PCS. Además se realizó un tratamiento con sildenafil durante 7 semanas pero tampoco se observó que produjese algún efecto en las ratas controles o en las ratas PCS en cuanto a los niveles de IL-4.

Hernandez-Rabaza *et al.* (2016) analizaron marcadores anti-inflamatorios, entre ellos la IL-4, en el cerebelo de ratas hiperamonémicas y controles mediante Western Blot e Inmunohistoquímica. Se observó que esta citoquina anti-inflamatoria no estaba significativamente alterada en el cerebelo. Sin embargo, trataron a las ratas con sulfarafano y se observó que con el tratamiento las ratas hiperamonémicas presentaron uno niveles de IL-4 significativamente más elevados.

5. Conclusión

Las conclusiones que extraemos en este TFG son:

1. Las ratas PCS presentan neuroinflamación en el cerebelo ya que los marcadores inflamatorios analizados están alterados: la microglía está activada en ratas PCS y, además a las 4 semanas tras la operación se produce un aumento en la proliferación. El contenido de GFAP aumenta en ratas PCS por lo que los astrocitos podrían estar activados, el marcador pro-inflamatorio IL-1 β está aumentado y la citoquina anti-inflamatoria IL-4 está alterada aumentada a las 4 semanas en ratas PCS con EH.
2. Se produce una progresión en el tiempo de los distintos marcadores inflamatorios: la microglía permanece activada en el tiempo y prolifera solo a las 4 semanas, es decir, al comienzo de la enfermedad; el contenido de GFAP aumenta en el tiempo por lo que se produce un aumento en la activación de los astrocitos a lo largo de las semanas; la citoquina pro-inflamatoria IL-1 β disminuye en el tiempo debido a que disminuye la inflamación y la citoquina anti-inflamatoria IL-4 disminuye en el tiempo produciéndose una acción anti-inflamatoria en el inicio de la enfermedad.
3. El tratamiento con sildenafil normaliza los diferentes marcadores: disminuye la proliferación y activación de la microglía a las 4 y 9 semanas mientras que a las 12 semanas aumenta la proliferación; normaliza el contenido de GFAP a las 4 y 9 semanas sin producir ningún cambio significativo a las 12 semanas; disminuye la citoquina pro-inflamatoria IL-1 β a las 4 y 9 semanas tras la operación y aumenta la citoquina IL-4 a las 4 semanas por lo que ejerce una acción anti-inflamatoria al comienzo de la enfermedad que disminuye a las 9 semanas.

6. Bibliografía

- AGUILAR REINA, J. (2012). Encefalopatía hepática. *Medicine*. Programa de Formación Médica Continuada Acreditado, 11(11), pp. 652–659.
- AGUSTI, A.; CAULI, O.; RODRIGO, R.; LLANSOLA, M.; HERNÁNDEZ-RABAZA, V.; AND FELIPO, V. (2011). p38 MAP kinase is a therapeutic target for hepatic encephalopathy in rats with portacaval shunts. *Gut*, 60(11), 1572-1579.
- AGUZZI, A., BARRES, B. AND BENNETT, M. (2013). Microglia: Scapegoat, Saboteur, or Something Else?. *Science*, 339(6116), pp.156-161.
- ALDRIDGE, D., TRANAH, E. AND SHAWCROSS, D. (2015). Pathogenesis of Hepatic Encephalopathy: Role of Ammonia and Systemic Inflammation. *Journal of Clinical and Experimental Hepatology*, 5, pp.S7-S20.
- BRAHMACHARI, S. (2006). Induction of Glial Fibrillary Acidic Protein Expression in Astrocytes by Nitric Oxide. *Journal of Neuroscience*, 26(18), pp.4930-4939.
- CAULI, O., RODRIGO, R., PIEDRAFITA, B., BOIX, J., FELIPO, V. (2007). Inflammation and hepatic encephalopathy: ibuprofen restores learning ability in rats with portacaval shunts. *Hepatology*, 4(6), pp. 514–519.
- COLTART, I., TRANAH, T. AND SHAWCROSS, D. (2013). Inflammation and hepatic encephalopathy. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 536(2), pp.189-196.
- CORTÉS, L.; CÓRDOBA, J. (2012). Encefalopatía hepática, en: Gastroenterología y hepatología. Problemas comunes en la práctica clínica. 2ª Ed. Madrid, 917-930
- DENNIS, C., SHEAHAN, P., GRAEBER, M., SHEEDY, D., KRIL, J. AND SUTHERLAND, G. (2013). Microglial proliferation in the brain of chronic alcoholics with hepatic encephalopathy. *Metabolic Brain Disease*, 29(4), pp.1027-1039.
- ERCEG, S., MONFORT, P., HERNÁNDEZ-VADEL, M., RODRIGO, R., MONTOLIU, C. AND FELIPO, V. (2005). Oral administration of sildenafil restores learning ability in rats with hyperammonemia and with portacaval shunts. *Hepatology*, 41(2), pp.299-306.
- EVILSIZOR, M., RAY-JONES, H., ELLIS, T., LIFSHITZ, J., ZIEBELL, J. (2015). Microglia in Experimental Brain Injury, en: *Brain Neurotrauma: Molecular, Neuropsychological, and Rehabilitation Aspects*. Ed. Firas H. Kobeissy. Florida, 79-90.
- FELIPO, V. (2013). Hepatic encephalopathy: effects of liver failure on brain function. *Nature Reviews Neuroscience*, 14(12), pp.851-858.
- FELIPO, V., URIOS, A., MONTESINOS, E., MOLINA, I., GARCIA-TORRES, ML., CIVERA, M., OLMO, JA., ORTEGA, J., MARTINEZ-VALLS, J., SERRA, MA.(2012). Contribution of hyperammonemia and inflammatory factors to cognitive impairment in minimal hepatic encephalopathy. *Metab Brain Dis*, 2(7), pp. 51–58.
- GADANI, S., CRONK, J., NORRIS, G. AND KIPNIS, J. (2012). IL-4 in the Brain: A Cytokine To Remember. *The Journal of Immunology*, 189(9), pp.4213-4219.

- 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).
- 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).
- HERNÁNDEZ-RABAZA, V., CABRERA-PASTOR, A., TAORO-GONZÁLEZ, L., MALAGUARNERA, M., AGUSTÍ, A., LLANSOLA, M. AND FELIPO, V. (2016). Hyperammonemia induces glial activation, neuroinflammation and alters neurotransmitter receptors in hippocampus, impairing spatial learning: reversal by sulforaphane. *Journal of Neuroinflammation*, 13(1).
- HIBA, O., ELGOT, A., AHBOUCHA, S. AND GAMRANI, H. (2016). Differential regional responsiveness of astroglia in mild hepatic encephalopathy: An Immunohistochemical approach in bile duct ligated rat. *Acta Histochemica*, 118(4), pp.338-346.
- IMAI, Y. AND KOHSAKA, S. (2002). Intracellular signaling in M-CSF-induced microglia activation: Role of Iba1. *Glia*, 40(2), pp.164-174.
- JAYAKUMAR, A., RAMA RAO, K. AND NORENBURG, M. (2015). Neuroinflammation in Hepatic Encephalopathy: Mechanistic Aspects. *Journal of Clinical and Experimental Hepatology*, 5, pp.S21-S28.
- JOVER, R., RODRIGO, R., FELIPO, V., INSAUSTI, R., SÁEZ-VALERO, J., GARCÍA-AYLLÓN, MS., SUÁREZ, I., CANDELA, A., COMPAÑ, A., ESTEBAN, A. (2006). Brain edema and inflammatory activation in bile duct ligated rats with diet-induced hyperammonemia: A model of hepatic encephalopathy in cirrhosis. *Hepatology*, 4(3), pp. 1257–1266.
- KAUSHIK, D., THOUNAOJAM, M., KUMAWAT, K., GUPTA, M. AND BASU, A. (2013). Interleukin-1 β orchestrates underlying inflammatory responses in microglia via Krüppel-like factor 4. *J. Neurochem.*, 127(2), pp.233-244.
- KREUTZBERG, G. (1996). Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends in Neurosciences*, 19(8), pp.312-318.
- LEE, SH., FISHER, B. Portacaval shunt in the rat. (1961).; *Surgery*, 50(6), pp.68–72.
- Luo, M. (2015). Inflammation: A novel target of current therapies for hepatic encephalopathy in liver cirrhosis. *World Journal of Gastroenterology*, 21(41), p.11815.
- LUZINA, I., KEEGAN, A., ATAMAS, S. (2012). Inflammation: A novel target of current therapies for hepatic encephalopathy in liver cirrhosis. *Journal of leukocyte biology*, 92(4), pp.753-764.

- MARINI, JC., BROUSSARD, SR. (2006). Hyperammonemia increases sensitivity to LPS. *Mol Genet Metab*, 8(8), pp. 131–137.
- MÁRQUEZ-AGUIRRE, A., CANALES-AGUIRRE, A., GÓMEZ-PINEDO, U. AND GÁLVEZ-GASTÉLUM, F. (2010). Aspectos moleculares de la encefalopatía hepática. *Neurología*, 25(4), pp.239-247.
- MORI, S., MAHER, P., CONTI, B. (2016). Neuroimmunology of the Interleukins 13 and 4. *Brain Sciences*, 6(2),pp. 18.
- NAKAGAWA, Y. AND CHIBA, K. (2014). Role of Microglial M1/M2 Polarization in Relapse and Remission of Psychiatric Disorders and Diseases. *Pharmaceuticals*, 7(12), pp.1028-1048.
- OHSAWA, K., IMAI, Y., SASAKI, Y. AND KOHSAKA, S. (2004). Microglia/macrophage-specific protein Iba1 binds to fimbrin and enhances its actin-bundling activity. *Journal of Neurochemistry*, 88(4), pp.844-856.
- OTT, P. AND VILSTRUP, H. (2014). Cerebral effects of ammonia in liver disease: current hypotheses. *Metabolic Brain Disease*, 29(4), pp.901-911.
- PEIXOTO, C., NUNES, A. AND GARCIA-OSTA, A. (2015). Phosphodiesterase-5 Inhibitors: Action on the Signaling Pathways of Neuroinflammation, Neurodegeneration, and Cognition. *Mediators of Inflammation*, 2015, pp.1-17.
- RAPOSO, C., NUNES, A., LUNA, R., ARAÚJO, S., DA CRUZ-HÖFLING, M. AND PEIXOTO, C. (2013). Sildenafil (Viagra) Protective Effects on Neuroinflammation: The Role of iNOS/NO System in an Inflammatory Demyelination Model. *Mediators of Inflammation*, 2013, pp.1-11.
- REN, K. AND TORRES, R. (2009). Role of interleukin-1 β during pain and inflammation. *Brain Research Reviews*, 60(1), pp.57-64.
- RODRIGO, R., CAULI, O., GOMEZ-PINEDOULISES, AGUSTI, A., HERNANDEZ-RABAZAVICENTE, GARCIA-VERDUGOJOSE-MANUEL AND FELIPO, V. (2010). Hyperammonemia induces Neuroinflammation that contributes to cognitive impairment in rats with Hepatic Encephalopathy. *Gastroenterology*, 139(2), pp. 675–684.
- SEGARRA, E. (2006). *Fisiología de los Aparatos y Sistemas*. Ed. Universidad de Cuenca. Cuenca. 461 pp.
- WRIGHT, G., SHARIFI, Y., NEWMAN, T., DAVIES, N., VAIRAPPAN, B., PERRY, H., JALAN, R. (2014). Characterisation of Temporal Microglia and Astrocyte Immune Responses in Bile Duct-ligated Rat Models of Cirrhosis. *Liver International*, 34(8), pp. 1184-1191.
- 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.