

# UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA



## ***EFECTO DE LA NEUROINFLAMACIÓN SOBRE LA NEUROTRANSMISIÓN, APRENDIZAJE Y MEMORIA ESPACIAL EN UN MODELO ANIMAL DE ENCEFALOPATÍA HEPÁTICA***

TRABAJO FIN DE MÁSTER EN BIOTECNOLOGÍA BIOMÉDICA

ALUMNA: María Sancho Alonso

TUTORES EXTERNO: Andrea Cabrera Pastor y Vicente Felipo

TUTORA UPV: María Desamparados Pascual-Ahuir Giner

*Curso Académico: 2017/2018*

VALENCIA, 27/06/2018



**ALUMNA:** María Sancho Alonso

**TUTORES EXTERNOS:** Dra. Andrea Cabrera Pastor y Dr. Vicente Felipo

**TUTORA UPV:** María Desamparados Pascual-Ahuir Giner

**LOCALIDAD Y FECHA DE ENTREGA:** Valencia, Julio de 2018

**LUGAR DE ENTREGA:** Valencia

**CENTRO DE REALIZACIÓN:** Laboratorio de Neurobiología, Centro de Investigación Príncipe Felipe (Valencia)

**TÍTULO:** Efecto de la neuroinflamación sobre la neurotransmisión, aprendizaje y memoria espacial en un modelo animal de encefalopatía hepática.

# ABSTRACT

Hepatic encephalopathy (HE) is a complex neuropsychiatric syndrome caused by acute or chronic liver failure. When the liver fails, its capability to detoxify blood is reduced and certain damaging compounds, such as ammonium, can accumulate in blood and tissues. What is more, some of these substances are able to cross the blood brain barrier and trigger neuroinflammation. Hyperammonemia (HA) and neuroinflammation act synergistically producing alterations in neurotransmission, which cause cognitive and motor impairment that can lead to coma or even death.

Interleukin 1 beta (IL-1 $\beta$ ) is a proinflammatory cytokine whose levels are increased in the hippocampus of HE animal models. It is believed that IL-1 $\beta$  can be responsible for trigger pathways that alter membrane expression of NMDA and AMPA receptors, which impair glutamatergic neurotransmission and, consequently, spatial memory and learning.

The aim of this work is to outline the neuroinflammation in the hippocampus of EH animal model, as well as to evaluate the role of IL-1 $\beta$  in the impairments observed in glutamatergic neurotransmission, working and spatial memory, and learning. In addition, we will analyse if these alterations can be reverted by a specific antagonist of IL-1 $\beta$  (IL-1Ra).

To do so, we used control and HA rats (we induced chronic HA by an ammonium rich diet), which had osmotic pumps implanted (2-3 weeks after starting the ammonium diet) in cerebral ventricle to release sterile saline (vehicle) or IL-1Ra (treatment). During the fifth week the radial maze test was carry out and, finally, rats were sacrificed by decapitation during the sixth week. Then, we analysed neuroinflammation by immunohistochemistry and the membrane expression of AMPA and NMDA receptors by western blot in hippocampus.

The results prove that HA rats present neuroinflammation, alterations of AMPA and NMDA receptors subunits and impairment in spatial memory and learning. IL-1Ra treatment reverts neuroinflammation, membrane expression of some AMPA and NMDA subunits and working memory, but IL-1Ra does not revert spatial memory and learning observed in glutamatergic receptor membrane expression and working memory and spatial memory and learning. Some of these alterations can be reverted by IL-1Ra treatment. These results show that the increase of IL-1 $\beta$  in animal models of HE could be responsible of these alterations.

**KEY WORDS:** hepatic encephalopathy, spatial memory and learning, working memory, hyperammonemia, neuroinflammation, NMDA, AMPA e IL1-Ra.

## RESUMEN

La encefalopatía hepática (EH) es un síndrome neuropsiquiátrico complejo causado por un fallo hepático crónico o agudo. Al perder el hígado su capacidad detoxificante, ciertos compuestos (como por ejemplo el amonio), pueden acumularse en sangre y tejidos, pudiendo llegar a atravesar la barrera hematoencefálica y causar neuroinflamación. La hiperamonemia y la neuroinflamación actúan sinérgicamente causando alteraciones en la neurotransmisión que, en última instancia, producen deterioro cognitivo y motor, pudiendo llevar, en el peor de los casos, al coma e incluso la muerte.

La interleuquina 1 beta (IL-1 $\beta$ ) es uno de los principales mediadores proinflamatorios, cuyos niveles en hipocampo están aumentados en modelos animales de EH. Se piensa que la IL-1 $\beta$  podría estar desencadenando la alteración de la expresión en membrana de los receptores de neurotransmisión glutamatérgica AMPA y NMDA, lo que a su vez provocaría alteraciones en el aprendizaje y la memoria espacial.

El objetivo del presente trabajo es analizar la neuroinflamación, para lo que se estudiará la activación de microglía y astrocitos, en el hipocampo en un modelo animal de hiperamonemia crónica, así como evaluar el papel que juega la IL-1 $\beta$  en la alteración de la neurotransmisión y en la memoria de trabajo y en la memoria y aprendizaje espacial. Además, se analizará si las alteraciones observadas pueden ser revertidas mediante el tratamiento con un antagonista específico del receptor de la IL-1 (IL-1Ra), reestabeciéndose de este modo los patrones de expresión en membrana y, por tanto, la neurotransmisión y la memoria de trabajo, así como el aprendizaje y la memoria espacial

Para ello, se emplearon ratas control e hiperamonémicas (a estas últimas se les indujo hiperamonemia crónica mediante una dieta rica en amonio) a las que se implantaron minibombas osmóticas en el ventrículo cerebral, entre la segunda y tercera semana de dieta, que permite la liberación continuada de suero salino (vehículo) o IL-1Ra (tratamiento). Durante la quinta semana se realizó el test del laberinto radial de 8 brazos y, finalmente, a la sexta semana, las ratas fueron sacrificadas por decapitación. Tras el sacrificio se analizó la neuroinflamación mediante inmunohistoquímica y la expresión en membrana de los receptores AMPA y NMDA mediante *western blot* en hipocampo.

Los resultados obtenidos demuestran que ratas con hipermonemia (HA) crónica presentan neuroinflamación, alterada la expresión en membrana de las subunidades del receptor AMPA y NMDA y la memoria y el aprendizaje espacial. El tratamiento crónico con el antagonista IL-1Ra revierte la neuroinflamación, la expresión en membrana de algunas subunidades de los receptores AMPA y NMDA y la memoria de trabajo, pero no la memoria de referencia ni el aprendizaje espacial. Estos resultados indican que el aumento de IL-1 $\beta$  en modelos animales de encefalopatía hepática podría ser el responsable de dichas alteraciones.

**PALABRAS CLAVE:** Encefalopatía hepática, aprendizaje y memoria espacial, hiperamonemia, neuroinflamación, NMDA, AMPA e IL1-Ra.

# AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, me gustaría dar las gracias a Andrea y a Lucas, ya que sin su colaboración este trabajo no podría haber salido adelante. Os doy las gracias por haberme aportado tanto, no sólo a nivel académico y profesional, sino también a nivel personal. Gracias por invertir parte de vuestro tiempo en mi formación. También, me gustaría agradecer a todo el equipo humano del laboratorio de Neurobiología, en general, por estar día a día, enseñarme y, sobre todo, hacerme pasar buenos momentos.

Sin embargo, sería injusto no compartir este agradecimiento con quienes han permanecido siempre a mi lado. En primer lugar, a ti David, por aguantarme día a día y dejarme compartir contigo tanto los buenos como los malos momentos. A mi familia, en especial a mis padres, hermanos y abuelos, a quién debo todo lo que he conseguido hasta ahora; gracias por brindarme la oportunidad de formarme y apoyarme de forma incondicional, nunca podré agradecerlos lo suficiente.

Por último, gracias también a mis amigos de toda la vida y del grado, por estar siempre a mi lado durante tantos años, así como al máster por darme la oportunidad de conocer a gente estupenda que ha hecho más llevaderos y divertidos estos dos años. Especialmente a Inés, Yolanda, Belén y Claudia, sólo puedo deciros que nuestro camino sigue y esto sólo es el fin de una etapa, pero no una despedida.

Simplemente GRACIAS

# ÍNDICE

<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	1
1. ENCEFALOPATÍA HEPÁTICA .....	1
1.1. Patogénesis de la encefalopatía hepática .....	2
1.1.1. Hiperamonemia.....	2
1.1.2. Neuroinflamación.....	3
2. MODELO ANIMAL.....	5
3. NEUROTRANSMISIÓN Y EH .....	6
3.1. Neurotransmisión glutamatérgica .....	7
3.1.1. Receptores NMDA.....	9
3.1.2. Receptores AMPA.....	9
3.2. Alteración de la neurotransmisión en EH .....	10
4. PAPEL DEL HIPOCAMPO EN LA MEMORIA Y EL APRENDIZAJE.....	10
4.1. Test de memoria y aprendizaje espacial en modelos animales: laberinto radial.....	13
5. NEUROINFLAMACIÓN: IL-1 $\beta$ .....	15
<b>HIPÓTESIS</b> .....	18
<b>OBJETIVOS</b> .....	19
<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	20
1. MODELO ANIMAL.....	20
2. PROCEDIMIENTO QUIRÚRGICO.....	20
3. TEST DE APRENDIZAJE Y MEMORIA: LABERINTO RADIAL DE 8 BRAZOS .....	21
4. ANÁLISIS DE LA NEUROINFLAMACIÓN.....	22
4.1. Activación de la microglía .....	24
4.2. Activación de astrocitos .....	24
5. EXPRESIÓN EN MEMBRANA DE RECEPTORES .....	24
5.1. Obtención de las muestras.....	24
5.2. Determinación de la cantidad de proteína .....	25
5.3. Análisis del contenido de proteínas total y de membrana mediante <i>western blot</i> ....	26
6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	27
<b>RESULTADOS</b> .....	28
1. ANÁLISIS DE LA NEUROINFLAMACIÓN EN HIPOCAMPO DE RATAS CON HIPERAMONEMIA CRÓNICA. EFECTO DEL TRATAMIENTO CRÓNICO CON IL-1RA.....	28
1.1. Análisis de la activación de la microglía .....	28
1.2. Análisis de la activación de astrocitos.....	29
2. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN EN MEMBRANA DE RECEPTORES AMPA Y NMDA.....	30

2.1.	Receptores AMPA.....	30
2.2.	Receptores NMDA.....	31
3.	EFFECTO DEL TRATAMIENTO CON IL-1RA SOBRE LA CAPACIDAD DE APRENDIZAJE Y LA MEMORIA ESPACIAL.....	31
	<b>DISCUSIÓN</b> .....	34
	<b>CONCLUSIONES</b> .....	41
	<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	42

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>TABLA 1.</b>	Anticuerpos primarios utilizados para inmunohistoquímica.....	24
<b>TABLA 2.</b>	. Anticuerpos primarios y secundarios utilizados en <i>Western Blot</i> , con sus correspondientes diluciones. ....	24

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>FIGURA 1.</b>	Factores desencadenantes de la EH.....	5
<b>FIGURA 2.</b>	Ciclo glutamato-glutamina .....	8
<b>FIGURA 3.</b>	Esquema temporal del diseño experimental.....	21
<b>FIGURA 4.</b>	Laberinto radial de 8 brazos .....	21
<b>FIGURA 5.</b>	Imagen <i>western blot</i> de muestras tratadas con y sin BS <sup>3</sup> .....	25
<b>FIGURA 6.</b>	Análisis de la activación de microglía en hipocampo .....	28
<b>FIGURA 7.</b>	Análisis de la activación de astrocitos en hipocampo .....	29
<b>FIGURA 8.</b>	Expresión en membrana receptores AMPA .....	30
<b>FIGURA 9.</b>	Expresión en membrana receptores NMDA.....	31
<b>FIGURA 10.</b>	Memoria de trabajo y aprendizaje y memoria espacial .....	33
<b>FIGURA 11.</b>	Modelo propuesto de las alteraciones mediadas por la IL-1 $\beta$ en hiperamonemia crónica.....	35



# ABREVIATURAS

**AINE:** antiinflamatorios no esteroideos

**AMPA:**  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazol-propiónico

**ANOVA:** Análisis de Varianza Paramétrica de dos Vías

**BCA:** Ácido bicinconínico

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

**BDL:** Ligadura Biliar

**BS<sup>3</sup>:** Bis[sulfosuccinimidyl] suberate

**DAB:** diaminobencidina

**EAATs:** excitatory amino acid transporters

**EGTA:** Etilen Glicol Ácido Tetraacético

**EH:** Encefalopatía Hepática

**EHM:** Encefalopatía Hepática Mínima

**EPSPs (Excitatory Postsynaptic Potentials):** Potenciales Postsinápticos Excitatorios

**f.a.:** Fosfatasa alcalina

**FHA:** Fallo Hepático Agudo

**FHC:** Fallo Hepático Crónico

**GABA:** Acido  $\gamma$ -amimobutirico

**GluA:** Subunidad del receptor ionotrópico de glutamato AMPA

**GluN:** Subunidad del receptor ionotrópico de glutamato NMDA

**HA:** Hiperamonemia

**iGluRs:** receptores de glutamato ionotrópicos

**IL:** Interleuquina

**IL-10:** Interleuquina 10

**IL-18:** Interleuquina 18

**IL-1R:** Receptor de la interleuquina 1

**IL-1Ra:** Antagonista del receptor de la interleuquina 1

**IL-1RI:** receptores de la interleuquina 1 de tipo 1

**IL-1RII:** receptores de la interleuquina 1 de tipo 2

**IL-1 $\alpha$ :** Interleuquina 1 alfa

**IL-1 $\beta$ :** Interleuquina 1 beta

**IL-33:** Interleuquina 33

**IL-36:** Interleuquina 36

**IL-36Ra:** antagonista del receptor de la interleuquina 36

**IL-6:** Interleuquina 6

**IRMf:** Resonancia magnética funcional

**ISHEN:** Society for Hepatic Encephalopathy and Nitrogen Metabolism

**KR:** Receptores Kainato

**LDP (Long-term depression):** Depresión a Largo Plazo

**LTM (Long-term memory):** Memoria a Largo Plazo

**LTP (Long-term potentiation):** Potenciación a Largo Plazo

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

**NF- $\kappa$ B:** Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas

**NLS (nuclear localization signal):** Señal de Localización Nuclear

**NMDA:** N-metil-D-aspartato

**PB:** tampón fosfato

**PCS:** Anastomosis Porta Cava

**PKA:** Proteína Kinasa AMP-dependiente

**PKC:** Proteína Kinasa C

**SDS:** Dodecil Sulfato de Sodio

**SNC:** Sistema Nervioso Central

**STM (Short-term memory):** Memoria a Corto Plazo

**TNF- $\alpha$ :** Factor de Necrosis Tumoral

# INTRODUCCIÓN

## 1. ENCEFALOPATÍA HEPÁTICA

El hígado es un órgano vital con funciones metabólicas, de almacenamiento, de detoxificación e inmunológicas. Además, sintetiza lípidos, proteínas y glúcidos y actúa como órgano de depósito de numerosas sustancias útiles para el organismo (glucógeno, vitaminas, hierro, etc.). En cuanto a su función detoxificante elimina la mayoría de compuestos tóxicos, como fármacos y otros productos químicos (Segarra, 2007). Cuando el hígado falla debido a un fallo hepático agudo (FHA) o crónico (FHC), hepatitis o cirrosis, no funciona adecuadamente pudiendo los compuestos tóxicos atravesar la barrera hematoencefálica y llegar al cerebro afectando a la función de dicho órgano (Felipo, 2013). Uno de los compuestos, fruto de la descomposición de proteínas y otras moléculas, es el amonio, cuya concentración es regulada en condiciones normales por el hígado, gracias a su incorporación en el ciclo de la urea. No obstante, ante la presencia de fallo hepático este compuesto se acumula en concentraciones elevadas en sangre y tejidos produciendo hiperamonemia (HA), pudiendo atravesar la barrera hematoencefálica y ocasionar deterioro cognitivo.

La encefalopatía hepática (EH) es una alteración de la función cerebral que aparece como resultado del fallo hepático. Sin embargo, la EH no está causada por un único síndrome; sino que los diferentes tipos de fallos hepáticos (FHA y FHC) pueden conducir a ella. No obstante, las diferentes enfermedades hepáticas producen diferentes formas de EH, cada una de las cuales está regida por diferentes mecanismos y requiere de tratamientos distintos. Los pacientes con EH clínica muestran síntomas neuropsiquiátricos, que incluyen alteraciones en el ciclo del sueño, en la función cognitiva e intelectual y en la actividad y coordinación motora, así como alteraciones en la personalidad y en la consciencia que pueden empeorar progresivamente. Los episodios de EH pueden estar causados por factores desencadenantes como infecciones, ingestión excesiva de proteínas o por hemorragias gastrointestinales, que aumentan los niveles de compuestos nocivos (por ejemplo, el amonio) en sangre y en cerebro (Felipo, 2013). La EH puede llevar al coma e incluso a la muerte de los pacientes. De hecho, a no ser que sea tratada, la EH está asociada a una baja tasa de supervivencia y a un alto riesgo de recurrencia (Kaplan, 2011; Conn, 1993).

Se pueden distinguir tres tipos de EH: (i) EH aguda, caracterizada por una pérdida repentina de la función hepática que conduce a una rápida progresión de los síntomas (edema

cerebral e incremento de la presión intracraneal). Puede ser reversible o conducir a la muerte. El grado de mortalidad en la EH aguda es muy elevado y frecuentemente es consecuencia del aumento de la presión intracraneal producida por un edema cerebral; (ii) EH crónica, por derivación porto-sistémica sin enfermedad hepatocelular intrínseca. Está producida por un fallo hepático crónico asociado a cirrosis, hepatitis o hipertensión portal; (iii) EH mínima (EHM), que se trata de una forma no clínica y más leve de la enfermedad, en la que los pacientes carecen de síntomas evidentes de EH. La EHM cursa con deterioro cognitivo leve y 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).

La EHM es un serio problema de salud, social y económico. Por ello, el diagnóstico temprano y el tratamiento de la EHM mejorarían la calidad de vida y aumentarían la tasa de supervivencia de los pacientes (Montoliu et al., 2015). Sin embargo, la mayoría de los pacientes siguen sin diagnosticar y sin tratar debido a la falta de procedimientos simples de diagnóstico.

## **1.1. PATOGÉNESIS DE LA ENCEFALOPATÍA HEPÁTICA**

Para el desarrollo de tratamientos efectivos para la EH es necesario entender los mecanismos por los que se produce la alteración neurológica. Actualmente, la hipótesis más aceptada es que la EH es inducida por la acción conjunta de HA e inflamación.

### **1.1.1. HIPERAMONEMIA**

Existen evidencias tanto experimentales como clínicas que sostienen que la HA es el principal factor responsable de las alteraciones neurológicas presentes en la EH. Los primeros en proponer dicha implicación fueron los fisiólogos Pavlov y Nencki en la década de 1890 (Aldridge et al., 2015). Más tarde, se sentaron las bases de nuestra comprensión actual de que el amonio juega un papel fundamental en la EH (Phillips et al., 1952) y fue a partir de este momento cuando los estudios comenzaron a centrarse en si era o no posible establecer una relación cuantitativa entre la concentración de amonio en sangre y la gravedad del deterioro cognitivo propio de la EH y se demostró que la cantidad de amonio en sangre no era predictiva o consistente con el grado de EH (Phear et al., 1955), algo que ha sido corroborado con numerosos estudios posteriores (Shawcross et al., 2011). Esto demuestra que, aunque el amonio tiene un papel irrefutable en la patogénesis de la EH, parece que no es el único factor

responsable de las secuelas neurocognitivas. De hecho, en la última década, numerosos estudios respaldan el papel de otros factores, como la inflamación sistémica estéril y no estéril y la consecuente "tormenta citoquímica", que actuaría sinérgicamente con el metabolismo anormal del nitrógeno y serían los responsables de la generación del cuadro clínico de la EH (Albridge et al., 2015).

El amonio es un subproducto del metabolismo del nitrógeno, que se forma como producto de la degradación de las proteínas que ingerimos en la dieta y por el metabolismo de otras sustancias nitrogenadas. Sin embargo, este producto es neurotóxico y, si supera ciertas concentraciones, altera la función cerebral. Para evitar dichos efectos neurotóxicos el amonio se elimina normalmente en el hígado, mediante su incorporación en el ciclo de la urea. Concretamente, la formación del amonio depende de la glutaminasa presente en los eritrocitos intestinales y de la acción de una gran variedad de bacterias productoras de este enzima. Tras haber sido producido en el intestino, el amonio es absorbido y pasa a la circulación portal hepática hasta llegar al hígado donde en condiciones fisiológicas normales entra al ciclo de la urea para ser metabolizado. Mientras, en condiciones patológicas, el hígado falla y ve reducida su capacidad de metabolizar el amonio lo que hace que aumente su concentración en tejidos extrahepáticos y lleve, en última instancia, a la aparición de HA (Bachmann, 2002) que, a su vez, produce *per se* a nivel cerebral neuroinflamación (Hernández-Rabaza et al., 2016).

### **1.1.2. NEUROINFLAMACIÓN**

La neuroinflamación es una respuesta inflamatoria en el cerebro caracterizada por la activación de la microglía y la producción de mediadores pro-inflamatorios, que se ha visto que actúan sinérgicamente con la HA en la inducción de EH (Jayakumar et al., 2015).

En el cerebro, el amonio es detoxificado a través de su incorporación en glutamina por la enzima glutamina sintetasa, presente sólo en astrocitos. Sin embargo, situaciones de HA en sangre implican elevados niveles de amonio en cerebro, ya que se excede la capacidad de detoxificación por la glutamina sintetasa y, además, aumentan los niveles de glutamina en cerebro, lo que también puede ocasionar alteraciones en la función cerebral. La HA en cerebro está asociada a alteraciones cognitivas y motoras (Aguilar et al., 2000; Rodrigo et al., 2010; Hernández-Rabaza et al., 2016a y b)

Concretamente, la neuroinflamación lleva a la activación de la microglía en el hipocampo y al aumento de los niveles de diferentes interleuquinas (IL) proinflamatorias como la

interleuquina 1 beta (IL-1 $\beta$ ) y la interleuquina 6 (IL-6), del factor de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ ), a la vez que reduce la cantidad de IL antiinflamatorias como la interleuquina 10 (IL-10). En el caso de TNF- $\alpha$  se ha podido demostrar que existe una correlación entre los niveles séricos de este factor y la gravedad de la EH (Odeh et al., 2004). Además, se ha visto que en pacientes de EHM la IL-6 e la interleuquina 18 (IL-18) están aumentadas y que existe una correlación positiva entre los niveles de estas interleuquinas y el deterioro cognitivo leve (Montoliu et al., 2009).

Sin embargo, puesto que en los casos en los que la barrera hematoencefálica no está dañada las interleucinas no pueden atravesarla y alcanzar el cerebro, se ha propuesto que el mecanismo por el cual se produce la neuroinflamación estaría basado en señales producidas durante la inflamación que sí serían capaces de llegar al cerebro. Estas señales serían las que activarían a las células de la microglía que comenzarían a secretar citocinas pro-inflamatorias y generarían en última instancia la neuroinflamación.

Además, se ha demostrado que en modelos animales de HA crónica sin fallo hepático se produce neuroinflamación y que el tratamiento con antiinflamatorios no esteroideos (AINE) como el ibuprofeno reduce la activación microglial y, consecuentemente, la neuroinflamación restaurando, el aprendizaje y las capacidades motoras en las ratas. Todo esto pone de manifiesto que existen dos causas principales que generan EH: HA e inflamación (Fig. 1), lo cual altera la neurotransmisión, provocando la afectación cognitiva y motora de los pacientes con EH (Cauli et al., 2007; Cauli et al., 2009).

Cabe señalar también que las células que forman parte del sistema inmune en el cerebro son sobre todo células gliales, microglía y astrocitos (Bentivoglio et al., 2010). La microglía son los macrófagos residentes del Sistema Nervioso Central (SNC) y representan el principal componente celular del sistema inmune innato (Bentivoglio et al., 2010) y tienen dos funciones principales. Por un lado, tienen una función defensiva frente al daño producido por agentes dañinos exógenos; y, por otro lado, tienen una función reparadora frente al daño producido por el propio organismo. Ante estos estímulos, la microglía responde rápidamente secretando citocinas o potenciando su capacidad fagocítica. El tipo de respuesta dependerá del entorno en que se encuentre y del área cerebral (Aloisi, 2001).

Por su parte, los astrocitos se encuentran rodeando capilares en el SNC y una de sus funciones más importantes es la de mantener un microentorno adecuado para la función de las neuronas (Chung et al., 2010). No obstante, al igual que la microglía, participan en la respuesta

inmune del SNC frente a agresiones y cuando se activan, secretan citocinas y otros factores inflamatorios implicados en la respuesta inmune y en la comunicación intercelular (Farina et al., 2007).



**Figura 1. Factores desencadenantes de la EH.** El fallo hepático crónico da lugar a hiperamonemia e inflamación periférica y ambas actúan sinérgicamente en la inducción de alteraciones neurológicas en patologías hepáticas crónicas. Se produce neuroinflamación que altera la neurotransmisión y da lugar a problemas cognitivos y motores.

## 2. MODELO ANIMAL

Con el fin de avanzar en el estudio y la comprensión de las causas de la EH, así como en el desarrollo de nuevas terapias, es crucial la utilización de modelos animales. No obstante, es necesario que dichos modelos reproduzcan las características propias, observada en pacientes, de la enfermedad.

Actualmente, la *International Society for Hepatic Encephalopathy and Nitrogen Metabolism* (ISHEN) postula que las ratas son el mejor y más frecuente modelo a utilizar para el estudio de la EH. Aunque es cierto que existen otros muchos modelos que han sido utilizado con este fin.

Los principales modelos de EH crónica son:

- **Hiperamonemia crónica sin fallo hepático:** este modelo fue creado a finales de la década de los 80 por este mismo laboratorio y se basa en la inducción de HA mediante el suministro de acetato de amonio en la dieta (25% p/p) (Felipo et al.

1988; Azorín et al. 1989). Este método permite duplicar los niveles de amonio tanto a nivel tisular como en sangre de manera crónica y reproducir las alteraciones debidas únicamente a la HA, es decir, da la posibilidad de discernir entre qué efectos son debidos a la HA y cuales son producidos por el fallo hepático. Este modelo brinda la posibilidad de mantener un estado de HA crónica en los animales y estudiar tanto sus efectos a largo plazo a nivel cognitivo, de aprendizaje y a nivel motor, como la eficacia de diferentes tratamientos.

- **Anastomosis porta-cava (PCS):** se trata de un modelo quirúrgico basado en cortar la vena porta, principal aporte sanguíneo del hígado, y unirla a la vena cava. Así, la sangre procedente del intestino no pasa por el hígado y, por tanto, la capacidad de metabolizar las sustancias tóxicas por este órgano se ve disminuida. Las ratas PCS presentan HA, alteración de los ritmos circadianos (Bengtsson et al., 1986; Steindl et al., 1996) y del sueño (Hernandez-Viadel et al., 2003), así como alteraciones motoras como hipoquinesia (Rodrigo et al., 2007), y cognitivas como disminución de la memoria y la capacidad de aprendizaje (Rodrigo and Felipo, 2007).

- **Ligadura biliar (BDL, Bile duct-ligation):** consiste en obstruir el conducto biliar mediante una o varias ligaduras, de manera que se imposibilita el flujo de la bilis al intestino. Entre las alteraciones presentes en este modelo encontramos: fallo hepático, HA (Rodrigo et al., 2005), ictericia, hipertensión portal (Kountouras et al., 1984) y fibrosis que da lugar a cirrosis. Aparecen también tanto alteraciones cognitivas como motoras.

### **3. NEUROTRANSMISIÓN Y EH**

Una vez comentadas las principales causas de la EH, HA e inflamación, muchos grupos se han centrado en investigar los mecanismos que podrían dar lugar a los síntomas característicos de esta patología. Como se ha comentado anteriormente, la glutamina sintetasa es la enzima responsable de la detoxificación del amonio. Este enzima está presente únicamente en astrocitos y utiliza el amonio y el glutamato para formar glutamina, por lo que en un primer momento se propuso que la acumulación de glutamina en astrocitos podría dar lugar a un aumento de la presión osmótica dando lugar a un edema citotóxico. No obstante, estudios posteriores descartaron dicha hipótesis (Felipo, 2013).



La HA puede afectar a diferentes sistemas de neurotransmisión (glutamatérgica, gabaérgica, dopaminérgica, serotoninérgica y colinérgica), lo que da lugar a alteraciones tanto de la concentración extracelular de neurotransmisores, como a la cantidad, expresión en membrana y funciones de los receptores y transportadores de neurotransmisores y a las vías de transducción de señales asociadas a dichos receptores (Cauli et al., 2009; Monfort et al., 2002). De esto podemos deducir que la EH no es consecuencia de cambios en un único sistema de neurotransmisión, si no de diferentes sistemas de neurotransmisión que dan lugar a una alteración en la comunicación de diferentes circuitos neuronales, que modulan la función cognitiva y motora.

El presente trabajo se centra en el estudio de la neurotransmisión glutamatérgica en un modelo animal de EH.

### **3.1. NEUROTRANSMISIÓN GLUTAMATÉRGICA**

Las alteraciones en la neurotransmisión glutamatérgica juegan un papel clave tanto en HA crónica y aguda como en la EH.

El glutamato es el neurotransmisor excitatorio más importante del SNC. Presente en la mayor parte de neuronas excitatorias, el sistema glutamatérgico se piensa que está presente en más de la mitad de las sinapsis cerebrales.

El glutamato es un aminoácido no esencial incapaz de atravesar la barrera hematoencefálica, por lo que debe ser sintetizado por las neuronas a partir de su principal precursor, la glutamina, liberada por las células gliales, gracias a la glutaminasa mitocondrial. Una vez sintetizado, el glutamato es liberado al citoplasma donde se empaqueta en vesículas sinápticas y, finalmente, se libera a la hendidura sináptica en un proceso dependiente del ión calcio.

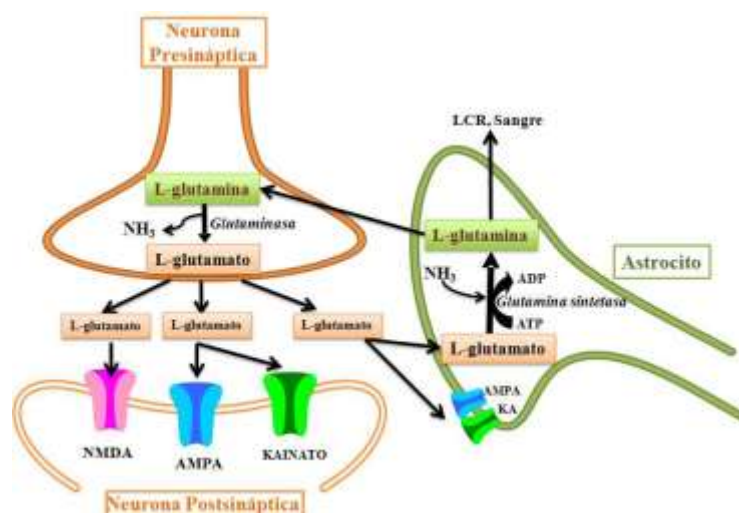
Una vez liberado a la hendidura sináptica, el glutamato es eliminado mediante los transportadores EAATs (excitatory amino acid transporters), que pueden ser de tres tipos: GLAST y GLT-1, presentes en astrocitos, y EAAC1, presente en neuronas. Todos ellos juegan un papel clave en la regulación rápida de la neurotransmisión glutamatérgica, aumentando su expresión tras la activación de los iGluRs (receptores de glutamato ionotrópicos) (Waxman et al., 2007).

El exceso de glutamato liberado es captado por neuronas, que lo reciclan, y por astrocitos que mediante el enzima glutamina sintetasa lo convierten a glutamina que, a su vez, será transportada a las terminaciones nerviosas cerrándose de nuevo el ciclo (Fig. 2).

En cuanto a los receptores presentes en las neuronas postsinápticas, estos pueden ser de dos tipos: metabotrópicos e ionotrópicos.

Los receptores ionotrópicos pueden subdividirse en tres categorías según su afinidad hacia agonistas específicos: los receptores de N-metil-D-aspartato o NMDA, los receptores de ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol-propiónico o AMPA y los receptores de kainato (KR). Todos ellos están constituidos por cuatro o cinco subunidades y actúan como canales iónicos, que se abren permitiendo el paso de iones  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$  y la salida de iones  $\text{K}^+$  al unirse el neurotransmisor. De manera que producen respuestas excitatorias rápidas, traduciéndose la señal química en eléctrica en pocos milisegundos (Niciu et al., 2012).

Mientras, los receptores metabotrópicos ejercen su efecto mediante el reclutamiento y la activación de proteínas G triméricas que activan vías de transducción de señales mediante la activación de segundos mensajeros, teniendo de este modo una función moduladora. Estos receptores pueden dividirse en tres grandes grupos: los del grupo I, mGluA1 y mGluA2; los del grupo II, mGluA2 y mGluA3; y los del grupo III, mGluA4, mGluA6, mGluA7 y mGluA8 (Niciu et al., 2012).



**Figura 2. Ciclo glutamato-glutamina.** El glutamato es liberado a la hendidura sináptica por la neurona presináptica. Para evitar la excesiva activación de sus receptores ionotrópicos (NMDA, AMPA, Kainato), el glutamato es rápidamente eliminado de la hendidura sináptica por transportadores de glutamato localizados tanto en los astrocitos circundantes como en neuronas. Los astrocitos incorporan un grupo amonio al glutamato mediante la glutamina sintetasa formando glutamina. Esta glutamina, liberada por el astrocito, es captada por las neuronas donde se transforma en glutamato y en amonio por la acción de la glutamínasa. El glutamato se incorpora en vesículas sinápticas que serán liberadas de nuevo a la hendidura sináptica. Figura obtenida de Cabrera-Pastor, 2014.

### **3.1.1. RECEPTORES NMDA**

Los receptores NMDA se encuentran formando un canal iónico permeable a  $\text{Ca}^{2+}$ , que está constituido por combinaciones de las subunidades GluN1 (GluN1A, GluN1B, GluN1C y GluN1D), GluN2 (GluN2A, GluN2B, GluN2C y GluN2D) y GluN3. Siendo la estructura más común un heterodímero con dos subunidades GluN1 y dos subunidades GluN2. Para la activación del receptor, se requiere no sólo de la presencia de glutamina, sino también de glicina que actúa como co-agonista. Además, estos receptores son modulados por el catión  $\text{Mg}^{+}$  extracelular, siendo esta modulación dependiente del potencial de membrana. El  $\text{Mg}^{+}$  bloquea el canal y cuando se produce una despolarización de la membrana, este catión es expulsado y, por tanto, se abre el canal (Purves et al. 2004).

Cabe señalar que los receptores NMDA son indispensables para fenómenos de plasticidad sináptica y, por tanto, para la memoria y el aprendizaje, dada su alta permeabilidad al  $\text{Ca}^{2+}$ .

### **3.1.2. RECEPTORES AMPA**

Los receptores AMPA son los receptores postsinápticos excitatorios más comunes en el SNC y están formados por 4 subunidades (GluA1, GluA2, GluA3 y GluA4), que se combinan dos a dos para formar tetrámeros. La activación de estos receptores permite la entrada de iones  $\text{Na}^{+}$  al interior de la neurona. Se sabe que existe una diferencia funcional entre las distintas conformaciones según las subunidades que lo compongan. Así, por ejemplo, los receptores AMPA que no contienen la subunidad GluA2 son permeables no sólo a  $\text{Na}^{+}$ , sino también a  $\text{Ca}^{2+}$  (Liu and Cull-Candy, 2005), lo cual es clave en fenómenos de plasticidad sináptica. Además, su composición también puede afectar a la afinidad, de manera que se pueden distinguir entre receptores AMPA de alta o de baja afinidad; por ejemplo, los receptores permeables a  $\text{Ca}^{2+}$  son casi activos completamente a bajas concentraciones de AMPA (0.1 mM), mientras que aquellos receptores impermeables a  $\text{Ca}^{2+}$  tienen una menor afinidad (Cabrera-Pastor et al., 2012).

Aquí cabe mencionar que, pese a que algunas sinapsis están constituidas únicamente por receptores AMPA o NMDA, la mayoría de ellas están formadas por combinaciones de ambos tipos, de manera que la activación de los receptores AMPA puede ocasionar la despolarización de la membrana y, por consiguiente, la activación de los receptores NMDA (Xin et al., 2005; Salonen et al., 2006; Cabrera-Pastor et al., 2012).

De todo esto podemos deducir que las alteraciones en la composición de los receptores de membrana pueden afectar tanto a la respuesta como a la plasticidad sináptica, siendo esta

última la base para el aprendizaje y la memoria, que se ve alterada en diferentes patologías como pueden ser la epilepsia o el Alzheimer, además de la EH.

### **3.2. ALTERACIÓN DE LA NEUROTRANSMISIÓN EN EH**

La HA crónica puede afectar a todos los sistemas de neurotransmisión (glutamatérgica, gabaérgica, dopaminérgica, serotoninérgica y colinérgica); tanto a nivel de la concentración extracelular de neurotransmisores, como a la cantidad, expresión en membrana, fosforilación y función de los receptores de neurotransmisores y transportadores. Además, la HA también puede afectar a la transducción de señal asociada a dichos receptores y transportadores y, por tanto, a la plasticidad sináptica (Felipo, 2013).

Además, Para la correcta expresión en membrana de receptores y transportadores es necesario un balance entre diferentes mecanismos celulares: transcripción, niveles de mRNA, traducción, estabilidad de las proteínas, así como un correcto ensamblaje y localización en la membrana celular (Traynelis et al., 2010). Por ello, no es de extrañar que la alteración de estos procesos pueda afectar a la expresión en membrana de receptores y transportadores de neurotransmisores.

Numerosos estudios apoyan que las alteraciones observadas en EH se deben a alteraciones en la neurotransmisión que, a su vez, originan alteraciones en la comunicación neuronal. Concretamente, estudios llevados a cabo mediante imágenes de resonancia magnética funcional (IRMf) del cerebro en estado de reposo, muestran que los pacientes con EHM presentan alteraciones en la conectividad de circuitos neuronales específicos, entre ellos en el tálamo, cortex y gánglios basales, lo que se correlaciona con las disfunciones neurofisiológicas observadas en estos pacientes (Zhang et al., 2012). De hecho, se ha visto que por ejemplo está alterada la expresión de diferentes subunidades de los receptores NMDA y AMPA en el hipocampo de modelos animales de HA crónica (Cabrera-Pastor et al., 2015; Taoro-Gonzalez et al., 2018).

## **4. PAPEL DEL HIPOCAMPO EN LA MEMORIA Y EL APRENDIZAJE**

El aprendizaje hace referencia al proceso de adquisición de conocimientos, habilidades o actitudes mediante la experiencia o la educación, que da lugar a un cambio persistente, cuantificable y específico en el comportamiento de un individuo. Mientras, la memoria abarca

todos los procesos que posibilitan tanto el registro, como la codificación, consolidación, almacenamiento y recuperación de la información (Kandel, 2000). No obstante, aprendizaje y memoria pueden considerarse dos procesos relacionados que podrían definirse como dos pasos subsiguientes a la adquisición y elaboración de la información proporcionada por el medio ambiente a través de los sentidos. Cabe señalar que el aprendizaje implica siempre una forma de adquisición de información y, por lo tanto, una modificación del estado de la memoria del sujeto (Kandel, 2000).

En función de su duración, la memoria puede dividirse en dos subtipos: memoria a corto plazo (STM, short-term memory) y memoria a largo plazo (LTM, long-term memory). La STM se asocia con la retención durante segundos o minutos; mientras, la LTM permite almacenar grandes cantidades de información durante un tiempo en principio ilimitado.

Otra forma de clasificar la memoria es en (Soriano, 2007):

- **Memoria declarativa (explícita)** que hace referencia al conocimiento de hechos (conocimiento general sobre el mundo) y acontecimientos (personas, lugares, cosas) y lo que significan. Esta memoria se recuerda de manera consciente, es flexible e implica asociación de informaciones. Ésta a su vez se subdivide en:
  - Memoria episódica: incluye eventos experimentados personalmente y depende de la capacidad de cada individuo para recordar el contexto temporal y espacial en que se produjo.
  - Memoria semántica: incluye el conocimiento de estos hechos independientes del contexto en el que se aprendieron.
- **Memoria no declarativa (implícita)** consiste en información sobre cómo llevar algo a cabo. Se recuerda de forma inconsciente, es rígida y se encuentra vinculada a las condiciones en las que se produjo el aprendizaje. Por norma general requiere repetición y práctica y se olvida con mayor facilidad.

Estos dos tipos de memoria implican diferentes sistemas neuronales. Por su parte, la memoria declarativa depende fundamentalmente de su formación hipocampo, aunque también están implicadas otras áreas como la corteza o el lóbulo temporal medial. Mientras, la no declarativa no depende del hipocampo, sino del estriado y de la memoria emocional de la amígdala.

El hipocampo es uno de los centros cerebrales del aprendizaje y la memoria junto con el córtex prefrontal, el estriado o el cerebelo (Soriano, 2007). Numerosos investigadores han podido observar cómo la memoria se ve afectada tras daños bilaterales del lóbulo temporal medial y durante el daño selectivo del hipocampo. Los pacientes que presentan tal tipo de daños experimentan dificultad para adquirir nuevos recuerdos conscientemente (es decir, explícitos), mientras que la STM, el aprendizaje procedimental y algunos recuerdos remotos que se adquirieron mucho antes de la lesión se conservan. Estas observaciones, combinadas con los resultados obtenidos de modelos animales de amnesia, han llevado a la Teoría Declarativa de la función del hipocampo (Bird and Burgess, 2008).

Además, el hipocampo también está implicado en la formación y consolidación de la memoria espacial.

En cuanto a la estructura y organización de la memoria, se sabe que cualquier tipo de aprendizaje y memoria depende de una red neuronal específica. No obstante, los circuitos involucrados se encuentran interconectados (Kandel, 2000).

El hipocampo es una región cerebral del sistema límbico, que se curva a lo largo del ventrículo lateral, y que es clave para el establecimiento de ciertos tipos de memorias, como las memorias episódicas y espaciales (Deng et al., 2010). En él podemos encontrar diferentes regiones: giro dentado, complejo subicular e hipocampo propiamente dicho o “Cuerno de Ammon” que, a su vez, puede subdividirse en las regiones CA1, CA2 y CA3. Si bien existen en él neuronas no piramidales, las cuales se distribuyen en diferentes capas; el principal tipo celular presente en el hipocampo son las neuronas piramidales.

La plasticidad sináptica, base de la memoria y el aprendizaje, está constituida por dos fenómenos: potenciación a largo plazo (LTP, long-term potentiation) y la depresión a largo plazo (LDP, long-term depression). La LTP consiste en un aumento persistente (en el tiempo) del componente excitatorio de la respuesta sináptica, lo que produce un aumento de la eficacia sináptica que perdura en el tiempo. Este fenómeno es considerado como la base de algunas formas de aprendizaje y memoria. De hecho, en numerosos estudios se han observado cambios en la plasticidad sináptica en diferentes tipos de memoria que dependen de circuitos neuronales tanto del hipocampo como de la amígdala (Martin et al., 2000; Sigurdsson et al., 2007).

Cuando los animales de laboratorio son sometidos a un aprendizaje se ha demostrado que se induce LTP en el hipocampo (Moser et al., 1994); es más, existe una correlación

significativa entre la magnitud de los potenciales postsinápticos excitatorios (EPSPs) y la capacidad de aprendizaje de una tarea de memoria espacial (Barnes et al., 1996).

En el caso de EHM, diferentes estudios han puesto de manifiesto que modelos animales de EHM tienen una menor capacidad de aprendizaje espacial. Al parecer, en EHM se produce un deterioro de la LTP debido a una menor expresión y activación de los receptores AMPA y NMDA, implicados en tal proceso (Monfort et al., 2007).

Además, se ha visto que lesiones del hipocampo, tanto en primates como en humanos, dificultan el almacenamiento inicial de ciertas formas de LTM (Squire and Zola-Morgan, 1991). En monos con disfunción del sistema septo-hipocampal inducida por lesiones excitotóxicas en la región CA1 del hipocampo se observa una disminución de la capacidad de aprendizaje de tareas que requieren discriminación condicional (Ridley and Baker, 1997).

Existen distintas teorías que tratan de explicar el papel del hipocampo en la memoria, y todas ellas coinciden en que el hipocampo es requerido para formar relaciones entre estímulos ambientales. Sin embargo, estas teorías divergen en la función que desempeña el hipocampo en la LTM. La primera de las teorías sugiere que las memorias se generan en el hipocampo, y que durante la consolidación es transferida al neocórtex donde son almacenadas y se pueden recuperar. Mientras, la segunda teoría propone que el área hipocampal funciona como un área generadora de memorias, pero con la diferencia de que, en esta teoría, la LTM no se transferiría de forma total al neocórtex, sino que ciertos recuerdos episódicos se quedan almacenados únicamente en el hipocampo (Koehl and Abrous, 2011).

Sea como sea, el hipocampo juega un papel crucial en la modulación tanto del aprendizaje, como de la memoria espacial. A continuación, se describe uno de los test más usados para evaluar el aprendizaje y la memoria espacial.

#### **4.1. TEST DE MEMORIA Y APRENDIZAJE ESPACIAL EN MODELOS ANIMALES: LABERINTO RADIAL**

Tanto para humanos como para el resto de los animales tener una buena orientación espacial es clave para la supervivencia, ya que numerosas conductas, como aquellas alimenticias o reproductivas, dependen en buena medida del conocimiento acerca del entorno que les rodea. El animal debe usar una determinada estrategia de navegación, ya sea innata o adquirida. Se puede definir la navegación espacial como una conducta compleja orientada a una meta que

requiere como mínimo conocer el lugar en el que el animal está y el lugar a donde quiere ir. Este conocimiento requiere la codificación de información multimodal concerniente a la posición del cuerpo en relación con el entorno (Wang and Spelke, 2002). A esta capacidad de los animales de emplear distintas estrategias de navegación para encontrar un lugar en un entorno previamente visitado se le denomina aprendizaje espacial. Por otra parte, entendemos la memoria espacial como la habilidad para codificar, almacenar y recuperar información aprendida sobre las localizaciones espaciales (Kessels et al., 2001).

Con el fin de estudiar los mecanismos que regulan los distintos tipos de aprendizaje y memoria, así como evaluar los cambios de comportamiento inducidos por una situación patológica, alteraciones genéticas, un tratamiento dado, o activación/desactivación de receptores específicos, entre otros estudios, se usan tests de aprendizaje y memoria espacial. En este caso se realizará el test del laberinto radial de ocho brazos, cuya ejecución precisa de memoria espacial y es sensible a los daños producidos en el hipocampo (Hudon et al., 2002). El animal, en sucesivos ensayos, debe explorar el ambiente que le rodea y aprender en que brazo del laberinto está localizada la comida (ver procedimiento en Material y Métodos, apartado 3.3. Test de aprendizaje y memoria: laberinto radial de 8 brazos, página XX). Este test permite evaluar dos tipos de memoria: la memoria de referencia, que se considera disminuida cuando el roedor no sólo visita los brazos en los que cree que habrá comida, y la memoria de trabajo, que se evalúa negativamente si el roedor entra más de una vez en cada brazo.

Como se ha comentado anteriormente, los modelos de rata de EH reproducen las alteraciones cognitivas observadas en pacientes con EH y presentan una reducción de la memoria y aprendizaje espacial (Monfort et al., 2007; Hernandez-Rabaza et al., 2015), así como una reducción del aprendizaje discriminatorio en el Y-maze (Erceg et al., 2005; Cauli et al., 2007). Además, estas alteraciones pueden observarse con otros test como el laberinto radial de 8 brazos y el laberinto acuático de Morris (Hernandez-Rabaza et al., 2015); de hecho, la alteración del aprendizaje espacial en estos laberintos parece estar debida a la presencia de neuroinflamación en el hipocampo, que lleva, a su vez, a la alteración de la expresión en membrana de receptores NMDA y AMPA (Hernandez-Rabaza et al., 2015; Hernández-Rabaza et al., 2016).

Por todo ello, partiendo del hecho de que ratas con HA crónica presentan, al igual que pacientes cirróticos, alteraciones cognitivas, las cuales incluyen alteraciones en la memoria y aprendizaje espacial; se evaluará mediante el test del laberinto radial tanto el aprendizaje y la



memoria espacial, como la memoria de trabajo. Numerosos estudios han demostrado que en modelos de EHM se producen alteraciones tanto del aprendizaje como de la memoria espacial (Méndez et al., 2008; Cabrera-Pastor et al., 2016).

## **5. NEUROINFLAMACIÓN: IL-1B**

Las citocinas son proteínas de bajo peso molecular secretadas por diferentes tipos celulares, con una vida media corta, que tienen un efecto en la señalización y comunicación celular. Estas moléculas pueden tener efecto: autocrino, paracrino y endocrino y están implicadas en diversas funciones como la apoptosis, la secreción y la migración y diferenciación celular.

La Interleucina-1  $\alpha$  (IL-1 $\alpha$ ) y la IL-1 $\beta$  son citocinas proinflamatorias con efectos pleiotrópicos en gran variedad de tipos celulares y que, además, juegan un papel clave tanto en la inflamación aguda y crónica, como en diferentes desordenes autoinmunes. Estas interleucinas tienen dos receptores, los receptores de tipo 1 (IL-1RI) y los de tipo 2 (IL-1RII); el receptor IL-1RI, está implicado en la señalización celular, mientras que el IL-RII no conduce a señalización celular, sino que inhibe la acción de sus ligandos (Ren and Torres, 2009). Esta familia está formada por siete ligandos agonistas: IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-18, interleuquina 33 (IL-33), interleuquina 36, alfa, beta y gamma (IL-36 $\alpha$ , IL-36 $\beta$  e IL-36 $\gamma$ ); y por cuatro antagonistas: IL-1Ra (antagonista del receptor de la IL-1), IL-36Ra (antagonista del receptor de la IL-36), interleuquina 37 (IL-37) e interleuquina 38 (IL-38). Los receptores presentan un dominio *Toll-like receptor* en la cara citoplasmática que se encarga de transmitir la señal hacia el interior celular. Sin embargo, existen cuatro subunidades de unión a ligando y tres subunidades señalizadoras (Tsutsui et al. 2015).

En este caso nos centraremos en la interleucina-1  $\beta$  (IL-1 $\beta$ ). Esta interleucina tiene importantes funciones homeostáticas como la regulación de la alimentación, del sueño y de la temperatura. Sin embargo, la sobreproducción de IL-1 $\beta$  está implicada en cambios fisiológicos que aparecen en diferentes patologías como la artritis reumatoide, la osteoartritis, enfermedades vasculares, la esclerosis múltiple, la enfermedad de Alzheimer o el dolor neuropático. La IL-1 $\beta$  puede ser secretada por queratinocitos, fibroblastos, células sinoviales, neuronas, células inmunológicas como mastocitos y macrófagos y por células gliales como las células de Schwann, células de la microglía y astrocitos (Ren y Torres, 2009).

En cuanto a la producción de IL-1 $\beta$  puede inducirse por la presencia de patógenos, pero también en ausencia de ellos, lo que se denomina inflamación estéril. No obstante, esta

citoquina se sintetiza en una forma inactiva denominada pro-IL-1 $\beta$ ; de manera que requiere de procesamiento postraduccional para su activación. Esta activación puede ser intracelular (en el inflammasoma de algunas células del sistema inmunológico) o extracelular (por diferentes enzimas liberadas por neutrófilos, células dendríticas y macrófagos). Además, cabe señalar que IL-1 $\beta$  permanece en el interior celular hasta que aparecen los estímulos apropiados para su liberación (Tsutsui et al. 2015).

En cuanto al SNC, la IL-1 $\beta$  se encuentra en condiciones basales, lo que sugiere que tiene una función fisiológica normal. La IL-1 $\beta$  parece jugar un papel clave en la memoria, en la regulación de la temperatura, del sueño, de los ritmos circadianos y de la ingesta de comida. Además, si bien se sabe que la IL-1 $\beta$  y sus receptores están distribuidos por todo el cerebro, presentan una mayor densidad en el hipocampo, una región clave para la consolidación de memorias, el aprendizaje espacial y la integración neuroendocrina (Farrar et al., 1987; Parnet et al., 1994; Rothwell and Hopkins, 1995).

En el caso de la EH, Lai et al. 2018 demostraron en cultivos neuronales que la exposición a IL-1 $\beta$  reduce la fosforilación en el residuo Ser831 y, por consiguiente, la expresión en membrana de la subunidad GluA1 del receptor AMPA en neuronas del hipocampo, lo cual fue revertido mediante el tratamiento con IL-1Ra, un antagonista competitivo endógeno de la IL-1, que se une a la superficie de los receptores de IL-1. Asimismo, Machado et al. observaron que la IL-1 $\beta$  reduce la fosforilación de la subunidad GluA1 en los residuos Ser831 y Ser845 y que la administración intrahipocampal de IL-1 $\beta$  induce una disminución de la expresión total de GluA1.

En cuanto a la LTP, que es un aumento duradero de la transmisión sináptica clave para la consolidación de memoria en el hipocampo (Diamond et al., 2005), se ha visto que conduce a una mayor expresión del gen de la IL-1 $\beta$  (Schneider et al., 1998). Además, varios estudios han demostrado que el tratamiento con IL-1 $\beta$  inhibe la LTP (Bellinger et al., 1993, Cunningham et al., 1996, Katsuki et al., 1990). Estos resultados sugieren que la IL-1 $\beta$  está jugando un papel clave en el aprendizaje y la memoria en el hipocampo. Sin embargo, los mecanismos por los que la IL-1 $\beta$  regula la LTP y la plasticidad todavía siguen sin esclarecerse. Puesto que los receptores AMPA son claves en la mejora de la transmisión sináptica que se produce durante la LTP son un candidato clave sobre el cual podría estar ejerciendo sus efectos la IL-1 $\beta$  (Lai et al., 2006). Probablemente, modulando bien la expresión en membrana de las diferentes subunidades o bien a nivel de modificaciones postraduccionales, como por ejemplo la fosforilación.

Recientemente se ha propuesto que el deterioro del aprendizaje espacial y la memoria en ratas con EH se debe a los mayores niveles de IL-1 $\beta$  en el hipocampo (Hernández-Rabaza et al., 2015). Además, se ha demostrado que tanto las ratas con EH como las ratas HA (sin insuficiencia hepática) muestran neuroinflamación, con niveles aumentados de IL-1 $\beta$  y otros marcadores proinflamatorios, y que, además, presentan una alteración de la expresión en membrana de las subunidades de las subunidades de los receptores AMPA y NMDA en el hipocampo (Taoro-González et al., 2018).

# HIPÓTESIS

La EH está causada por la acción sinérgica de dos factores, HA e inflamación, los cuales inducen neuroinflamación y alteran la neurotransmisión glutamatérgica y la expresión en membrana de los receptores AMPA y NMDA. Además, se sabe que los niveles de IL-1 $\beta$  se encuentran aumentados en el hipocampo en EH, lo que produce un ambiente inflamatorio (Hernández-Rabaza et al., 2015; Dadsetan et al., 2016; Hernández-Rabaza et al., 2016).

Por todo ello, nuestra hipótesis es que la IL-1 $\beta$  es un mediador clave para desencadenar la neuroinflamación observada en EH en hipocampo y, por tanto, debe estar jugando un papel fundamental en la alteración de la neurotransmisión, lo que conduciría a las alteraciones observadas en el aprendizaje y memoria espacial en modelos animales de EH. El tratamiento con un antagonista del receptor IL-1, IL-1Ra, podría revertir tales alteraciones.

## OBJETIVOS

El principal objetivo del presente trabajo es estudiar el papel de la IL-1 $\beta$  sobre la neuroinflamación, la alteración de la neurotransmisión y la capacidad de aprendizaje y memoria espacial en un modelo animal de HA crónica.

Los objetivos concretos son:

- Analizar la neuroinflamación en el hipocampo de ratas hiperamonémicas: la activación de microglía y astrocitos
- Estudiar el efecto del tratamiento con el antagonista del receptor de IL-1, IL-1Ra, sobre la activación de microglía y astrocitos en ratas control y con HA crónica
- Dilucidar el papel de la IL-1 $\beta$  en la alteración de neurotransmisión, analizando para ello la expresión en membrana de diferentes subunidades de los receptores AMPA (GluA1 y GluA2) y NMDA (GluN1 y GluN2A) en cortes de hipocampo *ex vivo*:
  - De ratas con HA crónica
  - Tras el tratamiento crónico con IL-1Ra en ratas control y con HA crónica
- Analizar el índice de aprendizaje, la memoria de referencia espacial y la memoria de trabajo en:
  - Ratas con HA crónica
  - Tras el tratamiento crónico con IL-1Ra en ratas control y con HA crónica

# MATERIAL Y MÉTODOS

## 1. MODELO ANIMAL

Como modelo animal se han utilizado ratas Wistar (120–140 g, Charles River Laboratories), específicamente el modelo de HA crónica sin fallo hepático diseñado por este laboratorio (Felipo et al., 1988; Azorin et al., 1989). Para ello, las ratas se alimentaron con dieta rica en amonio (25% acetato de amonio p/p) durante un período mínimo de tres semanas, lo que conduce a un aumento de los niveles de amonio del 41% en cerebro, del 37% en hígado y del 51% en músculo y a la duplicación de la cantidad de amonio en sangre. Todo ello permite simular las condiciones presentes en los pacientes con patologías hepáticas crónicas.

Por otro lado, como control se utilizaron ratas de la misma cepa, pero a éstas se les suministró una dieta estándar.

Los procedimientos con animales fueron supervisados y aprobados por el Centro de Investigación Príncipe Felipe y siguiendo la normativa del European Communities Council Directive (86/609/EEC).

## 2. PROCEDIMIENTO QUIRÚRGICO

Se implantaron minibombas osmóticas con cánula para infusión cerebral (“ALZET”. Brain infusion KIT II 3-5 mm. Mini-Osmotic pumps model 2004. ALZA Corporation, Palo Alto, CA, USA) en ratas tras dos semanas de dieta rica en amonio. Las minibombas osmóticas se rellenaron previamente con vehículo (suero salino) o con el antagonista del receptor de IL-1, IL-1Ra (R&D Systems; cat# 1545-RA-025) a una concentración de 55 µg/ml. Estas minibombas osmóticas tienen una capacidad de 220 µL y liberan 0.25 µL/hora durante 28 días.

Se utilizaron 4 grupos de ratas:

- Ratas control a las que se implantaron minibombas osmóticas con vehículo (C-veh).
- Ratas control a las que se implantaron minibombas osmóticas con IL-1Ra (C-IL1Ra).
- Ratas hiperamonémicas a las que se implantaron minibombas osmóticas con vehículo (HA-veh).

- Ratas hiperamonémicas a las que se implantaron minibombas osmóticas con IL-1Ra (HA-IL1Ra).

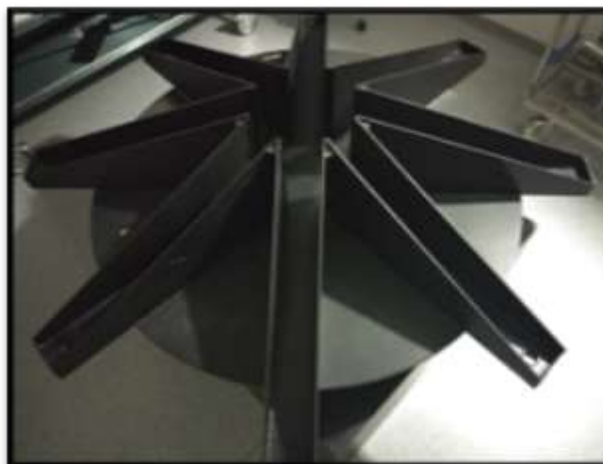
Tras 28 días desde la implantación de las minibombas osmóticas se sacrificaron las ratas mediante decapitación. La funcionalidad de las bombas se verificó pesándolas antes de colocarlas y después del sacrificio. Después del sacrificio, se analizó la neuroinflamación y la expresión en membrana de distintos receptores (Fig. 3).



**Figura 3. Esquema temporal del diseño experimental.** En la primera semana comienza a suministrarse la dieta rica en amonio que continúa hasta el momento del sacrificio. La implantación de minibombas osmóticas para la liberación crónica de IL-1Ra o vehículo se realiza entre la segunda y la tercera semana. Durante la quinta semana se realiza el test del laberinto radial de ocho brazos. Finalmente, durante la sexta semana se procede al sacrificio de los animales y al análisis en el hipocampo de la neuroinflamación y de la expresión en membrana de los receptores glutamatérgicos AMPA y NMDA.

### 3. TEST DE APRENDIZAJE Y MEMORIA: LABERINTO RADIAL DE 8 BRAZOS

El laberinto radial permite estudiar tanto la memoria de referencia como la memoria de trabajo y el aprendizaje espacial. Para ello consta de ocho brazos equidistantes, con una longitud de 70 cm y una anchura de 10 cm, colocados radialmente en torno a un área central circular de unos 30 cm de diámetro. Cada uno de estos brazos presenta paredes laterales cuya altura es superior en el extremo próximo al área central (30 cm) que en el extremo distal (5 cm) (Fig. 4).



**Figura 4. Laberinto radial de 8 brazos.**

A las ratas se les reduce la ingesta de comida cuatro días antes de realizar el test (que se realiza 5 semanas después de comenzar la dieta y, por tanto, dos semanas después de la implantación de las minibombas osmóticas) y se mantienen con una dieta restrictiva durante todo el período en que se vaya a realizar el test. En la sesión de habituación los animales se introducen en parejas y se les suministra comida a lo largo de todo el laberinto. Una vez hecho esto, el test se realiza durante 6 días con 5 ensayos por día. Se coloca la comida en 4 de los 8 comederos que tiene el laberinto: en 2 brazos consecutivos (por ejemplo, en el 5 y en el 6) y en otros 2 brazos no consecutivos (por ejemplo, en el 3 y en el 8). Siendo siempre la configuración de los brazos con o sin comida diferente para cada animal. Se espera que la rata se coma todas las bolitas de leche, siempre dando un tiempo máximo de 3 minutos. Aquí cabe señalar que en caso de que alguna de las ratas permanezca inmóvil durante un par de días seguidos se elimina del estudio.

Como se ha comentado, al final de cada brazo puede colocarse comida sin que ésta sea visible desde el centro del laberinto. Así, con este test se analizan: los errores de referencia espacial, que son el número de veces que entra la rata en un brazo sin comida; los errores de memoria de trabajo, que son el número de veces que entra en un brazo que ya ha visitado durante ese mismo ensayo; y el número de aciertos en cada ensayo, que corresponde al número de entradas en los brazos que tienen comida. Además, se calculó el índice de aprendizaje, que es la diferencia entre el número de aciertos de cada ensayo y el número de errores de referencia.

#### **4. ANÁLISIS DE LA NEUROINFLAMACIÓN**

Las ratas fueron anestesiadas con 1 ml/kg de pentobarbital sódico intraperitoneal y se perfundieron por vía intracardiaca con suero salino heparinizado (NaCl 0.9%, 0.01% Heparina) para eliminar la sangre. Se fijaron los tejidos mediante perfusión con 500 ml de paraformaldehído al 4% en tampón fosfato (PB) 0.1 M ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  100 mM,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  25 mM) (pH 7,4) a temperatura ambiente. A continuación, se extrajo el encéfalo cuidadosamente y se mantuvo inmerso durante un período no superior a 24 horas y a 4 °C en la misma solución fijadora.

Tras las 24h de post-fijación, las muestras se pusieron en cassettes de histología y se procesaron para su inclusión en parafina utilizando el procesador de tejidos *ASP 300 de Leica Microsystems*. Los pasos fueron: 60 minutos en formalina, 45 minutos en EtOH 70%, 45 minutos en EtOH 90%, 4 cambios (45" + 3x60") en EtOH 100%, 3 cambios (45, 60 y 75") en xileno, y otros 3 en parafina (Histowax, MP 56-58 °C) de 60 min.



Una vez hecho todo esto, el cerebro entero se incluyó en parafina y se cortaron secciones horizontales de 5µm utilizando un micrótopo.

Se incubaron los cortes 1 hora a 62 °C para desparafinar las muestras. A continuación, se realizó la recuperación antigénica (FLEX TRS High), ya que durante el proceso de inclusión en parafina se forman enlaces covalentes con los antígenos que dificultan el reconocimiento por el anticuerpo, y a través de un tratamiento con calor (95 °C), se disocian dichos enlaces, lo que permite conseguir un mejor reconocimiento antigénico.

Las secciones se procesaron con el kit Envision Flex + (DAKO) para bloquear la peroxidasa endógena durante 5 minutos. A continuación, los cortes se lavaron con tampón fosfato (PB) 0.1 M + 0.9% NaCl + 0,1% Triton-x100 y se incubaron con el anticuerpo primario diluido en solución de bloqueo (Tabla 1) y, nuevamente, con el fin de eliminar el anticuerpo primario residual, se volvieron a lavar los cortes con el mismo tampón. Una vez hecho esto los cortes se incubaron con el anticuerpo secundario biotinilado (conjugado con la peroxidasa) (listo para usar, DAKO) durante 20 minutos. Cabe señalar que este anticuerpo presenta un sistema de revelado basado en *Horseradish Peroxidase* (HRP) capaz de reaccionar con un sustrato colorimétrico, diaminobenzidina (DAB). Las posibles uniones no específicas de los anticuerpos primarios y secundarios se previnieron mediante la incubación de los cortes en la solución de bloqueo compuesta por suero de la especie animal en el que se había producido el anticuerpo secundario al 6% en PBS-Tx durante 1 hora. Para el revelado se incubaron los cortes con *Envision Flex+horseradish peroxidase* durante 20 minutos y, finalmente, con DAB (diaminobencidina) durante 10 minutos. Una una vez transcurrido este tiempo, se contratiñeron los núcleos con hematoxilina (DAKO, S3309). Finalmente, para la deshidratación de los cortes, se usaron concentraciones crecientes de alcoholes: 50%, 70%, 96% y 100% durante 5, 5, 5 y 10 minutos respectivamente. Tras la deshidratación, los cortes se mantuvieron en xileno durante 10 minutos y finalmente se montaron las preparaciones.

**Tabla 1.** Anticuerpos primarios usados para la inmunohistoquímica.

Anticuerpo 1º	Casa comercial - Catálogo	Aplicación	Dilución	Tiempo (min)
Anti-Iba1	(Wako, 019-19741)	IHQ	1:300	30
Anti-GFAP	(DAKO, IR524)	IHQ	1:1 (Ready to use)	20

Una vez secas las preparaciones, se escanearon con el escaner Pannoramic 250 (Automatic Brightfield Scan) y las imágenes fueron analizadas con el programa Pannoramic

Viewer, que permite realizar fotos a distintos aumentos (1X, 5X, 10X, 20X, 40X y 56X) de las regiones de interés. En este caso, todas las imágenes fueron tomadas con el objetivo de 56X.

Contamos con un total de cuatro animales por grupo (siendo los grupos: contro-vehículo, control-IL1Ra, hiperamonémica-vehículo e hiperamonémicas-IL1Ra) y se obtuvieron como mínimo ocho fotos a 56X del hipocampo de cada uno de los animales.

Finalmente, con el programa de análisis de imagen *ImageJ*, se analizó la activación de microglía y astrocitos.

#### **4.1. ACTIVACIÓN DE LA MICROGLÍA**

Para analizar la activación de microglía, se cuantificó el área y perímetro de las células marcadas con Iba1, para diferenciar la morfología de la microglía activada y en estado de reposo. La neuroinflamación produce activación microglial, la cual se caracteriza por una morfología ameboide, a diferencia de la microglía en estado de reposo que presenta una mayor ramificación. Se hicieron un mínimo de 8 fotos (56X) y las imágenes fueron analizadas con el programa de análisis de imagen Image J. Los resultados se expresaron como perímetro de las células teñidas con Iba1.

#### **4.2. ACTIVACIÓN DE ASTROCITOS**

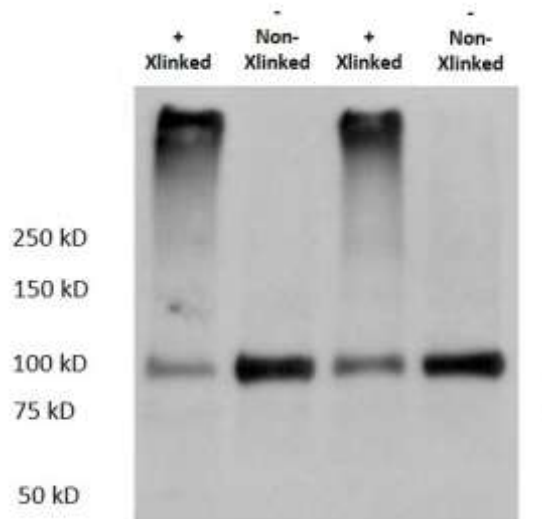
Para el análisis de la activación de astrocitos se cuantificó la expresión de GFAP, ya que la activación de este tipo celular también lleva a cambios morfológicos, pero que en este caso se caracterizan por aumentar el área de las células. Las imágenes fueron analizadas con el programa de análisis de imagen Image J. Los resultados se expresaron como porcentaje del área total teñida por GFAP.

### **5. EXPRESIÓN EN MEMBRANA DE RECEPTORES**

#### **5.1. OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS**

Las ratas fueron sacrificadas mediante decapitación y se extrajo el hipocampo. Éste fue rápidamente sumergido en recipientes con disolución Krebs (en mM: NaCl 119, KCl 2.5, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1, NaHCO<sub>3</sub> 26.2, CaCl<sub>2</sub> 2.5 y glucosa 11, pH 7.4), enfriado en hielo y burbujeando en carbógeno (95% O<sub>2</sub> y 5% de CO<sub>2</sub>), con el fin de mantener el tejido fresco y oxigenado. A continuación, se hicieron cortes transversales de 400 µm de los hipocampos mediante una guillotina Chopper. Durante todo el proceso el tejido se mantuvo en disolución Krebs y burbujeando en carbógeno.

A continuación, los cortes de cada una de las muestras (Control vehículo, Control IL-1Ra, Hiperamonémica vehículo e Hiperamonémica IL-1Ra), se repartieron equitativamente en dos viales, conteniendo Krebs y BS<sup>3</sup> (Bis[sulfosuccinimidyl] suberate) (Pierce, Rockford, IL) disuelto en Krebs, 2 mM respectivamente, y se incubaron en agitación durante 30 minutos a 4 °C. El BS<sup>3</sup> es un crosslinker no permeable que agrega las proteínas de membrana a través de lisinas o del extremo amino terminal de forma estable, por lo que, en la electroforesis, estos agregados de gran tamaño serán incapaces de migrar, de manera que se puede conocer la expresión en membrana de diferentes subunidades de receptores por diferencia entre las bandas obtenidas sin y con BS<sup>3</sup> (Fig. 5). Para detener la reacción del crosslinker antes de homogeneizar en tampón (Tris-HCl 66 mM pH 7.4, SDS 1%, EGTA 1 mM, Glicerol 10%, Leupeptina 0.2 mg/mL, NaF 1 mM, Na orto-vanadato 1 mM), ya que se quiere que agreguen las proteínas de membrana, se añade a cada uno de los viales glicina 100mM en Krebs (relación volumen/volumen muestra 1:1) y se deja incubar durante 10 minutos en agitación y a 4 °C.



**Figura 5. Imagen *western blot* de muestras tratadas con y sin BS<sup>3</sup>.** Los pocillos impares (1 y 3, Xlinked) han sido tratados con BS<sup>3</sup> y pueden verse en la parte superior los agregados proteicos. Mientras, los pocillos pares (2 y 4, non-Xlinked) no han sido tratados con BS<sup>3</sup> (sólo con Krebs), de manera que la banda presente a 100kD corresponde al total de proteínas presentes (tanto de membrana como citoplasmáticas). La diferencia entre la intensidad de banda de las muestras sin BS<sup>3</sup> (proteína total) y con BS<sup>3</sup> (proteína citoplasmática) nos da la cantidad de proteína de membrana. Figura obtenida de Boudreau et al. (2005).

## 5.2. DETERMINACIÓN DE LA CANTIDAD DE PROTEÍNA

La cantidad de proteína en cada una de las muestras se determinó mediante el método colorimétrico basado en el ácido bicinonínico (BCA Protein Assay Kit, Thermo). Para ello se colocaron una curva patrón con BSA (Albúmina de Suero Bovino) y las muestras por duplicado y, una vez preparada la placa con las muestras y la curva patrón, se añadieron los reactivos Pierce® BSA Protein Assay Reagents A y B y se incubó la placa durante 30 minutos a 37 °C.

Finalmente, se midió la absorbancia a 570 nm para interpolar la concentración de proteína en cada muestra respecto de la curva patrón de BSA.

### 5.3. ANÁLISIS DEL CONTENIDO DE PROTEÍNAS TOTAL Y DE MEMBRANA MEDIANTE *WESTERN BLOT*

La técnica empleada para el estudio de la expresión en membrana de los receptores NMDA y AMPA fue el *western blot*.

Esta técnica se basa en la separación de proteínas mediante electroforesis en un gel de poliacrilamida, en este caso al 8%, con SDS (Dodecilsulfato sódico). Las muestras se diluyeron (1:1) en tampón de carga 2x (Tris-HCl 0.5 M a pH 6.8, Glicerol 5%, SDS 10%, 2-Mercaptoetanol 2.5%, Bromofenol 1%) y se hirvieron a 100 °C durante 5 minutos en un termobloque. La cantidad de proteína por muestra varió según la proteína a analizar.

En los geles de poliacrilamida se obtienen dos partes: una parte superior denominada stacking (Tris Base 0.125 M, 0,1% SDS a pH 6.8, Acrilamida 3.9%, Bisacrilamida 0.015%, APS 0,04% y TEMED), que permite la concentración de cada una de las muestras en bandas y una parte inferior, separating (Tris Base 0.4 M, 0.1% SDS, pH a 8.8, Acrilamida 8 %, Bisacrilamida 0.2%, APS 0.04% y TEMED), que separa cada una de las proteínas en función de su masa molecular relativa. La electroforesis se llevó a cabo utilizando geles de 20 o 25 pocillos, en función del número de muestras, usando tampón "running" (Tris Base 0.3%, 0.02% SDS, Glicina 1.5%) y un amperaje constante de 10 mA por gel *overnight*.

Una vez finalizada la electroforesis, se realizó la transferencia, que consiste en pasar las proteínas a una membrana PVDF (activada previamente con metanol), utilizando tampón de transferencia (Tris Base 0.025 M, Glicina 0.05 M) durante 5 horas a una intensidad de corriente de 250 mA.

Una vez realizada la transferencia, las membranas se incubaron durante 45-60 minutos en una solución de leche en polvo al 5% en TBS-Tween (NaCl 0.15 M, Tris Base 50 mM, Tween-20 0.05%, pH 7.4) con el fin de bloquear las proteínas. A continuación, se realizaron cuatro lavados, de 10 minutos cada uno, de las membranas en TBST-Tween y se incubaron las membranas con el anticuerpo primario (Tabla 2) diluido en BSA al 5% en TBST-Tween *overnight*, en agitación y a 4 °C. Nuevamente, se lavaron las membranas durante 10 minutos en TBST-Tween y se incubaron durante 1 hora con el anticuerpo secundario correspondiente conjugado con la fosfatasa alcalina y diluido en BSA al 5%. Sucesivamente, se realizaron otros tres lavados

de las membranas con TBST-Tween y un último lavado con tampón sustrato (NaCl 100 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, Tris-HCl 100 mM a pH= 9.5).

Por último, se revelaron las membranas mediante el método colorimétrico para la fosfatasa alcalina con solución de revelado (NaCl 100 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, Tris-HCl 100 mM, 0.6% stock NBT, 0.35% stock BCIP, pH= 9.5).

Una vez reveladas, las membranas se digitalizaron mediante un escáner *Hewlett Packard Scanjet 5300C* y la intensidad de cada una de las bandas se cuantificó mediante el programa *Alphamager 2200* (AlphaEaseFC 2200 for Windows, Cambridge, UK).

**Tabla 2.** Anticuerpos primarios y secundarios utilizados en *Western Blot*, con sus correspondientes diluciones.

Anticuerpo 1º (casa comercial)	Dilución	Anticuerpo 2º (casa comercial)	Dilución	Peso Molecular Proteína (kDa)
Anti-GluN2A (Millipore)	1:1000	IgG cabra-f.a.* contra IgG conejo (Sigma)	1:4000	170
Anti-GluA1 (Millipore)	1:1000	IgG cabra-f.a.* contra IgG conejo (Sigma)	1:4000	106
Anti-GluA2 (Millipore)	1:2000	IgG cabra-f.a.* contra IgG conejo (Sigma)	1:4000	108
Anti-GluN1 (BD Biosciences)	1:1000	IgG cabra-f.a.* contra IgG conejo (Sigma)	1:4000	115

\*f.a.: Fosfatasa alcalina

## 6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

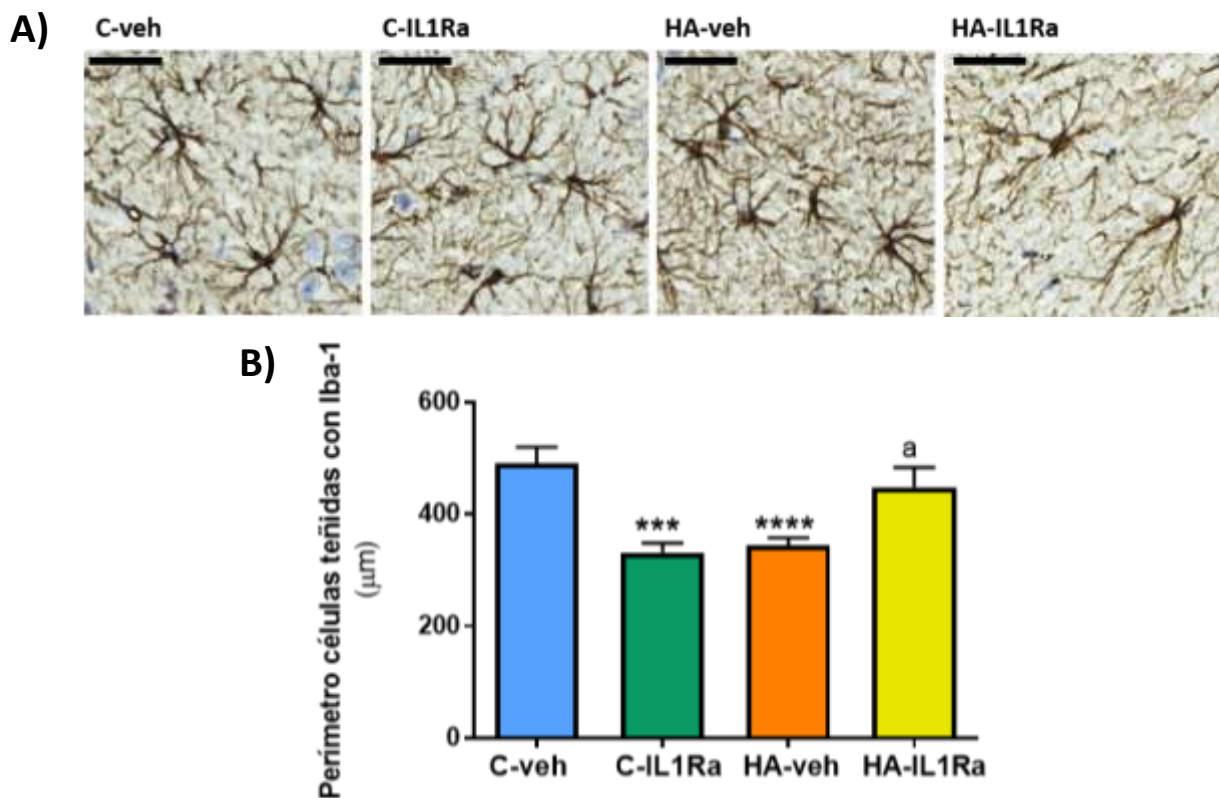
Todos los análisis estadísticos se realizaron con el programa *GraphPad Prism 7* (GraphPad Software, Inc.). En primer lugar, para comprobar la hipótesis nula de que la muestra ha sido extraída de una población con distribución de probabilidad normal se aplicaron los tests de normalidad D'Agostino y Pearson y el de Shapiro-Wilk. A continuación, se aplicó el test de Bartlett para estudiar las diferencias en las varianzas de los datos normalmente distribuidos. Una vez hecho esto, los datos se analizaron mediante un análisis de la varianza paramétrico de dos vías (ANOVA), seguido de la prueba *post hoc* de Bonferroni para estudiar las diferencias entre grupos, es decir, para determinar los efectos individuales y de interacción entre la HA y/o los tratamientos. Se aceptó como significativo un nivel de confianza del 95%.

## RESULTADOS

### 1. ANÁLISIS DE LA NEUROINFLAMACIÓN EN HIPOCAMPO DE RATAS CON HIPERAMONEMIA CRÓNICA. EFECTO DEL TRATAMIENTO CRÓNICO CON IL-1RA.

#### 1.1. ANÁLISIS DE LA ACTIVACIÓN DE LA MICROGLÍA

La HA induce alteración morfológica y de la función de la microglía hacia un estado de microglía reactiva, disminuyendo su perímetro a  $344.3 \pm 13.9 \mu\text{m}$  ( $p\text{-valor} < 0,0001$ ), respecto al grupo control que presenta un perímetro de  $490.6 \pm 29.6 \mu\text{m}$ . Mientras, el tratamiento con IL-1Ra de ratas HA revierte dicha activación microglial, aumentando el perímetro hasta  $448.9 \pm 34.7 \mu\text{m}$  ( $p\text{-valor} < 0,05$ ). El tratamiento con IL-1Ra en ratas control induce activación microglial, disminuyendo el perímetro a  $331.8 \pm 29.63 \mu\text{m}$  ( $p\text{-valor} < 0,001$ ) (Fig. 6).

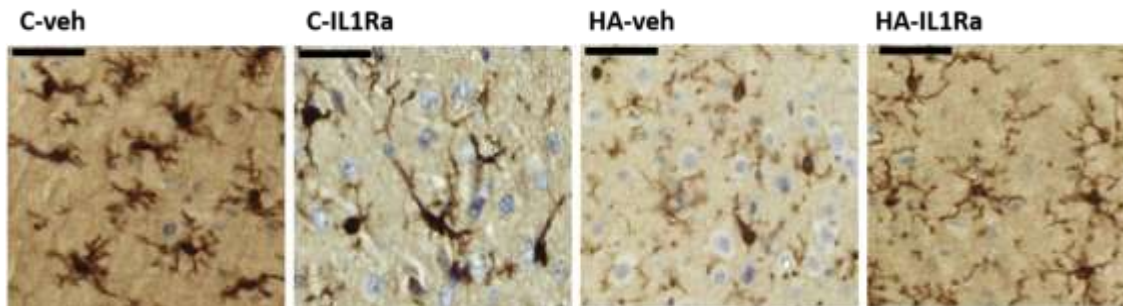


**Figura 6. Análisis de la activación de microglía en hipocampo. A)** Imágenes representativas de microglía marcada con el anticuerpo anti-Iba-1 de ratas control (C) e hiperamionémicas (HA) tratadas con vehículo (veh) o con el antagonista de IL-1 $\beta$  (IL-1Ra). La hiperamionemia induce activación de la microglía que adquiere una morfología menos ramificada, lo cual puede ser revertido con el tratamiento con IL-1Ra. Asimismo, el tratamiento con IL-1Ra en ratas control también induce activación de la microglía. **B) Perímetro de células marcadas con Iba-1.** La hiperamionemia induce activación microglial, lo que se traduce en una disminución del perímetro de las células marcadas con Iba-1 y el tratamiento con IL-1Ra es capaz de revertir dicha activación. Además, el tratamiento con IL-1Ra en ratas control induce activación de la microglía. Los valores son la media  $\pm$  SEM de 4 ratas por cada grupo. Los asteriscos indican diferencia significativa respecto al grupo control vehículo (\*\*\*,  $p\text{-valor} < 0.001$ ; \*\*\*\* $p\text{-valor} < 0.0001$ ) y "a" respecto a las ratas HA vehículo (a,  $p\text{-valor} < 0.05$ ). Se utilizaron un total de 4 ratas por grupo. (Control vehículo: C-veh; Control tratamiento con IL-1Ra: C-IL1Ra; Hiperamionémica vehículo: HA-veh; Hiperamionémica tratamiento con IL-1Ra: HA-IL1Ra).

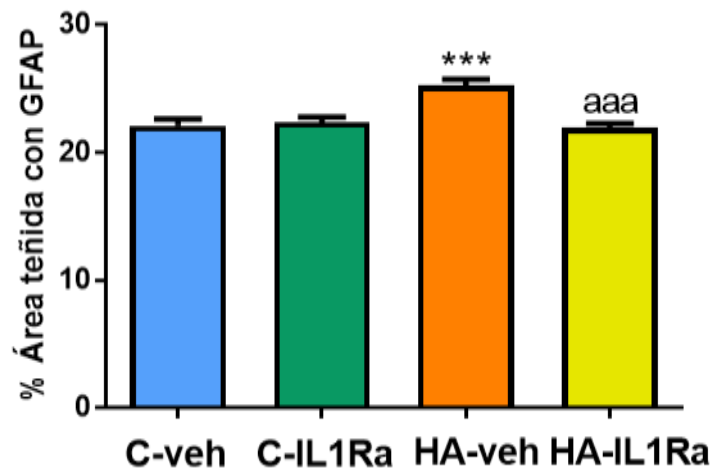
## 1.2. ANÁLISIS DE LA ACTIVACIÓN DE ASTROCITOS

La HA induce activación de astrocitos, que se ve reflejada por un aumento en la expresión de GFAP ( $25.3 \pm 0.48$  %,  $p$ -valor  $< 0.001$ ) respecto al grupo control ( $22.1 \pm 0.5$  %). Esto puede ser revertido con el tratamiento con IL-1Ra, disminuyendo el área teñida con GFAP al  $22 \pm 0,3$  % ( $p$ -valor  $< 0.001$ ). En este caso, el tratamiento con IL-1Ra a ratas control no produce una activación de astrocitos ( $22.4 \pm 0.4$  %).

A)



B)



**Figura 7. Análisis de la activación de astrocitos en hipocampo. A) Imágenes representativas de astrocitos marcados con el anticuerpo anti-GFAP de ratas control (C) e hiperamonémicas (HA) tratadas con vehículo (veh) o con el antagonista de IL-1 $\beta$  (IL-1Ra). B) Porcentaje del área marcada con GFAP. La hiperamonemia induce activación de los astrocitos, lo que se traduce en un aumento del área marcada por GFAP y el tratamiento con IL-1Ra es capaz de revertir dicha activación, disminuyendo, por tanto, el área marcada. El tratamiento con IL-1Ra en ratas control no induce activación de los astrocitos. Los valores son la media  $\pm$  SEM de 4 ratas por cada grupo. Los asteriscos indican diferencia significativa respecto al grupo control vehículo (\*\*\*)  $p$ -valor  $< 0.001$ ) y "a" respecto a las ratas HA vehículo (aaa  $p$ -valor  $< 0.001$ ). Se utilizaron un total de cuatro ratas por grupo. (Control vehículo: C-veh; Control tratamiento con IL-1Ra: C-IL1Ra; Hiperamonémica vehículo: HA-veh; Hiperamonémica tratamiento con IL-1Ra: HA-IL1Ra).**

## 2. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN EN MEMBRANA DE RECEPTORES AMPA Y NMDA

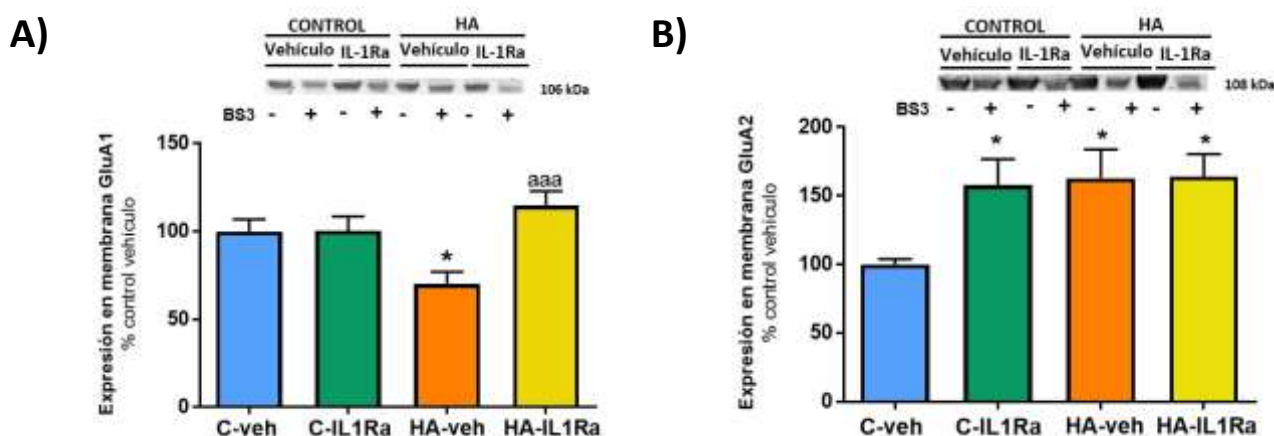
Se ha demostrado que la neuroinflamación altera la expresión en membrana de receptores AMPA y NMDA en hipocampo y, en consecuencia, la función cognitiva en ratas con EH e HA (Hernández-Rabaza et al., 2015, 2016; Cabrera-Pastor et al., 2016). Los resultados anteriores muestran que el antagonista del receptor de IL-1 $\beta$ , IL-1Ra, reduce la neuroinflamación, disminuyendo la activación de la microglía y astrocitos en hipocampo de ratas hiperamonémicas. Por ello, el siguiente paso fue analizar si el receptor de IL-1 $\beta$  estaba asociado con la alteración en la expresión en membrana de las subunidades que componen el receptor AMPA y NMDA.

### 2.1. RECEPTORES AMPA

#### El tratamiento con IL-1Ra es capaz de normalizar la expresión en membrana de la subunidad GluA1, pero no la de GluA2

La HA induce una disminución de la expresión en membrana de la subunidad GluA1 hasta un  $70.2 \pm 6.9\%$  ( $p$ -valor $<0.05$ ) respecto al grupo control vehículo, lo cual es revertido por el tratamiento con IL-1Ra ( $114.7 \pm 8.2\%$ ,  $p$ -valor $<0.001$ ). El tratamiento con IL-1Ra en ratas control no afecta a la expresión de GluA1 (Fig. 8A).

En cuanto a la subunidad GluA2, la HA aumenta la expresión en membrana de dicha subunidad ( $162.9 \pm 20.9\%$ ,  $p$ -valor $<0.05$ , respecto al control vehículo,) y no se ve revertido por el tratamiento con IL-1Ra ( $164.2 \pm 16.14\%$ ,  $p$ -valor $<0.05$ ). En ratas control el tratamiento con IL-1Ra aumenta la expresión en membrana de GluA2 hasta un  $157.8 \pm 19\%$ ,  $p$ -valor $<0.05$  (Fig. 8B).



**Figura 8.** Expresión en membrana receptores AMPA. El tratamiento con IL-1Ra es capaz de revertir la expresión en membrana de GluA1 (A), pero no de GluA2 (B) en ratas con hiperamonemia crónica. Los datos corresponden a la media  $\pm$  el error estándar de 11-26 ratas por grupo y se expresan en porcentaje respecto al control vehículo. Los asteriscos indican diferencia significativa respecto al grupo control vehículo (\*  $p$ -valor $<0.05$ ) y "a" respecto a las ratas HA vehículo (aaa  $p$ -valor $<0.001$ ). (Control vehículo: C-veh; Control tratamiento con IL-1Ra: C-IL1Ra; Hiperamonémica vehículo: HA-veh; Hiperamonémica tratamiento con IL-1Ra: HA-IL1Ra).

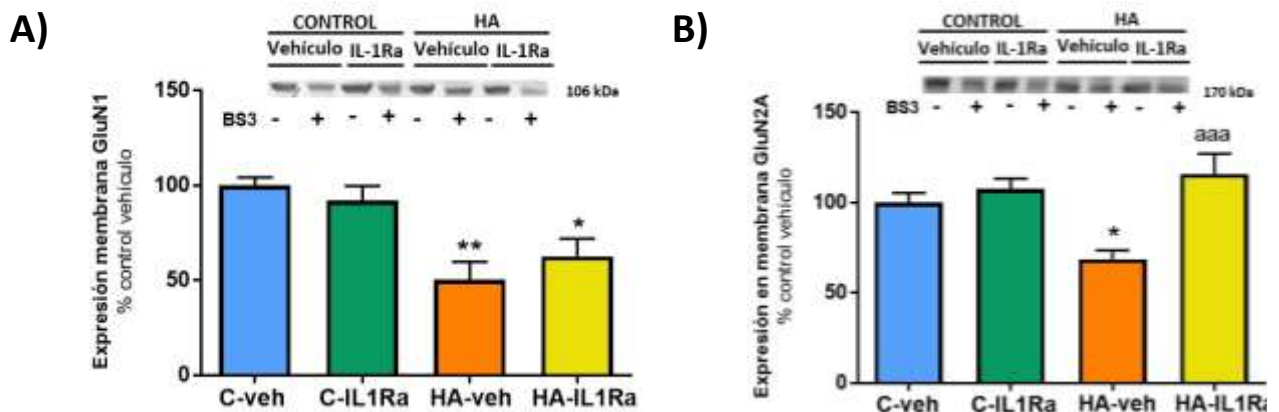


## 2.2. RECEPTORES NMDA

### El tratamiento con IL-1Ra es capaz de normalizar la expresión en membrana de la subunidad GluN2A, pero no la de GluN1

La HA induce una disminución de la expresión de la subunidad GluN1 de los receptores NMDA hasta un  $50.5 \pm 9.3$  % respecto al grupo control vehículo ( $p$ -valor $<0.01$ ), lo cual se normaliza con el tratamiento con IL-1Ra ( $62.7 \pm 9.4$  %,  $p$ -valor $<0.05$ ). Además, si bien el tratamiento de ratas control con IL-1Ra tiende a disminuir la expresión de GluN1, no se obtienen resultados estadísticamente significativos ( $91.9 \pm 7.9$ % respecto al control vehículo) (Fig. 9A).

En el caso de GluN2A, la HA induce una disminución de la expresión en membrana de la subunidad hasta un  $68.8 \pm 4.9$  % respecto al control vehículo, lo cual puede ser revertido mediante el tratamiento con IL-1Ra ( $116 \pm 11.2$  %). Además, cabe mencionar que el tratamiento con IL-1Ra de ratas control no afecta a la expresión en membrana de GluN2A ( $107.7 \pm 5.7$  %) (Fig. 9B).



**Figura 9. Expresión en membrana receptores NMDA. El tratamiento con IL-1Ra es capaz de normalizar la expresión en membrana de GluN2A (B), pero no de GluN1 (A) en ratas con hiperamonemia crónica.** Los datos corresponden a la media  $\pm$  el error estándar de 11-26 ratas por grupo y se expresan en porcentaje respecto al control basal. Los asteriscos indican diferencia significativa respecto al grupo control vehículo (\*  $p$ -valor $<0,05$ ; \*\*  $p$ -valor $<0.01$ ) y "a" respecto a las ratas HA vehículo (aaa  $p$ -valor $<0.001$ ). (Control vehículo: C-veh; Control tratamiento con IL-1Ra: C-IL1Ra; Hiperamonémica vehículo: HA-veh; Hiperamonémica tratamiento con IL-1Ra: HA-IL1Ra).

## 3. EFECTO DEL TRATAMIENTO CON IL-1RA SOBRE LA CAPACIDAD DE APRENDIZAJE Y LA MEMORIA ESPACIAL

Dado que el tratamiento con IL-1Ra reduce la activación de la microglía y de los astrocitos, y la expresión en membrana de algunas subunidades del receptor AMPA y NMDA, el siguiente objetivo fue analizar si revertía el aprendizaje y memoria espacial en ratas con HA crónica.

**El tratamiento con IL-1Ra es capaz de normalizar la memoria de trabajo, pero no el aprendizaje espacial ni la memoria de referencia en ratas con HA crónica**

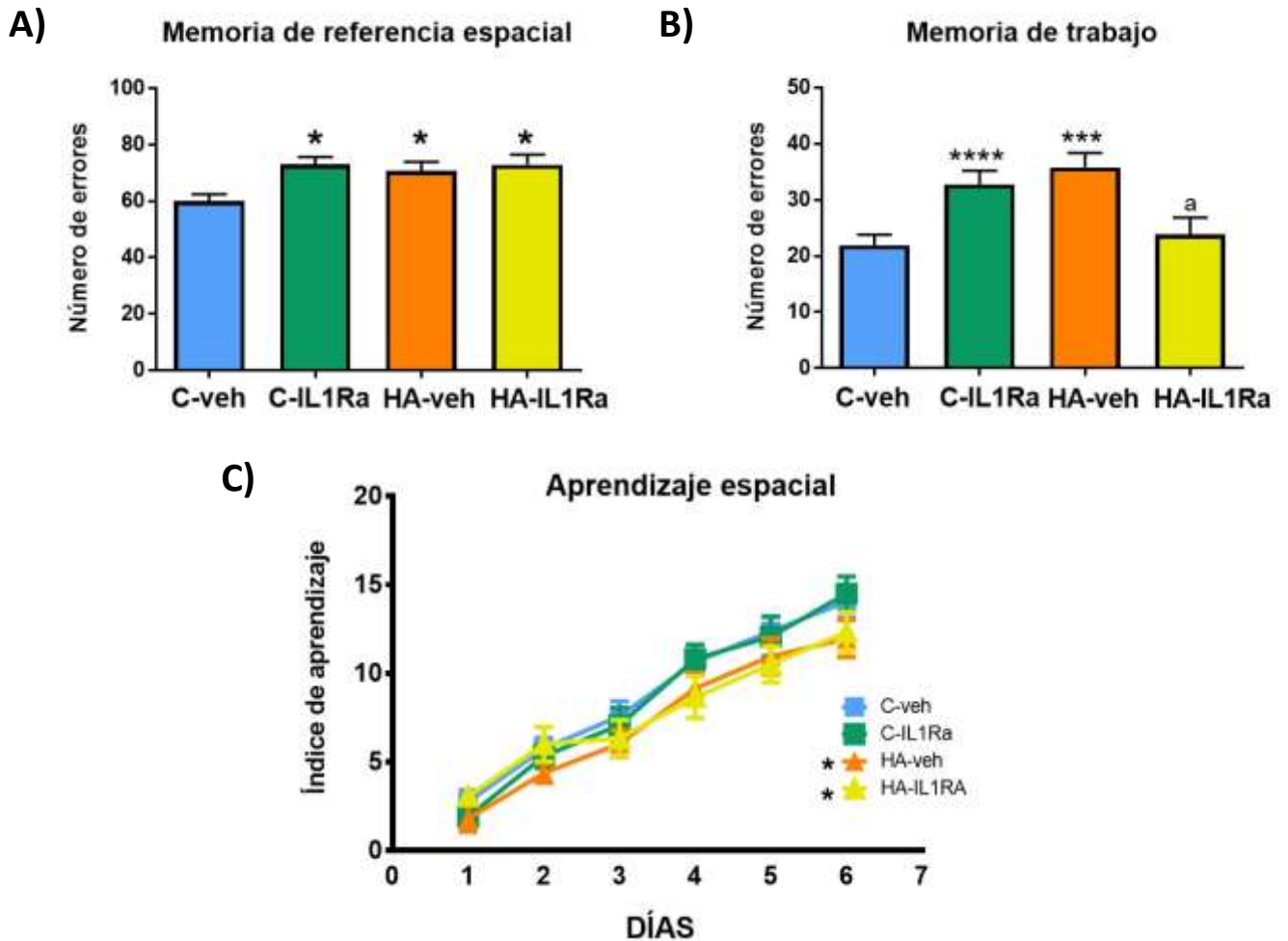
Se analizó el aprendizaje y la memoria de referencia y de trabajo utilizando el test del laberinto radial de ocho brazos.

Las ratas hiperamonémicas cometieron más errores de referencia ( $70.7 \pm 3.2$ ,  $p$ -valor  $< 0.05$ ) que las ratas control ( $60 \pm 2.4$ ) (Figura 10). Sin embargo, el tratamiento con IL-1Ra a ratas hiperamonémicas no es capaz de normalizar el número de errores de referencia ( $72.9 \pm 3.6$ ,  $p$ -valor  $< 0.05$ ) y, además, se ha visto que este mismo tratamiento a ratas controles aumenta el número de errores de referencia ( $73 \pm 2.6$ ,  $p$ -valor  $< 0.05$ ) (Fig. 10A).

Las ratas con HA crónica también cometieron más errores de memoria de trabajo ( $35.8 \pm 2.6$ ,  $p$ -valor  $< 0.001$ ) que las ratas control ( $22 \pm 1.9$ ), indicando una disminución en su memoria espacial (Figura 10B). No obstante, el número de errores de memoria de trabajo pudo revertirse mediante el tratamiento con IL-1Ra ( $23.83 \pm 3$ ,  $p$ -valor  $< 0.05$ ). Además, se vio afectada la memoria de trabajo en ratas control tratadas con IL-1Ra, ya que aumentó el número de errores hasta un  $32.8 \pm 2.5$  ( $p$ -valor  $< 0.001$ ) (Fig. 10B).

Todo esto nos indica que el IL-1Ra es capaz de restaurar la memoria de trabajo en ratas hiperamonémicas, pero que no es capaz de ejercer ningún efecto sobre la memoria de referencia.

El índice de aprendizaje se calcula como la diferencia entre el número de aciertos y errores de referencia espacial. Como se observa en la figura 10C, este índice de aprendizaje va mejorando con el tiempo en los cuatro grupos experimentales y es menor en ratas hiperamonémicas que en ratas control ( $p$ -valor  $< 0.05$ ). El tratamiento con IL-1Ra no es capaz de restaurar la capacidad (el índice) de aprendizaje ( $p$ -valor  $< 0.05$ ) de las ratas hiperamonémicas y tampoco afecta al de las ratas control (Figura 10C). De este modo, podemos decir que el aprendizaje está disminuido en ratas hiperamonémicas respecto a las ratas control y que el tratamiento con IL-1Ra no restaura el índice de aprendizaje en ratas hiperamonémicas y tampoco altera el de las ratas control.



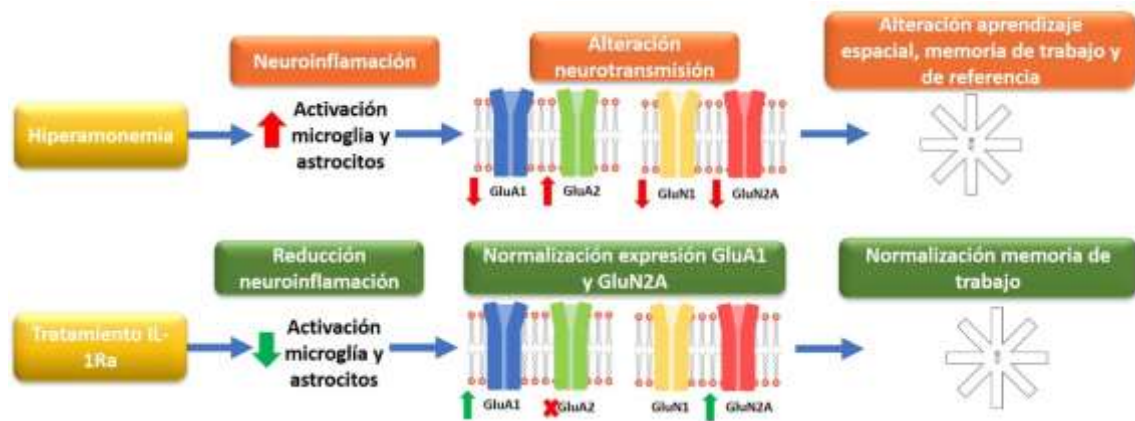
**Figura 10. Memoria de trabajo y aprendizaje y memoria espacial. La administración crónica de IL-1Ra restaura la memoria de trabajo (B), pero no la memoria de referencia (A) ni el índice de aprendizaje (C) en el laberinto radial en ratas hiperamonémicas.** (A) Número de errores de referencia espacial (visitas a brazos sin comida) acumulados durante los seis días de test. (B) Número de errores de memoria de trabajo (visitas a brazos ya visitados en el mismo ensayo) acumulados durante los seis días de test. (C) Índice de aprendizaje de cada día. Los valores son la media  $\pm$  SEM. El número de ratas por grupo fue: C-veh n=14; HA-veh n=13; C-IL1Ra n=14; HA-IL1Ra n=14. Los asteriscos indican diferencia significativa respecto al grupo control vehículo (\*p-valor<0.05; \*\*\*p-valor<0.001, \*\*\*\*p-valor<0.0001) y “a” (p-valor<0.05) indica diferencias respecto al grupo HA vehículo. (Control vehículo: C-veh; Control tratamiento con IL-1Ra: C-IL1Ra; Hiperamonémica vehículo: HA-veh; Hiperamonémica tratamiento con IL-1Ra: HA-IL1Ra).

# DISCUSIÓN

Estudios recientes han demostrado que la inflamación periférica junto con la HA son los principales mecanismos responsables de las alteraciones neurológicas en pacientes con EHM. En modelos animales de EHM se ha demostrado que existe neuroinflamación y que ésta contribuye al deterioro cognitivo y motor (Cauli et al., 2007; Cauli et al., 2009; Rodrigo et al., 2010; Hernández-Rabaza et al., 2016). La neuroinflamación es también uno de los principales factores implicados en el desarrollo de algunas enfermedades neurodegenerativas, como el Alzheimer, Parkinson, esclerosis múltiple, esclerosis lateral amiotrófica y en el deterioro cognitivo que se produce en el envejecimiento (Chen et al., 2016).

Según numerosos trabajos anteriores (Hernández-Rabaza et al., 2015; Hernández-Rabaza et al., 2016; Cabrera-Pastor et al., 2016; Taoro-González et al., 2018), la IL-1 $\beta$  estaría aumentada en hipocampo en condiciones de HA. Además, como aparece en la literatura, la HA crónica induce la activación de microglía y astrocitos, la cual estaría induciendo a su vez una alteración en la expresión en membrana de los receptores AMPA y NMDA y, estas alteraciones, estarían dando lugar a problemas cognitivos y motores.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo reportan una serie de hallazgos (Fig. 11). Vemos cómo en condiciones de HA se produce una disminución tanto del aprendizaje y de la memoria espacial como de la memoria de trabajo. Esto podría estar asociado a la activación de microglía y astrocitos en el hipocampo y, según los resultados, la IL-1 $\beta$  estaría jugando un papel crucial en la activación de la microglía y de los astrocitos. Tanto microglía como astrocitos aumentarían la cantidad de IL-1 $\beta$ , lo que alteraría en última instancia la expresión en membrana de los receptores AMPA y NMDA. En cuanto a los resultados de expresión en membrana, la HA induce una disminución de la expresión en membrana de las subunidades GluA1, GluN1 y GluN2A; mientras que aumenta la expresión de GluA2. La IL-1 $\beta$  sería responsable de las alteraciones observadas en GluA1 y GluN2A, ya que el tratamiento con IL-1Ra revierte su expresión en membrana.



**Figura 11. Modelo propuesto de las alteraciones mediadas por la IL-1 $\beta$  en hiperamonemia crónica.** En hiperamonemia crónica la alteración en la memoria y aprendizaje espacial se asocia con activación de microglía y astrocitos y con la alteración de la expresión en membrana de diferentes subunidades de los receptores AMPA y NMDA. El tratamiento con el antagonista del receptor de la IL-1 $\beta$  (IL-1Ra) normaliza la memoria de trabajo y disminuye la activación de microglía y astrocitos y revierte la expresión en membrana de GluA1 y GluN2A. Las flechas en rojo indican las alteraciones, mientras que las flechas en verde indican normalización de estas alteraciones.

El tratamiento crónico con IL-1Ra, administrado crónicamente vía intracerebral mediante minibombas osmóticas, permite discriminar diferentes vías mediante las cuales la neuroinflamación estaría afectando a diferentes tipos de memoria y al aprendizaje. El IL-1Ra normaliza tanto la activación de la microglía y astrocitos, como la expresión en membrana de la subunidad GluA1 de los receptores AMPA y la subunidad GluN2A de los receptores NMDA y, además, restaura la memoria de trabajo.

En los resultados obtenidos de la activación de microglía y astrocitos, se observa como la HA induce activación tanto de la microglía como de los astrocitos en el hipocampo, algo ampliamente demostrado en la literatura (Hernández-Rabaza et al., 2016), lo cual puede ser revertido mediante el tratamiento con IL-1Ra.

La IL-1 $\beta$  es un potente inductor de la activación de microglía (Basu et al. 2002). Estudios previos han demostrado que el tratamiento intracerebral de IL-1Ra no sólo bloquea la señalización mediada por IL-1 $\beta$ , sino que también disminuye los niveles de expresión de la IL-1 $\beta$  en cerebro (Frank et al., 2012; Lan et al., 2015). Clausen et al. (2016) demuestran, en un modelo de ratón de *stroke*, que la IL-1 $\beta$  y el IL-1Ra pueden ser liberados por diferentes tipos de microglía y que el tratamiento con IL-1Ra puede aumentar la producción microglial de IL-1Ra y reducir los niveles cerebrales de IL-1 $\beta$ , probablemente inhibiendo las células de microglía que liberan IL-1 $\beta$ . Este podría ser un posible mecanismo por el cual el tratamiento con IL-1Ra disminuye la activación de la microglía en ratas hiperamonémicas. Por otra parte, se ha descrito que en hipocampo de ratas hiperamonémicas, la IL-1 $\beta$  se expresa en astrocitos activados (Cabrera-Pastor et al., 2016) de manera que, al administrar un antagonista de su receptor, el IL-1Ra,

podría estar disminuyendo la señalización mediada por IL-1 $\beta$  e induciendo una disminución de la activación astrocítica.

Además, cabe mencionar que el papel neuroprotectivo de IL-1Ra a nivel de la activación de microglía se ha demostrado en diferentes estudios (Oprica et al., 2003; Hailer et al., 2005).

En astrocitos, como han reportado numerosos estudios (Moynagh, 2005), la IL-1 $\beta$  estaría activando a NF $\kappa$ B. NF $\kappa$ B existe en el citosol de las células en reposo como un homodímero o heterodímero de proteínas de la familia *Rel* de factores de transcripción (Blank et al., 1992; Narayanan et al., 1993). La actividad transcripcional de las proteínas *Rel* está estrictamente regulada por su asociación con miembros de la familia de moléculas inhibidoras I $\kappa$ B (Baeuerle and Baltimore, 1988). Las isoformas más ampliamente caracterizadas son I $\kappa$ B- $\alpha$ , I $\kappa$ B- $\beta$  e I $\kappa$ B- $\epsilon$  (Thanos and Maniatis, 1995). Estas proteínas secuestran a NF $\kappa$ B en el citosol enmascarando su señal de localización nuclear (NLS) y, también su dominio de unión, evitando que se una al DNA. La exposición de las células a IL-1 causaría la fosforilación de I $\kappa$ B en dos serinas N-terminales específicas por las I $\kappa$ B-quinasas (IKK), IKK $\alpha$  e IKK $\beta$ , que se activan mediante una ruta compleja de transducción de señales (May and Ghosh, 1998). La fosforilación de las proteínas I $\kappa$ B representa una señal para la conjugación de ubiquitina, seguida de su degradación a través del proteosoma 26S (Traenckner et al., 1994). Esto permite la translocación de NF $\kappa$ B al núcleo, donde activa las regiones promotoras de genes, especialmente las que codifican proteínas proinflamatorias tales como moléculas de adhesión y quimiocinas (Beg et al., 1993; Henkel et al., 1993). Curiosamente, se ha demostrado que la activación de NF $\kappa$ B se mantiene en astrocitos en respuesta a la estimulación con IL-1 (Bourke et al., 2000) de manera que, la activación sostenida de NF $\kappa$ B daría lugar a la inducción de moléculas de adhesión de leucocitos y quimiocinas (Bourke and Moynagh, 1999) que facilitan el reclutamiento de leucocitos y culminaría con la generación de estados neuropatológicos. Así, la activación sostenida de NF $\kappa$ B estaría conduciendo a un estado inflamatorio crónico, y el tratamiento crónico con IL-1Ra mediante minibombas osmóticas podría estar regulando la vía de NF $\kappa$ B en astrocitos y, por tanto, disminuyendo su activación.

En ratas control, el tratamiento con IL-1Ra induce activación de microglía, lo cual se podría asociar con una disminución en la memoria de referencia y de trabajo. Esto concuerda con estudios que muestran que los niveles fisiológicos de IL-1 $\beta$  y de IL-1Ra juegan un papel fundamental en la formación de la memoria (Schneider et al., 1998; Yirmiya et al., 2002; Depino et al., 2004; Spulber et al., 2009).

En cuanto a la expresión en membrana, cabe destacar que la expresión en membrana de los receptores AMPA y NMDA es clave en el proceso de LTP que, a su vez, es crucial para la memoria y el aprendizaje (Anggono and Huganir, 2012; Lorenz-Guertin and Jacob, 2017). Se sabe que tanto la expresión en membrana de estos receptores como su función se encuentran alteradas en presencia de neuroinflamación y, más concretamente, debido al aumento de la cantidad de IL-1 $\beta$  (Lai et al., 2006; Viviani et al., 2007; Wang et al., 2012). Dado que estas alteraciones en la expresión en membrana en el hipocampo son un factor clave, implicado en el deterioro cognitivo en ratas con EH e HA (Hernández-Rabaza et al., 2015; Hernández-Rabaza et al., 2016; Cabrera-Pastor et al., 2016), se piensa que un mecanismo plausible por el cual se produce el deterioro en la memoria espacial, de trabajo y de reconocimiento en ratas hiperamonémicas sería el aumento en los niveles de IL-1 $\beta$ .

El presente trabajo demuestra que el tratamiento intracerebral crónico con IL-1Ra restaura la expresión en membrana de dos de las cuatro subunidades cuya expresión se ve alterada en el hipocampo de ratas hiperamonémicas: la subunidad GluN2A del receptor NMDA y la subunidad GluA1 del receptor AMPA. Sin embargo, no es capaz de restaurar la expresión en membrana de la subunidad GluN1 y tampoco normaliza la expresión en membrana de la subunidad GluA2 del receptor AMPA. De este modo, queda claro que la IL-1 $\beta$  juega un papel crucial en la regulación de los patrones de expresión en membrana de los receptores NMDA y AMPA en el hipocampo de modelos animales de EH, al menos en el caso de las subunidades GluA1 y GluN2A. Esto concuerda con los resultados obtenidos *in vitro* en cultivos de neuronas hipocámpicas en presencia de IL-1 $\beta$ , donde se veía que los altos niveles de esta citoquina proinflamatoria alteraban la fosforilación y expresión en membrana de los receptores AMPA y NMDA. Otros estudios también han demostrado que la IL-1 $\beta$  disminuye la expresión en membrana de receptores AMPA, efecto que puede ser revertido mediante el tratamiento con IL-1Ra (Lai et al., 2006).

Monfort et al. (2007) estudiaron la expresión de los receptores AMPA y NMDA en homogenados de hipocampo de ratas PCS, concluyendo que, pese a que no existía un cambio en la cantidad total de receptores, sí se reducía la expresión en membrana de las distintas subunidades (GluN1, GluN2A, GluN2B, GluA1 y GluA2) en presencia de fallo hepático crónico. Además, se ha encontrado en homogenados de hipocampo de rata que, en condiciones de HA, se produce una disminución de la subunidad GluN2A (Llansola et al., 2016), así como de la subunidad GluN1 (Yonden et al., 2010). Algo que fue corroborado más tarde en ratas PCS por Hernandez-Rabaza et al. (2015), quienes demostraron que el tratamiento con sildenafil, un

inhibidor de la fosfodiesterasa 5, normaliza *in vivo* los niveles de IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$ , reestableciendo así la expresión en membrana de los receptores AMPA, NMDA y GABA.

Así pues, el presente trabajo pone de manifiesto, dados los resultados obtenidos del tratamiento con IL-1Ra en ratas con HA crónica, que la IL-1 $\beta$  es una citoquina clave entre la neuroinflamación y la alteración de la neurotransmisión. No obstante, los mecanismos moleculares implicados todavía están por esclarecer.

Cabe recordar que los cambios en la expresión en membrana de receptores pueden ser debidos a múltiples factores. Sin embargo, estudios anteriores apuntan que los cambios en el tráfico de receptores a la membrana pueden ser cruciales y que modificaciones postraduccionales, especialmente la fosforilación, juegan un papel esencial. Por ejemplo, se ha descrito que la fosforilación de los residuos de serina S890, S896 y S897 de la subunidad GluN1 regulan su translocación a la membrana. Siendo la proteína quinasa C (PKC) la responsable de la fosforilación de las S890 y 896 y la proteína quinasa AMPc – dependiente (PKA) la responsable de la fosforilación de S897. Así, la fosforilación de S896 y S897 promueven la salida de la subunidad GluN1 del retículo endoplásmico hacia la membrana (Scott et al., 2003; Traynelis et al., 2010), mientras que la fosforilación de S890 imposibilita la formación de *clusters* de GluN1 en la membrana (Tingley et al., 1997). En el caso de GluN2B es la fosforilación de la tirosina Y1472 la que bloquea la unión de la proteína AP-2, previniendo la endocitosis del receptor y aumentando así su expresión en membrana (Lavezzari et al., 2003; Prybylowski et al., 2005). Sin embargo, la fosforilación de este residuo puede ser prevenida por la fosforilación de S1480 por parte de la caseína quinasa 2, promoviendo su internalización (Sanz-Clemente et al., 2010). En el caso de GluN2A se ha visto (Grau et al., 2014) que la fosforilación del extremo C-terminal del residuo S1048 por la kinasa Dyrk1a dificulta su endocitosis, aumentando de esta forma la expresión en membrana de GluN2A. En cuanto a los receptores AMPA, Taoro-González et al. (2018) demostraron los mecanismos por los que la IL-1 $\beta$  y la activación de su receptor disminuyen la fosforilación por la PKC $\zeta$ , de la subunidad GluA2 en el residuo Ser880, lo que aumenta su expresión en membrana y la fosforilación en el residuo Ser831 de GluA1 por la CaMKII, lo que disminuye su expresión en membrana. Así, los cambios observados en la expresión en membrana de las distintas subunidades de los receptores AMPA y NMDA podrían ser debidas a modificaciones postraduccionales, como la fosforilación, que alteren el tráfico a la membrana celular de dichas subunidades.

En cuanto a los resultados obtenidos en los tests de comportamiento, vemos como la HA crónica altera tanto el aprendizaje espacial como la memoria de referencia y de trabajo. Esto se



asocia con la activación tanto de la microglía como de los astrocitos en el hipocampo, así como a una mayor cantidad de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  y a la alteración de la expresión de la membrana de los receptores AMPA y NMDA (Cabrera-Pastor et al., 2016). Concretamente, en condiciones de HA se produce un aumento de la expresión de IL-1 $\beta$  en astrocitos, siendo la IL-1 $\beta$  procedente de la microglía, la que modula tanto el tráfico como la función de los receptores NMDA en las neuronas del hipocampo (Viviani et al., 2006). Además, se sabe que los receptores AMPA del hipocampo son los responsables de la modulación de la memoria de trabajo, pero no de la memoria de referencia. Por ejemplo, estudios llevados a cabo con ratones *knock-out* para GluA1 han demostrado que esta subunidad es esencial para la LTP hipocampal y la memoria de trabajo espacial, pero no para la memoria de referencia espacial (Reisel et al., 2002; Sanderson et al., 2010). Sin embargo, dado que estos ratones tienen una depleción completa en la subunidad GluA1, no es posible saber en qué área es especialmente importante la expresión de esta subunidad. Sin embargo, un estudio posterior llevado a cabo por Freudenberg et al. (2013), en el que se suprimió selectivamente la expresión de GluA1 en el hipocampo, demostró que GluA1 es crucial para la memoria de trabajo. Más tarde, se vio (Xie et al., 2015) que la disminución de la expresión en membrana de GluA1 está relacionada con déficits en la memoria de trabajo asociada a la privación del sueño. Todo esto concuerda con los resultados obtenidos en el presente trabajo, en el que se observa que las ratas hiperamonémicas muestran una disminución de la expresión en membrana de la subunidad GluA1 y que el tratamiento crónico intracerebral con IL-1Ra es capaz de revertir dicha alteración; de manera que las alteraciones en la expresión de la membrana de GluA1 podrían ser el mecanismo por los cuales la IL-1 $\beta$  altera la memoria de trabajo en ratas hiperamonémicas. De hecho, varios estudios han demostrado que los receptores AMPA son cruciales para la memoria de trabajo, pero no para la memoria espacial ni para la memoria de referencia (Reisel et al., 2002; Schmitt et al., 2003; Shimshek et al., 2006; Sanderson et al., 2011) que, como se ha demostrado en otros estudios (Cabrera-Pastor et al., 2016) podrían depender de los niveles de TNF- $\alpha$ .

En cuanto a la subunidad GluA2, Shimshek et al. (2006) demostraron que la depleción de esta subunidad no afecta a la LTP, pero si altera la neurotransmisión en el hipocampo y la memoria de trabajo espacial. Sin embargo, los ratones *knock-out* para GluA2 lograron aprender (aunque de manera más lenta que los ratones control) tareas de referencia espacial. No obstante, según nuestros resultados, la HA estaría induciendo alteraciones en la expresión en membrana de GluA2 en el hipocampo por mecanismos independientes a la IL-1 $\beta$ , ya que el tratamiento con IL-1Ra no consigue normalizar su expresión en membrana, por lo que no parece estar relacionado con alteraciones en la memoria de trabajo.

Los receptores NMDA, como se ha comentado anteriormente son esenciales para la LTP en el hipocampo. Bannerman et al. (2008) demostraron que ratones *knock-out* para GluN2A presentan alterada la memoria de trabajo, pero no la memoria espacial. Esto coincide con los resultados obtenidos en este trabajo, en los que se observa que ratas hiperamonémicas presenta una disminución de la expresión en membrana de GluN2A, la cual puede ser revertida con el tratamiento con IL-1Ra. Por tanto, las alteraciones observadas en la expresión en membrana de GluN2A, junto con las de GluA1 (comentadas anteriormente en este mismo apartado), que son producidas por el aumento de la cantidad de IL-1 $\beta$ , parecen ser el mecanismo por el cual se producen las alteraciones en la memoria de trabajo en ratas hiperamonémicas sin fallo hepático.

En lo referente a GluN1, numerosos estudios han demostrado que juega un importante papel en la memoria de trabajo. Por ejemplo, Niewoehner et al. (2007) demostraron que ratones carentes de GluN1 presentan alterada la memoria de trabajo, pero no la memoria de referencia espacial. No obstante, estos resultados parecen contradictorios, ya que en este trabajo se ve cómo las alteraciones observadas en la memoria de trabajo pueden ser revertidas con el tratamiento con IL-1Ra, que consigue revertir la expresión en membrana de GluA1 y GluN2A, sin llegar a normalizar la expresión en membrana de GluN1.

## **CONCLUSIONES**

- El tratamiento crónico con IL-1Ra induce activación de la microglía, pero no de astrocitos; aumenta la expresión en membrana de las subunidades GluA2 y GluN2A; y altera tanto la memoria de referencia espacial, como la memoria de trabajo en ratas control.
- La HA induce tanto activación de astrocitos como de microglía, lo cual puede ser revertido mediante el tratamiento con IL-1Ra.
- La HA disminuye la expresión en membranas de GluA1, GluN1 y GluN2A y aumenta la de GluA2. El tratamiento crónico con IL-1Ra normaliza la expresión en membrana de GluA1 y GluN2A.
- La HA disminuye tanto el aprendizaje espacial, como la memoria de referencia y de trabajo, siendo este último tipo de memoria normalizado con el tratamiento crónico con IL-1Ra
- Las alteraciones en la neurotransmisión glutamatérgica y en la memoria de trabajo, observadas en condiciones de HA crónica, podrían estar mediadas por el aumento de IL-1 $\beta$ , ya que pueden ser revertidas con el tratamiento crónico con IL-1Ra.

# BIBLIOGRAFÍA

- Aguilar, M.A., Miñarro, J. and Felipo, V. (2000). Chronic moderate hyperammonemia impairs active and passive avoidance behavior and conditional discrimination learning in rats. *Experimental Neurology*. **161**, 704-713.
- Aldridge, D.R., Tranah, E.J. and Shawcross, D.L. (2015). Pathogenesis of Hepatic Encephalopathy: Role of Ammonia and Systemic Inflammation. *Journal of Clinical and Experimental Hepatology*. **5**(Suppl 1), S7-S20.
- Aloisi, F. (2001). Immune function of microglia. *Glia*. **36**(2), 165-79.
- Anggono, V. and Huganir, R.L. (2012). Regulation of AMPA Receptor Trafficking and Synaptic Plasticity. *Current Opinion in Neurobiology*. **22**(3), 461-469.
- Azorin, I., Minana, M.D., Felipo, V. and Grisolia, S. (1989). A simple animal model of hyperammonemia. *Hepatology*. **10**, 311-314.
- Bachmann, C. (2002). Mechanisms of hyperammonemia. *Clin Chem Lab Med*. **40**(7), 653-62.
- Baeuerle, P.A. and Baltimore, D. (1988). I kappa B: a specific inhibitor of the NF-kappa B transcription factor. *Science*. **242**, 540-546.
- Bannerman, D.M., Niewoehner, B., Lyon, L., Romberg, C., Schmitt, W.B., Taylor, A., et al. (2008). NMDA receptor subunit NR2A is required for rapidly acquired spatial working memory but not incremental spatial reference memory. *J Neurosci*. **28**(14), 3623-30.
- Barnes, C.A., Rao, G. and McNaughton, B.L. (1996). Functional integrity of NMDA-dependent LTP induction mechanisms across the lifespan of F-344 rats. *Learn Mem*. **3**(2-3), 124-137.
- Basu, A., Krady, J.K., Enterline, J.R. and Levison, S.W. (2002). Transforming growth factor beta1 prevents IL-1beta-induced microglial activation, whereas TNFalpha- and IL-6-stimulated activation are not antagonized. *Glia*. **40**(1), 109-20.
- Beg, A.A., Finco, T.S., Nantermet, P.V. and Baldwin, A.S. (1993) Tumor necrosis factor and interleukin-1 lead to phosphorylation and loss of I kappa B alpha: a mechanism for NF-kappa B activation. *Mol Cell Biol*. **13**(6), 3301-3310.
- Bellinger, F.P., Madamba, S. and Siggins, G.R. (1993). Interleukin 1 $\beta$  inhibits synaptic strength and long-term potentiation in the rat CA1 hippocampus. *Brain Res*. **628**(1-2), 227- 234.
- Bengtsson, F., Nobin, A., Falck, B., Gage, F.H. and Jeppsson, B. (1986). Portacaval shunt in the rat: selective alterations in behavior and brain serotonin. *Pharmacol Biochem Behav*. **24**, 1611-1616.
- Bentivoglio, M., Mariotti, R. and Bertini, G. (2011). Neuroinflammation and brain infections: historical context and current perspectives. *Brain Res Rev*. **66**(1-2), 152-73.
- Bird, C.M. and Burgess, N. (2008). The hippocampus and memory: insights from spatial processing. *Nat Rev Neurosci*. **9**(3), 182-94.

- Blank, V., Kourilsky, P. and Israel, A. (1992). NF- $\kappa$ B and related proteins: Rel/dorsal homologues meet ankyrin-like repeats. *Trends Biochem Sci.* **17**(4), 135-140.
- Boudreau, A.C. and Wolf, M.E. (2005). Behavioral sensitization to cocaine is associated with increased AMPA receptor surface expression in the nucleus accumbens. *J Neurosci.* **25**(40), 9144-51.
- Bourke, E. and Moynagh, P.N. (1999) Antiinflammatory effects of glucocorticoids in brain cells, independent of NF-kappa B. *J Immunol.* **163**(4), 2113-2119.
- Bourke, E., Kennedy, E.J. and Moynagh, P.N. (2000). Loss of Ikappa Bbeta is associated with prolonged NF-kappa B activity in human glial cells. *J Biol Chem.* **275**(51), 39996-40002
- Cabrera-Pastor, A. (2014). Modulación de la vía Glu-NO-GMPc y del aprendizaje por GMPc extracelular en el cerebelo. Mecanismos moleculares implicados. Alteraciones en modelos animales de hiperamonemia y encefalopatía hepática.
- Cabrera-Pastor, A., Llansola, M., Reznikov, V., Boix, J. and FELIPO, V. (2012). Differential effects of chronic hyperammonemia on modulation of the glutamate-nitric oxide-cGMP pathway by metabotropic glutamate receptor 5 and low and high affinity AMPA receptors in cerebellum in vivo. *Neurochem Int.* **61**(1), 63-71
- Cabrera-Pastor, A., Hernandez-Rabaza, V., Taoro-Gonzalez, L., Balzano, T., Llansola, M. and Felipo, V. (2016). In vivo administration of extracellular cGMP normalizes TNF- $\alpha$  and membrane expression of AMPA receptors in hippocampus and spatial reference memory but not IL-1 $\beta$ , NMDA receptors in membrane and working memory in hyperammonemic rats. *Brain Behav Immun.* **57**, 360-370.
- Cauli, O., Rodrigo, R., Llansola, M., Montoliu, C., Monfort, P., Piedrafita, B., et al. (2009). Glutamatergic and gabaergic neurotransmission and neuronal circuits in hepatic encephalopathy. *Metab. Brain Dis.* **24**(1), 69–80.
- Cauli, O., Rodrigo, R., Piedrafita, B., Boix, J. and Felipo, V. (2007). Inflammation and hepatic encephalopathy: ibuprofen restores learning ability in rats with portacaval shunts. *Hepatology.* **246**(2), 514-9.
- Chen, W.W., Zhang, X. and HUANG, W.J. (2016). Role of neuroinflammation in neurodegenerative diseases (Review). *Molecular Medicine Reports.* **13**(4), 3391–3396.
- Chung, Y.C., Ko, H.V., Bok, E., Park, E.S., Huh, S.H., Nam, J.H., et al. (2010). The role of neuroinflammation on the pathogenesis of Parkinson's disease. *BMB Rep.* **43**(4), 225-32.
- Clausen, B.H., Lambertsen, K.L., Dagnæs-Hansen, F., Babcock, A.A., von Linstow, C.U., Meldgaard, M., et al. (2016). Cell therapy centered on IL-1Ra is neuroprotective in experimental stroke. *Acta Neuropathologica.* **131**, 775-791.
- Conn, H.O. (1993). Hepatic encephalopathy. In: Schiff L., Schiff E.R. (eds). *Diseases of the Liver.* 7<sup>th</sup> ed, Vol 2, pp. 1036–1060. J.B. Lippincott Company, Philadelphia.
- Cunningham, A.J., Murray, C.A., O'Neill, L.A.J., Lynch, M.A. and O'Connor, J.J. (1996). Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) and tumour necrosis factor (TNF) inhibit long-term potentiation in the rat dentate gyrus in vitro. *Neurosci. Lett.* **203**(1), 17-20.

- Deng, W., Aimone, J.B. and Gage, F.H. (2010). New neurons and new memories: how does adult hippocampal neurogenesis affect learning and memory? *Nature reviews Neuroscience*. **11**(5), 339-350.
- Depino, A.M., Alonso, M., Ferrari, C., del Rey, A., Anthony, D., Besedovsky, H., et al. (2004). Learning modulation by endogenous hippocampal IL-1: blockade of endogenous IL-1 facilitates memory formation. *Hippocampus*. **14**(4), 526-35.
- Diamond, D.M., Park, C.R., Campbell, A.M. and Woodson, J.C. (2005). Competitive interactions between endogenous LTD and LTP in the hippocampus underlie the storage of emotional memories and stress-induced amnesia. *Hippocampus*. **15**(8), 1006-1025.
- Erceg, S., Monfort, P., Hernández-Viadel, 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), 299-306.
- Farina, C., Aloisi, F. and Meinl, E. (2007). Astrocytes are active players in cerebral innate immunity. *Trends Immunol*. **28**(3), 138-145.
- Farrar, W.L., Hill, J.M., Harel-Bellan, A. and Vinocour, M. (1987). The immunological brain. *Immunol Rev*. **100**, 361-378.
- Felipo, V. (2013). Hepatic encephalopathy: effects of liver failure on brain function. *Nat. Rev. Neurosci*. **14**(12), 851-858.
- Felipo, V., Minana, M.D. and Grisolia, S. (1988). Long-term ingestion of ammonium increases acetylglutamate and urea levels without affecting the amount of carbamoylphosphate synthase. *Eur J Biochem*. **176**(3), 567-571.
- Frank, M.G., Barrientos, R.M., Thompson, B.M., Weber, M.D., Watkins, L.R. and Maier, S.F. (2012). IL-1RA injected intra-cisterna magna confers extended prophylaxis against lipopolysaccharide-induced neuroinflammatory and sickness responses. *Journal of Neuroimmunology*. **252**(1-2), 33-39.
- Freudenberg, F., Marx, V., Seeburg, P.H., Sprengel, R. and Celikel, T. (2013) Circuit mechanisms of GluA1-dependent spatial working memory. *Hippocampus*. **23**(12), 1359-1366.
- Grau, C., Arató, K., Fernández-Fernández, J.M., Valderrama, A., Sindreu, C., Fillat, C., et al. (2014). DYRK1A-mediated phosphorylation of GluN2A at Ser1048 regulates the surface expression and channel activity of GluN1/GluN2A receptors. *Frontiers in Cellular Neuroscience*. **8**, 331.
- Hailer, N.P., Vogt, C., Korf, H.W. and Dehghani, F. Interleukin-1beta exacerbates and interleukin-1 receptor antagonist attenuates neuronal injury and microglial activation after excitotoxic damage in organotypic hippocampal slice cultures. *Eur J Neurosci*. **21**(9), 2347-60.
- Henkel, T., Machleidt, T., Alkalay, I., Kronke, M., Ben-Neriah, Y. and Baeuerle, P.A. (1993). Rapid proteolysis of I kappa B-alpha is necessary for activation of transcription factor NF-kappa B. *Nature*. **365**(6442), 182-185.
- Hernandez-Rabaza, V., Agusti, A., Cabrera-Pastor, A., Fustero, S., Delgado, O., Taoro-Gonzalez, L., et al. (2015). Sildenafil reduces neuroinflammation and restores spatial learning in rats with hepatic encephalopathy: underlying mechanisms. *Journal of Neuroinflammation*. **12**, 195.

- Hernandez-Rabaza, V., Cabrera-Pastor, A., Taoro-Gonzalez, L., Gonzalez-Usano, A., Agusti, A., Balzano, T., et al. (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**, 83.
- Hernandez-Rabaza, V., Cabrera-Pastor, A., Taoro-Gonzalez, L., Malaguarnera, M., Agusti, A., Llansola, M., et al. (2016). Hyperammonemia induces glial activation, neuroinflammation and alters neurotransmitter receptors in hippocampus, impairing spatial learning: reversal by sulforaphane. *J Neuroinflamm*. **13**, 41.
- Hernandez-Viadel, M., Montoliu, C., Monfort, P., Canales, J.J., Erceg, S., Rowan, M., et al. (2003). Chronic exposure to 2,5-hexanedione impairs the glutamate-nitric oxide-cyclic GMP pathway in cerebellar neurons in culture and in rat brain in vivo. *Neurochem Int*. **42**, 525-533.
- Jayakumar, A.R., Rama Rao, K.V. and Norenberg, M.D. (2015). Neuroinflammation in Hepatic Encephalopathy: Mechanistic Aspects. *Journal of Clinical and Experimental Hepatology*. **5**(Suppl 1), S21–S28.
- Kandel, E.R. (2000). Principles of neural science. Ed 4. McGraw-Hill, New York, NY. u.a.
- Kaplan, P.W. and Rossetti AO. (2011). EEG patterns and imaging correlations in encephalopathy: encephalopathy part II. *J Clin Neurophysiol*. **28**, 233-51
- Katsuki, H., Nakai, S., Hirai, Y., Akaji, K., Kiso, Y. and Satoh, M. (1990). Interleukin-1 $\beta$  inhibits long-term potentiation in the CA3 region of mouse hippocampal slices. *Eur. J. Pharmacol*. **181**, 323-326.
- Kessels, R.P., de Haan, E.H., Kappelle, L.J. and Postma, A. (2001). Varieties of human spatial memory: a meta-analysis on the effects of hippocampal lesions. *Brain Res Brain Res Rev*. **35**(3), 295-303.
- Koehl, M. and Abrous, D.N. (2011). A new chapter in the field of memory: adult hippocampal neurogenesis. *Eur J Neurosci*. **33**(6), 1101-14.
- Kountouras, J., Billing, B.H. and Scheuer, P.J. (1984). Prolonged bile duct obstruction: a new experimental model for cirrhosis in the rat. *Br J Exp Pathol*. **65**, 305-311.
- Lai, A.Y., Swayze, R.D., El-Husseini, A. and Song, C. (2006). Interleukin-1 beta modulates AMPA receptor expression and phosphorylation in hippocampal neurons. *J Neuroimmunol*. **175**(1-2), 97-106.
- Lan, K.M., Tien, L.T., Pang, Y., Bhatt, A.J. and Fan, L.W. (2015). IL-1 receptor antagonist attenuates neonatal lipopolysaccharide-induced long-lasting learning impairment and hippocampal injury in adult rats. *Toxicology Letters*. **234**(1), 30-39.
- Lavezzari, G., McCallum, J., Lee, R. and Roche, K.W. (2003). Differential binding of the AP-2 adaptor complex and PSD-95 to the C-terminus of the NMDA receptor subunit NR2B regulates surface expression. *Neuropharmacology*. **45**(6), 729-37.
- Liu, S.J. and Cull-Candy, S.G. (2005). Subunit interaction with PICK and GRIP controls Ca<sup>2+</sup> permeability of AMPARs at cerebellar synapses. *Nature neuroscience*. **8**(6), 768-775.

- Llansola, M., Rodrigo, R., Cauli, O. and Felipo, V. (2006). Differential alterations of glutamate receptors in different brain areas in chronic hyperammonemia. *FENS Forum Abstracts*.
- Lorenz-Guertin, J.M. and Jacob, T.C. (2018). GABA type a receptor trafficking and the architecture of synaptic inhibition. *Dev Neurobiol.* **78**(3), 238-270.
- Machado, I., Schiöth, H.B., Lasaga, M. and Scimonelli, T. (2018). IL-1 $\beta$  reduces GluA1 phosphorylation and its surface expression during memory reconsolidation and  $\alpha$ -melanocyte-stimulating hormone can modulate these effects. *Neuropharmacology.* **128**, 314-23.
- Martin, S.J., Grimwood, P.D. and Morris, R.G. (2000). Synaptic plasticity and memory: an evaluation of the hypothesis. *Annu. Rev. Neurosci.* **23**, 649-711.
- May, M.J. and Ghosh, S. (1998). Signal transduction through NF-kappa B. *Immunol Today.* **19** (2), 80–88.
- Méndez, M., Méndez-López, M., López, L., Aller, M.A., Arias, J., Cimadevilla, J.M., et al. (2007). Spatial memory alterations in three models of hepatic encephalopathy. *Behav Brain Res.* **188**(1), 32-40.
- Monfort, P. (2007). Chronic liver failure in rats impairs glutamatergic synaptic transmission and long-term potentiation in hippocampus and learning ability. *Eur J Neurosci.* **25**(7), 2103-2111.
- Monfort, P., Erceg, S., Piedrafita, B., Llansola, M. and Felipo, V. (2007). Chronic liver failure in rats impairs glutamatergic synaptic transmission and long-term potentiation in hippocampus and learning ability. *European Journal of Neuroscience.* **25**(7), 2103-2111.
- Monfort, P., Muñoz, M.D., ElAyadi, A., Kosenko, E. and Felipo, V. (2002). Effects of hyperammonemia and liver disease on glutamatergic neurotransmission. *Metab Brain Dis.* **17**(4), 237–250.
- Montoliu, C., Llansola, M. and Felipo, V. (2015). Neuroinflammation and neurological alterations in chronic liver diseases. *Review Neuroimmunology and inflammation.* **55**(1-3), 106- 112.
- Montoliu, C., Piedrafita, B., Serra, M.A., del Olmo, J.A., Urios, A., Rodrigo, J.M., et al. (2009). IL-6 and IL-18 in blood may discriminate cirrhotic patients with and without minimal hepatic encephalopathy. *J Clin Gastroenterol.* **43**(3), 272-9.
- Moser, E.I., Moser, M.B. and Andersen, P. (1994). Potentiation of dentate synapses initiated by exploratory learning in rats: dissociation from brain temperature, motor activity, and arousal. *Learn Mem.* **1**(1), 55-73.
- Moynagh, P.N. (2005). The interleukin-1 signalling pathway in astrocytes: a key contributor to inflammation in the brain. *Journal of Anatomy.* **207**(3), 265-269.
- Narayanan, R., Higgins, K.A., Perez, J.R., Coleman, T.A. and Rosen, C.A. (1993). Evidence for differential functions of the p50 and p65 subunits of NF-kappa B with a cell adhesion model. *Mol Cell Biol.* **13**, 3802-3810.
- Niciu, M.J., Kelmendi, B. and Sanacora, G. (2012). Overview of Glutamatergic Neurotransmission in the Nervous System. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior.* **100**(4), 656-664.
- Niewoehner, B., Single, F.N., Hvalby, Ø., Jensen, V., Meyer zum Alten Borgloh, S., Seeburg, P.H., et al. (2007). Impaired spatial working memory but spared spatial reference memory following



- functional loss of NMDA receptors in the dentate gyrus. *The European Journal of Neuroscience*. **25**(3), 837-846.
- Oprica, M., Eriksson, C. and Schultzberg, M. (2003) Inflammatory mechanisms associated with brain damage induced by kainic acid with special reference to the interleukin-1 system. *J. Cell Mol. Med.* **7**, 127-140.
- Parnet, P., Amindari, S., Wu, C., Brunke-Reese, D., Goujon, E., Weyhenmeyer, J.A., et al. (1994). Expression of type I and type II interleukin-1 receptors in mouse brain. *Mol. Brain Res.* **27**, 63-70.
- Phear E., Sherlock S. and Summerskill W. (1955). Blood ammonium levels in liver disease and hepatic coma. *Lancet*. **7**, 836-840.
- Phillips G., Schwartz R., Gabuzda G. and Davidson C. (1952). The syndrome of impending hepatic coma in patients with cirrhosis of the liver given certain nitrogenous substances. *N Engl J Med*. **247**, 239-246.
- Prybylowski, K., Chang, K., Kan, L., Vicini, S. and Wenthold, R.J. (2005). The synaptic localization of NR2B-containing NMDA receptors is controlled by interactions with PDZ proteins and AP-2. *Neuron*. **47**(6), 845–857.
- Purves, D., Augustine, G.J., Fitzpatrick, D., Hall, W., Lamantia, A., Mcnamara, W., et al. (2004). *Neuroscience*. Ed Sinauer Associates, Inc. Sanderland, MA (USA).
- Reisel, D., Bannerman, D.M., Schmitt, W.B., Deacon, R.M., Flint, J., Borchardt, T., et al. Spatial memory dissociations in mice lacking GluR1. *Nat Neurosci*. **5**(9), 868-73.
- Ren, K. and Torres, R. (2009). Role of interleukin-1 $\beta$  during pain and inflammation. *Brain Research Reviews*. **60**(1), 57–64.
- Ridley, R.M. and Baker, H.F. (1997). Evidence for a specific information processing deficit in monkeys with lesions of the septo-hippocampal system. *Cortex*. **33**(1), 167-176.
- Rodrigo, R. and Felipe, V. (2007). Control of brain glutamine synthesis by NMDA receptors. *Front Biosci*. **12**, 883-890.
- Rodrigo, R., Cauli, O., Gomez-Pinedo, U., Agusti, A., Hernandez-Rabaza, V., García-Verdugo, J.M., et al. (2010). Hyperammonemia induces neuroinflammation that contributes to cognitive impairment in rats with hepatic encephalopathy. *Gastroenterology*. **139**(2), 675-84.
- Rodrigo, R., Erceg, S., Rodriguez-Diaz, J., Saez-Valero J, Piedrafita B, Suarez, I., et al. (2007). Glutamate-induced activation of nitric oxide synthase is impaired in cerebral cortex in vivo in rats with chronic liver failure. *J Neurochem*. **102** (1), 51-64.
- Rodrigo, R., Jover, R., Candela, A., Compan, A., Saez-Valero, J., Erceg, S., et al. (2005). Bile duct ligation plus hyperammonemia in rats reproduces the alterations in the modulation of soluble guanylate cyclase by nitric oxide in brain of cirrhotic patients. *Neuroscience*. **130**, 435-443.
- Rodrigo, R., Cauli, O., Gomez-Pinedo, U., Agusti, A., Hernandez-Rabaza, V., Garcia-Verdugo, J.M., et al. (2010). Hyperammonemia induces neuroinflammation that contributes to cognitive impairment in rats with hepatic encephalopathy. *Gastroenterology*. **139**(2), 675-684.

- Rothwell, N.J. and Hopkins, S.J. (1995). Cytokines and the nervous system II: Actions and mechanisms of action. *Trends Neurosci.* **18**(3), 130-136.
- Salonen, V., Kallinen, S., Lopez-Picon, F.R., Korpi, E.R., Holopainen, I.E. and Uusi-Oukari, M.. (2006). AMPA/kainate receptor-mediated up-regulation of GABAA receptor delta subunit mRNA expression in cultured rat cerebellar granule cells is dependent on NMDA receptor activation. *Brain Res.* **1087**(1), 33-40.
- Sanderson, D.J., Sprengel, R., Seeburg, P.H. and Bannerman, D.M. (2011). Deletion of the GluA1 AMPA receptor subunit alters the expression of short-term memory. *Learning & Memory.* **18**(3), 128-131.
- Sanz-Clemente, A., Matta, J.A., Isaac, J.T.R. and Roche, K.W. (2010). Casein Kinase 2 Regulates the NR2 Subunit Composition of Synaptic NMDA Receptors. *Neuron.* **67**(6), 984-996.
- Schmitt, W.B., Deacon, R.M., Seeburg, P.H., Rawlins, J.N. and Bannerman, D.M. (2003). A within-subjects, within-task demonstration of intact spatial reference memory and impaired spatial working memory in glutamate receptor-A-deficient mice. *J Neurosci.* **23**(9), 3953-9.
- Schneider, H., Pitossi, F., Balschun, D., Wagner, A., del Rey, A. and Besedovsky, H.O. (1998). A neuromodulatory role of interleukin-1beta in the hippocampus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**(13), 7778-7783.
- Schneider, H., Pitossi, F., Balschun, D., Wagner, A., del Rey, A. and Besedovsky, H.O. (1998). A neuromodulatory role of interleukin-1 $\beta$  in the hippocampus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* **95**(13), 7778-7783.
- Scott, D.B., Blanpied, T.A. and Ehlers, M.D. (2003) Coordinated PKA and PKC phosphorylation suppresses RXR-mediated ER retention and regulates the surface delivery of NMDA receptors. *Neuropharmacology.* **45**(6), 755-67.
- Segarra, E. (2006). Fisiología de los Aparatos y Sistemas. Ed. Universidad de Cuenca. Cuenca. 461 pp.
- Shawcross D.L., Sharifi Y., Canavan J.B., Yeoman, A.D., Abeles, R.D., Taylor, N.J., et al. (2011). Infection and systemic inflammation, not ammonia, are associated with Grade 3/4 hepatic encephalopathy, but not mortality in cirrhosis. *J Hepatol.* **54**(4), 640-649.
- Shimshek, D.R., Bus, T., Grinevich, V., Single, F.N., Mack, V., Sprengel, R., et al. Impaired reproductive behavior by lack of GluR-B containing AMPA receptors but not of NMDA receptors in hypothalamic and septal neurons. *Mol Endocrinol.* **20**(1), 219-31.
- Sigurdsson, T., Doyere, V., Cain, C.K. and LeDoux, J.E. (2007). Long-term potentiation in the amygdala: a cellular mechanism of fear learning and memory. *Neuropharmacology.* **52**(1), 215-227.
- Soriano Mas, C. (2007). Fundamentos de neurociencia, Ed 1. UOC (Universitat Oberta de Catalunya), Spain.
- Spulber, S., Bartfai, T. and Schultzberg, M. (2009). IL-1/IL-1ra balance in the brain revisited - evidence from transgenic mouse models. *Brain Behav Immun.* **23**(5), 573-9.
- Squire, L.R. and Zola-Morgan, S. (1991). The medial temporal lobe memory system. *Science.* **253**, 1380-1386.

- Steindl, P.E., Coy, D.L., Finn, B., Zee, P.C. and Blei, A.T. (1996). A low-protein diet ameliorates disrupted diurnal locomotor activity in rats after portacaval anastomosis. *Am J Physiol.* **271**, G555-560.
- Taoro-Gonzalez, L., Arenas, Y.M., Cabrera-Pastor, A. and Felipo, V. (2018). Hyperammonemia alters membrane expression of GluA1 and GluA2 subunits of AMPA receptors in hippocampus by enhancing activation of the IL-1 receptor: underlying mechanisms. *Journal of Neuroinflammation.* **15**, 36.
- Thanos, D. and Maniatis, T. (1995). NF-kappa B: a lesson in family values. *Cell.* **80**(4), 529-532.
- Tingley, W.G., Ehlers, M.D., Kameyama, K., Doherty, C., Ptak, J.B., Riley, C.T., et al. (1997). Characterization of protein kinase A and protein kinase C phosphorylation of the N-methyl-D-aspartate receptor NR1 subunit using phosphorylation site-specific antibodies. *J Biol Chem.* **272**(8), 5157-66.
- Traenckner, E.B., Wilk, S. and Baeuerle, P.A. (1994). A proteasome inhibitor prevents activation of NF-kappa B and stabilizes a newly phosphorylated form of I kappa B-alpha that is still bound to NF-kappa B. *EMBO J.* **13**, 5433-5441.
- Traynelis, S.F., Wollmuth, L.P., McBain, C.J., Menniti, F.S., Vance, K.M., Ogden, K.K., et al. (2010). Glutamate Receptor Ion Channels: Structure, Regulation and Function. *Pharmacological Reviews.* **62**(3), 405-96.
- Traynelis, S.F., Wollmuth, L.P., McBain, C.J., Menniti, F.S., Vance, K.M., Ogden, K.K., et al. (2010). Glutamate Receptor Ion Channels: Structure, Regulation, and Function. *Pharmacological Reviews.* **62**(3), 405-496.
- Tsuitsui, H., Cai, X. and Lai, S.H. (2015). Interleukin-1 Family Cytokines in Liver Diseases. *Mediators of Inflamm.* **2015**, 630265.
- Viviani, B., Gardoni, F. and Marinovich, M. (2007). Cytokines and neuronal ion channels in health and disease. *Int Rev Neurobiol.* **82**, 247-63.
- Wang, L., Liu, Z., Li, Y., Pappan, L., Galliher-Beckley, A. and Shi, J. (2012). Pro-inflammatory cytokine interleukin-1 $\beta$  promotes the development of intestinal stem cells. *Inflamm Res.* **61**(10), 1085-92.
- Wang, R. and Spelke, E. (2002). Human spatial representation: insights from animals. *Trends Cogn Sci.* **6**(9), 376.
- Waxman, E.A., Bacongus, I., Lynch, D.R. and Robinson, M.B. (2007). N-methyl-D-aspartate receptor-dependent regulation of the glutamate transporter excitatory amino acid carrier 1. *Journal of Biological Chemistry.* **282**(24), 17594-17607.
- Xie, M., Yan, J., He, C., Yang, L., Tan, G., Li, C., et al. (2015). Short-term sleep deprivation impairs spatial working memory and modulates expression levels of ionotropic glutamate receptor subunits in hippocampus. *Behav Brain Res.* **286**, 64-70.
- Xin, W.K., Kwan, C.L., Zhao, X.H., Xu, J., Ellen, R.P., McCulloch, C.A., et al. (2005). A functional interaction of sodium and calcium in the regulation of NMDA receptor activity by remote NMDA receptors. *J Neurosci.* **25**(1), 139-48.

- Yirmiya, R., Winocur, G. and Goshen, I. (2002). Brain interleukin-1 is involved in spatial memory and passive avoidance conditioning. *Neurobiol Learn Mem.* **78**(2), 379-89.
- Yonden, Z., Aydin, M., Kilbas, A., Demirin, H., Sutcu, R. and Delibas, N. (2010). Effects of ammonia and allopurinol on rat hippocampal NMDA receptors. *Cell Biochem Funct.* **28**(2), 159-63.
- Zhang, L.J., Zheng, G., Zhang, L., Zhong, J., Wu, S., Qi, R., et al. (2012). Altered brain functional connectivity in patients with cirrhosis and minimal hepatic encephalopathy: a functional MR imaging study. *Radiology.* **265**(2), 528-36.