

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA
AGRONÒMICA I DEL MEDI NATURAL



PRINCIPE FELIPE
CENTRO DE INVESTIGACION

*Análisis de la expresión en membrana
de receptores ionotrópicos de
glutamato y GABA en cerebelo.
Alteraciones en modelos animales de
encefalopatía hepática*

TRABAJO FIN DE GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

ALUMNO/A: Ricardo Santamaría Adame

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

Curso Académico: 2014/2015

VALENCIA, Julio de 2015



ALUMNO: Ricardo Santamaría Adame

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

FECHA: Valencia, Julio de 2015

TÍTULO: Análisis de la expresión en membrana de receptores ionotrópicos de glutamato y GABA en cerebelo. Alteraciones en modelos animales de encefalopatía hepática

RESUMEN

La encefalopatía hepática (EH) es un síndrome neuropsiquiátrico complejo que puede presentarse en pacientes con enfermedades hepáticas crónicas o agudas. Se caracteriza por una progresiva alteración de las funciones cognitivas, motoras y del sueño como consecuencia del fallo hepático y puede progresar en diferentes estadios hasta el coma y la muerte. Los mecanismos que conducen a las alteraciones neurológicas en la EH todavía no están bien establecidos pero comienzan a identificarse en modelos animales (Felipo V., Nature Reviews Neuroscience, 2013). La hipótesis más aceptada actualmente acerca de las bases neurobiológicas de la EH apuntan a una combinación sinérgica de dos factores: la elevada concentración de amonio o hiperamonemia, debida a la deficiente eliminación en el hígado de esta toxina y la neuroinflamación. Estos dos factores conducen a alteraciones en la neurotransmisión glutamatérgica y GABAérgica que son responsables del deterioro cognitivo y motor. Uno de los mecanismos que podría contribuir a la alteración de la neurotransmisión es un cambio en la expresión en membrana de receptores de los neurotransmisores glutamato y GABA. El presente trabajo pretende analizar cómo afecta la EH a la expresión en membrana, en cerebelo, de receptores ionotrópicos (NMDA, AMPA y GABA) implicados en procesos de aprendizaje y memoria, así como de los transportadores encargados de retirar el neurotransmisor glutamato de la hendidura sináptica tras su liberación.

Se utilizarán cortes de cerebelo ex vivo de diferentes modelos animales de EH para estudiar la posible alteración de la expresión en membrana de dichos receptores y su implicación en el deterioro cognitivo y motor.

PALABRAS CLAVE: Encefalopatía hepática, hiperamonemia, transportadores de glutamato, receptores ionotrópicos, NMDA, AMPA, GABA, expresión en membrana.

STUDENT: Ricardo Santamaría Adame

PROFESSORS: Dra. Andrea Cabrera Pastor y Dr. Vicente Felipo

DATE: July 2015, Valencia

TITLE: Analysis of membrane expression of ionotropic glutamate and GABA receptors in cerebellum. Alterations in animal models of hepatic encephalopathy

ABSTRACT

Hepatic encephalopathy is a complex neuropsychiatric syndrome that can occur in patients with acute or chronic liver disease. It is characterized by a progressive alteration of cognitive, motor and sleep as a result of liver failure functions and can progress at different stages to coma and death. The mechanisms leading to neurological disorders in HE are not yet well established but begin to identify in animal models (Felipo V., Nature Reviews Neuroscience, 2013). The most widely accepted about the neurobiological basis of HE hypothesis point to a synergistic combination of two factors: the high concentration of ammonium or hyperammonemia due to poor elimination in the liver of this toxin and neuroinflammation. These two factors lead to abnormalities in glutamatergic and GABAergic neurotransmission are responsible for cognitive and motor impairment. One of the mechanisms that could contribute to impaired neurotransmission is a change in expression of membrane receptors for the neurotransmitters glutamate and GABA. This paper analyzes how HE affects the membrane expression, in cerebellum, of ionotropic receptors (NMDA, AMPA and GABA) involved in learning and memory as well as transporters responsible for removing the neurotransmitter glutamate of the synaptic cleft after his release.

We will be used slices of cerebellum *ex vivo* in different animal models of HE to study the possible alteration of the membrane expression of these receptors and their involvement in cognitive and motor impairment.

KEY WORDS: Hepatic encephalopathy, hyperammonemia, glutamate transporters, ionotropic receptors, NMDA, AMPA, GABA, membrane expression.

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría dedicar especialmente este trabajo, que tantas horas me ha costado, a la persona que más lo ha sufrido todo este tiempo, tanto en los buenos como en los peores y más estresantes momentos. Sí, te lo dedico especialmente a ti, Andrea, por estar siempre a mi lado.

Sin embargo, sería injusto no compartir este agradecimiento con quien, sin duda, han sido igual de importantes. A mis padres, a quien debo todo lo que he conseguido hasta ahora. Y a mis abuelos, todos, quienes cada uno a su modo también me han ayudado en todo lo que ha estado en sus manos.

También quiero acordarme de mis compañeros, especialmente de quienes han estado cerca de mí estos últimos meses, que me hayan dado el empujón moral que quizás también necesitaba.

Por último, agradecer al laboratorio de Neurobiología del Centro de Investigaciones Príncipe Felipe, especialmente a Lucas y Andrea, que me han enseñado todo lo que por ahora se, que me hayan concedido la oportunidad de trabajar con ellos.

ÍNDICE

1- INTRODUCCIÓN	1
1.1 Encefalopatía Hepática	1
1.2 Modelos Animales	2
1.3 Principales factores que contribuyen a la EH.....	3
1.4 Neurotransmisión y su relación con la EH.....	4
1.4.1 Neurotransmisión glutamatérgica.....	4
1.4.2 Neurotransmisión GABAérgica	7
1.4.3 Alteración de la neurotransmisión en la EH.....	8
1.5 Estado actual y terapias emergentes.....	10
2- OBJETIVOS	12
3- MATERIALES Y MÉTODOS	13
3.1 Modelos Animales	13
3.2 Obtención de las muestras.....	13
3.3 Tratamiento de las muestras	13
3.4 Determinación de la cantidad de proteína	15
3.5 Análisis del contenido de proteínas totales y de membrana por Western-Blot ...	15
3.6 Análisis estadísticos.....	17
4- RESULTADOS Y DISCUSIÓN	18
4.1 Expresión en membrana de transportadores y receptores ionotrópicos de glutamato y GABA en modelo de hiperamonemia crónica sin fallo hepático en condiciones basales	18
4.1.1 La expresión en membrana basal de las subunidades (NR1, NR2A, GluR1 y GluR2) de receptores ionotrópicos de glutamato está disminuida en hiperamonemia crónica.....	18
4.1.2 La expresión en membrana basal de la subunidad GABA α 1 del receptor GABA está disminuida en hiperamonemia crónica.....	22
4.1.3 La expresión en membrana de los transportadores de glutamato GLT-1 y EAAC1 está disminuida en condiciones basales de hiperamonemia crónica	23

4.2. Expresión en membrana del transportador de glutamato EAAC1 tras la activación del receptor AMPA a diferentes dosis y tiempos de incubación con un agonista.....	25
4.2.1 El tratamiento con AMPA altera la expresión en membrana del transportador EAAC1 observándose un efecto dosis y un efecto tiempo	26
5- CONCLUSIONES	31
6- BIBLIOGRAFÍA	32

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Subunidades de los distintos receptores ionotrópicos.....	8
Tabla 2. Anticuerpos primarios y secundarios utilizados con su correspondiente dilución.	16

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Vía Glutamato-Óxido Nítrico-GMPcíclico	6
Figura 2. Sistema de perfusión.	14
Figura 3. Representación de un Western-Blot con BS₃.....	17
Figura 4. La expresión basal en membrana de las subunidades NR1 (a) y NR2A (b) está disminuida en cerebelo de ratas hiperamonémicas.....	18
Figura 5. La expresión en membrana de las subunidades GluR1 (a) y GluR2 (b) está disminuida en cerebelo de ratas hiperamonémicas.....	19
Figura 6. La expresión en membrana de la subunidad GABAα1 está disminuida en cerebelo de ratas hiperamonémicas en condiciones basales.....	22
Figura 7. La expresión basal en membrana de los transportadores de glutamato EAAC1 (a) y Glt-1 (b) está disminuida en cerebelo de ratas hiperamonémicas.....	24
Figura 8. Resumen de las alteraciones de la expresión en membrana de los receptores NMDA, AMPA y GABA y de los transportadores de glutamato EAAC1 y Glt-1 en ratas con hiperamonemia crónica	25
Figura 9. Expresión en membrana de EAAC1 tras la activación del receptor AMPA a diferentes dosis y tiempo en ratas control e hiperamonémicas	27
Figura 10. Resumen de la expresión en membrana del transportador EAAC1 tras la activación del receptor AMPA en ratas control	28
Figura 11. Resumen de la expresión en membrana del transportador EAAC1 tras la activación del receptor AMPA en ratas hiperamonémicas	29

Abreviaturas

EH: Encefalopatía Hepática

EHM: Encefalopatía Hepática Mínima

PHES: Psychometric Hepatic Encephalopathy Score

ISHEn: International Society for Hepatic Encephalopathy and Nitrogen Metabolism

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

TNF α : Factor Necrosis Tumoral α

AINE: Antiinflamatorio no esteroideo

GABA: ácido γ -aminobutírico

EAAT: Transportador de aminoácidos excitadores (Excitatory Amino Acid Transporter)

GLAST: Transportador Glutamato Aspartato (GLutamate ASpartate Transporter)

Glit-1: Transportador de glutamato glial 1 (Glial glutamate transporter 1)

EAAC1: Transportador de aminoácidos excitatorios 1 (Excitatory Amino Acid Carrier 1)

iGluR: Receptor de glutamato ionotrópico

NMDA: N-metil-D-aspartato

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

GMP: Guanosín monofosfato

GMPc: Guanosín monofosfato cíclico

CAMKII: protein quinasa dependiente de calcio/calmodulina

NOS: Óxido Nítrico Sintasa

CM: Calmodulina

NO: Óxido Nítrico

GC: Guanilato Ciclasa

LTP: Potenciación a Largo Plazo

Na⁺: Ion Sodio

Ca²⁺: Ion Calcio

SNr: Substancia nigra pars reticulata

Cl: Ion Cloro

mRNA: Ácido Ribonucleico mensajero

LTD: Depresión a Largo Plazo

p/p: Porcentaje en peso

M: Molar

mM: miliMolar

NaCl: Cloruro de Sodio

KCl: Cloruro de Potasio

KH₂PO₄: Fosfato de Monopotasio

NaHCO₃: Bicarbonato de Sodio

O₂: Oxígeno

CO₂: Dióxido de Carbono

µm: micrómetros

Tris: Tris(hidroximetil)aminometano

HCl: Ácido Clorhídrico

SDS: Dodecilsulfato de Sodio

EGTA: Etilen Glicol Ácido Tetraacético

NaF: Fluoruro de Sodio

APS: Persulfato de Amonio

TEMED: Tetrametiletilenediamina

TBS: Tris-buffered saline

MgCl₂: Cloruro de Magnesio

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

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

BS³: Bis[sulfosuccinimidyl] Suberate

BCA: Ácido Bicinconínico

BSA: Albúmina de Suero Bovino

nm: nanómetros

°C: Grados Centígrados

µg: microgramos

mA: miliAmperios

PVDF: Polifluoruro de Vinilideno

f.a.: fosfatasa alcalina

ANOVA: Análisis de la Varianza

SEM: Error Estándar de las Medias

PKC: Proteína Quinasa C

PKA: Proteína Quinasa AMPc-dependiente

AMPc: Adenosín Monofosfato cíclico

1- INTRODUCCIÓN

1.1 Encefalopatía Hepática

El hígado es el principal órgano encargado de la detoxificación de sustancias nocivas del organismo, haciendo que un fallo en su funcionamiento normal provoque una eliminación deficiente. Uno de estos compuestos, el amonio, es producto de la degradación de proteínas y otras moléculas y, en condiciones normales, el hígado es capaz de regular su concentración gracias a su incorporación en el ciclo de la urea. Sin embargo, en casos de fallo hepático, se acumulará a altas concentraciones en sangre y tejidos provocando un estadio de hiperamonemia, que conducirá a un deterioro de la función del sistema nervioso central.

Este estado de fallo hepático e hiperamonemia daña la función cerebral dando como resultado diversos síntomas neuropsiquiátricos que, en su conjunto, reciben el nombre de Encefalopatía Hepática (EH).

La EH se caracteriza por una progresiva alteración de las funciones cognitivas, motoras y del sueño, pudiendo progresar hasta el coma y la muerte. Se pueden distinguir dos tipos principales: (i) EH aguda, debido a un fallo hepático agudo y caracterizado por una rápida progresión de los síntomas, y (ii) EH crónica, debida a un fallo hepático crónico asociado a una cirrosis, hepatitis o hipertensión portal. Además, existe una forma no clínica más leve y temprana de la enfermedad, la Encefalopatía Hepática Mínima (EHM). La EHM cursa con alteraciones en la actividad y coordinación motora, función cognitiva y ciclo de 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).

Dado que pacientes sin síntomas evidentes de EH clínica pueden presentar diversas alteraciones atribuidas a la forma mínima de la enfermedad (EHM), y que éstos no pueden ser detectados en un examen neurológico estándar, se ha llegado al consenso de utilizar como batería de referencia para detectar la EHM, la batería de test psicométricos PHES (*Psychometric Hepatic Encephalopathy Score*) (Weissenborn et al, 2001)

La incidencia del fallo hepático agudo (menor de 10 casos por millón de personas al año), comparada con la incidencia de enfermedades hepáticas crónicas (se estima que entre el 0.5-0.9% de la población padece alguna, lo que supondría entre 5.3 y 9.5 millones de personas sólo en Europa y Estados Unidos), sumado a que entre el 35-50% de las personas afectadas de cirrosis desarrollan la enfermedad, la EH crónica cobra una importancia especial. La EH crónica

se desarrolla lentamente y con distintos grados sintomáticos. Éstos varían desde ligeros déficits de atención, cambios de personalidad, enlentecimiento psicomotor y falta de atención durante la etapa mínima de la enfermedad (EHM), bradiquinesia ya con EH clínica, avanzando con desorientación, comportamiento extraño y, por último, estupor y coma en sus fases finales. Debido al amplio espectro clínico, la gravedad de la EH clínica se clasifica en 4 grados según los criterios de West Haven (Conn y Lieberthal, 1979).

1.2 Modelos Animales

Para poder avanzar en el estudio de la enfermedad sin necesidad de recurrir a pacientes con los que sería imposible satisfacer las necesidades requeridas, la búsqueda de un modelo animal adecuado es fundamental. El modelo escogido debe de satisfacer ciertos aspectos para ser adecuado, principalmente que las alteraciones en los pacientes sean reproducibles en el modelo animal. Además, se valora el tamaño por cuestiones de estabulación, la velocidad de crecimiento, el precio total tanto de obtención como de mantenimiento, etc.

La International Society for Hepatic Encephalopathy and Nitrogen Metabolism (ISHEN) señala a las ratas como el modelo animal más frecuentemente utilizado para el estudio de la EH. Las razones principales son la gran cantidad de literatura en las bases de datos, la alta disponibilidad de anticuerpos comerciales contra proteínas de rata y lo económico en cuanto a costes y espacio (Butterworth et al. 2009)

Actualmente se utilizan distintos modelos de EH crónica:

- Hiperamonemia crónica sin fallo hepático: este modelo se desarrolló a finales de la década de los 80 en este mismo laboratorio (Felipo et al., 1988; Azorín et al., 1989). Es un modelo basado en una dieta rica en amonio, administrando acetato amónico (25% p/p) en la comida de los animales. Dicha dieta provoca un aumento crónico en los niveles de amonio de las ratas, llegando aproximadamente a duplicar los niveles en sangre. Este modelo reproduce las alteraciones provocadas en la EH debidas únicamente a la hiperamonemia y permite distinguir qué efectos son debidos a la hiperamonemia y cuales a otras alteraciones asociadas al fallo hepático. Este modelo permite mantener el estado de hiperamonemia durante largos periodos de tiempo, permitiendo su estudio a largo plazo.

- Anastomosis porta-cava (PCS): modelo quirúrgico consistente en cortar la vena porta, suministradora de sangre al hígado, y unirla a la vena cava. Así, la sangre del intestino no pasa a través del hígado y por tanto, la detoxificación de sustancias se

disminuye notablemente. Estas ratas presentan distintas alteraciones metabólicas incluyendo la hiperamonemia.

- Ligadura biliar: este modelo consiste en obstruir el conducto biliar con una o varias ligaduras, impidiendo paso de la bilis al intestino. Estas ratas presentan distintas alteraciones como fallo hepático, hiperamonemia (Rodrigo et al, 2005), ictericia, hipertensión portal y fibrosis (paso previo de la cirrosis).

1.3 Principales factores que contribuyen a la EH

Los dos factores principales que contribuyen al desarrollo de la EH son la hiperamonemia y la inflamación.

Existen evidencias tanto experimentales como clínicas que apuntan a la hiperamonemia como el principal factor responsable de las alteraciones neurológicas presentes en la EH. Así, podemos encontrar que en modelos animales de hiperamonemia crónica sin fallo hepático se producen las mismas alteraciones neurológicas y metabólicas presentes en el fallo hepático, como la alteración de función cognitiva, motora o en el ritmo circadiano. En pacientes se aprecia una buena correlación entre el estadio de EH en los pacientes y su concentración arterial de amonio (Clemmesen et al., 1999). Además, los agentes desencadenantes de EH en pacientes cirróticos están asociados al aumento en los niveles de amonio (ingesta proteica, infección o hemorragias intestinales), y los tratamientos clínicos clásicos han sido enfocados a la disminución de los niveles de amonio mediante el control de la flora bacteriana con antibióticos o utilizando lactulosa para acidificar el intestino, reduciendo así el transporte de amonio (NH_3) a la sangre, pasándolo a la forma NH_4^+ de pH más ácido. Por último, diversos estudios han demostrado que la neuropatía presente en la EH coincide con la producida como consecuencia de niveles de amonio cerebrales elevados (Gibson *et al.*, 1974; Clemmesen et al., 1999; Norenberg, 1987).

La inflamación actúa sinérgicamente con la hiperamonemia en la inducción de la EH. Se ha observado una correlación entre la gravedad de los síntomas de la EH y los niveles séricos de $\text{TNF}\alpha$ (citocina proinflamatoria) (Odeh et al. 2004). Montoliu et al (2009) demostraron como las interleucinas 6 y 18 estaban aumentadas en pacientes con EHM y que existía una correlación entre los niveles de estas interleucinas y el deterioro cognitivo leve, abriendo la puerta a una posible vía de discriminación de la EHM en pacientes cirróticos. No obstante, y dado que el sistema nervioso central está separado de la sangre por medio de la barrera hematoencefálica, las interleucinas presentes en la sangre no pueden atravesar dicha barrera. El mecanismo propuesto para explicar la neuroinflamación producida en el cerebro es mediante señales

producidas durante la respuesta inmune capaces de llegar al cerebro. Estas señales activarían a la microglía (macrófagos del sistema nervioso central), y ésta comenzaría a secretar interleucinas pro-inflamatorias.

Rodrigo et al. 2010 demostraron que un modelo animal de hiperamonemia crónica sin fallo hepático induce por sí mismo neuroinflamación. El tratamiento con anti-inflamatorios no esteroideos (AINE), en este caso ibuprofeno, disminuyó la activación de la microglía y por lo tanto disminuyó la neuroinflamación, restaurando las capacidades motoras y de aprendizaje en las ratas, demostrando así la relación existente entre las dos causas principales de la EH.

1.4 Neurotransmisión y su relación con la EH

Una vez identificadas la hiperamonemia y la neuroinflamación como principales factores productores de la EH, se ha estudiado el mecanismo por el cual éstas podrían causar los síntomas. La vía de detoxificación del amonio en el cerebro es llevada a cabo por la enzima glutamina sintetasa, presente sólo en astrocitos, que utiliza como sustratos el amonio y el glutamato para formar glutamina. Se propuso que esta acumulación de glutamina en los astrocitos aumentaría la presión osmótica causando un edema citotóxico debido a la hinchazón de estas células. Sin embargo, recientes estudios descartaron esta hipótesis (Felipo V. 2013).

La neurotransmisión está alterada en diferentes pasos de distintos sistemas de neurotransmisión, incluyendo la neurotransmisión glutamatérgica, GABAérgica, dopaminérgica, serotoninérgica y colinérgica. Se alteran tanto la concentración extracelular de neurotransmisor como la cantidad, expresión en membrana, fosforilación y función de los receptores de dichos neurotransmisores y las vías de transducción de señales asociadas.

Para el presente trabajo, nos centraremos en la neurotransmisión glutamatérgica y GABAérgica.

1.4.1 Neurotransmisión glutamatérgica

El glutamato es el neurotransmisor excitador más importante del sistema nervioso central. Casi todas las neuronas excitatorias tienen un sistema glutamatérgico y se estima que más de la mitad de todas las sinapsis cerebrales lo liberan. El glutamato es un aminoácido no esencial que no es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica y que por lo tanto las neuronas han de sintetizar. El precursor principal para su síntesis es la glutamina, que es liberada por las células gliales. Una vez la glutamina es captada en la terminación presináptica es metabolizada a

glutamato por la glutaminasa en la mitocondria. Una vez producido, el glutamato se empaqueta en vesículas para ser liberado.

Una vez liberado, el glutamato ha de ser eliminado de la hendidura sináptica por los transportadores denominados EAATs (excitatory amino acid transporters). Existen tres tipos distintos: GLAST y GLT-1 (en astrocitos) y EAAC1 (neuronal). EAAC1 juega un papel fundamental en la modulación rápida de la transmisión glutamatérgica, siendo clave para conseguir una rápida neurotransmisión, aumentando su expresión en membrana rápidamente tras la activación de los iGluRs (receptores de glutamato ionotrópicos) (Waxman et al, 2007). La alteración de la transmisión glutamatérgica está asociada con las alteraciones cognitivas y motoras de diversas patologías, incluidas la hiperamonemia y el fallo hepático (Monfort et al., 2002 y 2009; Hermenegildo et al, 1998; Cauli et al, 2009a; Felipo V. 2013). Por otro lado, el glutamato captado por las células gliales es convertido en glutamina por la enzima glutamina sintetasa. Por último, la glutamina se transporta a las terminaciones nerviosas cerrando el ciclo.

Existen distintos tipos de receptores de glutamato. Tres de ellos son canales ionotrópicos: receptores NMDA, receptores AMPA y receptores kainato. Su nombre hace referencia al agonista tipo al que se unen.

Receptores NMDA: se activan cuando glutamato y su co-activador, glicina, se unen a él. Las subunidades de este receptor son: NR1, NR2A, NR2B, NR2C y NR2D. La estructura más corriente es la de dos subunidades obligatorias NR1 y dos NR2, distintas según regiones.

Los receptores NMDA se modulan por Mg^{2+} de forma dependiente del potencial de membrana. Las concentraciones fisiológicas de Mg^{2+} son suficientes para inhibir los receptores NMDA. Cuando la célula alcanza potenciales ligeramente despolarizados, se pierde la afinidad por el Mg^{2+} , lo que permite la activación de estos receptores, que permiten el paso de iones Na^+ y Ca^{2+} (fundamentales en procesos de plasticidad sináptica que abordaremos más adelante) y la salida de iones K^+ .

Los receptores de NMDA juegan un papel fundamental en el proceso de aprendizaje y memoria y la vía glutamato-óxido nítrico-GMP cíclico (GMPc) tiene un papel muy importante en este proceso. El funcionamiento normal de esta vía está disminuido en la EHM (Erceg et al., 2005). En humanos, muestras de pacientes fallecidos de EH mostraron una baja formación de GMPc en cerebelo (Corbalán et al. 2002).

La vía de transducción de señales glutamato-óxido nítrico-GMPc (ver *Figura 1*) puede encontrarse alterada por distintos factores. En el caso de la hiperamonemia, la vía se ve alterada en la formación del óxido nítrico. La hiperamonemia produce un aumento de la activación tónica de los receptores NMDA y de los receptores $GABA_A$ (El-Mlili et al. 2008; Cauli et al.

2008) provocando un aumento en la actividad de la protein quinasa dependiente de calcio/calmodulina (CAMKII) que conducirá a un aumento de la fosforilación de la óxido nítrico sintasa (NOS) en la serina 847 reduciendo su actividad y por lo tanto, la formación de óxido nítrico, que activa la guanilato ciclasa para formar GMPc, reduciendo así sus niveles (El-Mlili et al. 2008).

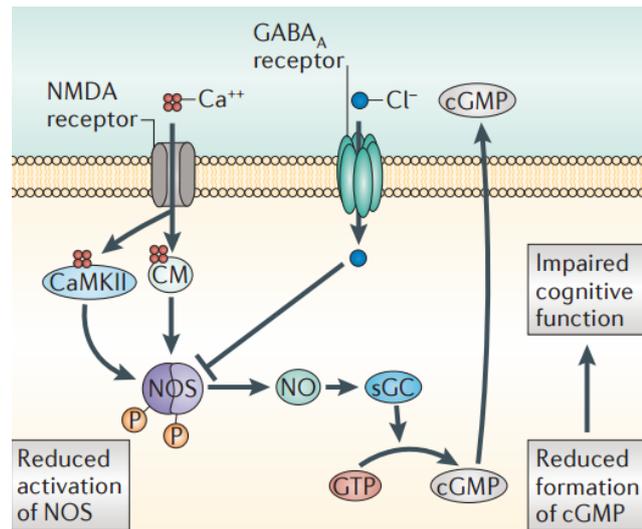


Figura 1. Vía Glutamato-Óxido Nítrico-GMPcíclico. La activación del receptor NMDA permite la entrada de Ca^{2+} , el cual se une a la calmodulina (CM) formando el complejo Ca^{2+} /calmodulina que activa la óxido nítrico sintasa (NOS) formando óxido nítrico (NO) a partir de arginina. El NO activa la guanilato ciclasa (GC) que forma GMPc a partir de GTP. *Figura tomada de Felipe V. 2013.*

La vía glutamato-óxido nítrico-GMPc modula diferentes procesos como la comunicación intercelular, la liberación de ciertos neurotransmisores en determinadas áreas cerebrales, los ritmos circadianos, la LTP y ciertas formas de memoria y aprendizaje. La alteración de algún paso de esta vía conduce a un deterioro en el aprendizaje.

Receptores AMPA: Formado por 4 subunidades (GluR1, GluR2, GluR3 y GluR4), que se combinan para formar tetrámeros normalmente a partir de dos dímeros iguales. La activación de estos receptores permite la entrada de iones Na^+ al interior de la neurona. Existe una diferencia funcional entre las distintas conformaciones según las subunidades que lo compongan. Así, los receptores AMPA que no contienen la subunidad GluR2 son también permeables al Ca^{2+} (Liu and Cull-Candy, 2005). Además, podemos distinguir entre receptores AMPA de alta o de baja afinidad, por ejemplo, los receptores permeables a Ca^{2+} son casi completamente activados a bajas concentraciones de AMPA (0.1 mM), mientras que los impermeables a Ca^{2+} tendrían una afinidad mucho menor (Cabrera-Pastor et al, 2012). La activación de los receptores AMPA

puede llevar a la activación de los receptores NMDA al despolarizar la membrana neuronal (Xin et al, 2005; Salonen et al, 2006; Cabrera-Pastor et al, 2012).

La activación de los receptores AMPA o NMDA aumenta el glutamato extracelular (Kakizawa et al, 2005). Debido a la dualidad de los receptores AMPA (alta y baja afinidad), la cantidad de glutamato liberado al exterior de la célula variará en función de la concentración de agonista que lo active, y por lo tanto, la cantidad de transportadores de glutamato que serán movilizados para compensar este aumento también será variable. Además, este aumento altera la vía glutamato-óxido nítrico-cGMP además de causar alteraciones como por ejemplo hipoquinesia debida al aumento de la concentración de glutamato extracelular en la sustancia nigra pars reticulata (SNr) (Felipo V. 2013).

Receptores de kainato: tetrámeros formados por las subunidades GluR5, GluR6, GluR7, KA1 y KA2 formando tetrámeros, pudiendo ser homotetrámeros de alguna de las subunidades GluR5-7 o si está formado por las subunidades KA1-2 mezcladas con subunidades GluR5-7.

1.4.2 Neurotransmisión GABAérgica

La mayoría de las sinapsis inhibitorias del sistema nervioso central utilizan el ácido γ -amimobutírico (GABA) o la glicina como neurotransmisor. Existen tres tipos distintos de receptores GABA ($GABA_{A/B/C}$). La subfamilia $GABA_A$, son una serie de receptores ionotrópicos formados por pentámeros de las distintas subunidades (α , β , γ , δ y ρ). Los receptores GABAérgicos permiten la entrada de Cl^- inhibiendo las células postsinápticas. Dada su alta variedad, la función de estos receptores varía según el tipo neuronal. La subfamilia $GABA_b$, son receptores metabotrópicos formados por heterodímeros de sus dos subunidades $GABA_b R1$ y $R2$.

El mecanismo de eliminación de GABA es similar al del glutamato. Tanto las propias neuronas como las células gliales poseen transportadores de alta afinidad por GABA denominados GAT, que restauraran los niveles normales de GABA tras su liberación por la neurona pre-sináptica, previniendo la activación excesiva de los receptores (Chiu et al. 2005).

La neurotransmisión GABAérgica juega un papel fundamental en la coordinación motora que está regulada principalmente por el cerebelo. Hanchar et al. 2005 demostraron que los niveles de glutamato extracelular procedente de células granulares o GABA procedente de las células de Purkinje u otras regiones controlan la coordinación motora. La neurotransmisión GABAérgica está implicada en la sintomatología de la EH (Schafer y Jones, 1982). Diversos estudios han demostrado que el aumento de GABA extracelular deteriora la coordinación

motora (Chiu et al., 2005; Hanchar et al., 2005, Boix et al., 2010). Además, estudios previos en este laboratorio demuestran un aumento del tono GABAérgico en ratas hiperamonémicas como resultado del aumento del GABA extracelular y de algunos neuroesteroides que los modulan positivamente (Cauli et al. 2009a). El aumento del tono GABAérgico podría ser responsable de la incoordinación motora en modelos de hiperamonemia y EH.

Tabla 1. Subunidades de los distintos receptores ionotrópicos.

Receptor	AMPA	NMDA	Kainate	GABA
Subunits	Glu R1 *	NR1 *	Glu R5	α_{1-7} *
	Glu R2 *	NR2A *	Glu R6	β_{1-4}
	Glu R3	NR2B	Glu R7	γ_{1-4}
	Glu R4	NR2C	KA1	δ
		NR2D	KA2	ϵ
				ρ_{1-3}

* Subunidades que serán estudiadas en el presente trabajo

1.4.3 Alteración de la neurotransmisión en la EH

La correcta expresión y localización subcelular de todos estos receptores ionotrópicos (tanto glutamatérgicos como GABAérgicos) es clave en el correcto funcionamiento de la neurotransmisión. El cambio en la concentración de estos receptores afectará a como la célula responde al impulso nervioso, alterando la posterior transducción de señales y la plasticidad sináptica, clave en procesos de aprendizaje y memoria. Por otro lado, la expresión y localización correctas de los transportadores de glutamato son también claves en el mantenimiento de la respuesta excitatoria rápida, siendo además tóxicas las altas concentraciones de glutamato si éstas no son correctamente eliminadas.

La correcta expresión en membrana de receptores y transportadores está determinada por un conjunto complejo de procesos celulares, cuya alteración causaría un desorden en esta expresión. Se requiere un balance de: transcripción, niveles correctos de mRNA, traducción, estabilidad de las proteínas, ensamblaje correcto y correcta localización en la membrana celular (Traynelis et al., 2010). Por otro lado, las modificaciones postraduccionales (sobre todo

mediante fosforilaciones), también serán determinantes en su función: regulación del tráfico hacia la membrana, endocitosis, localización sináptica y unión a otras proteínas (Malinow and Malenka, 2002).

La alteración en los receptores de neurotransmisores afecta también a la adaptación de las sinapsis en respuesta a los estímulos que reciben. En concreto, esta alteración afectará a la plasticidad sináptica característica de los receptores en la hendidura sináptica.

Las conexiones entre las sinapsis neuronales no son estáticas sino que pueden sufrir cambios en respuesta a experiencias previas de la célula, permitiendo que ciertos estímulos externos potencien ciertas sinapsis y debiliten otras. Este proceso de plasticidad sináptica es la base de la memoria y el aprendizaje. La alteración de esta plasticidad contribuye al deterioro cognitivo en patologías tan graves como el Alzheimer, trastornos autistas o retraso mental.

La alteración en los niveles de receptores de neurotransmisores en la membrana sináptica dará lugar a que no se consiga una correcta plasticidad causando los problemas de memoria y aprendizaje observados en pacientes con EH.

Dos fenómenos clave involucrados en la plasticidad sináptica son la potenciación y depresión a largo plazo (LTP Long-term potentiation y LTD Long-Term depression).

La LTP consiste en un aumento persistente del componente excitador de la respuesta sináptica, que se traduce en un aumento de la eficacia sináptica que se mantiene en el tiempo. La LTP en hipocampo se considera una de las bases de la memoria y el aprendizaje (Cooke y Bliss, 2006). Además del papel ya mencionado del cerebelo como principal responsable de la función y coordinación motora, otros estudios lo relacionan también con el aprendizaje motor (Vezina y Kim, 1999), la memoria de trabajo (Wiggs et al., 1999) e incluso en ciertas funciones cognitivas como la atención viso-espacial, mecanismos de aprendizaje, planificación y adecuación temporal y en la modulación verbal (Gordon, 2007). Martin et al. (2003) también demostraron que el cerebelo juega un papel en el aprendizaje espacial.

La LTD produce una reducción en la eficacia de la sinapsis neuronal. Las regiones principales en las que se da son también el hipocampo y el cerebelo pero puede ocurrir en otras regiones.

Una correcta expresión y localización de receptores es clave para mantener la correcta neurotransmisión y plasticidad en el sistema nervioso central.

Tanto receptores como transportadores pueden verse alterados por la EH. Y cualquiera de las siguientes condiciones podría ser la causante del deterioro cognitivo asociado a la alteración de la neurotransmisión (Monfort et al., 2002):

- La cantidad tanto de receptores como de transportadores. Esta alteración puede ser debida a un fallo en su expresión, síntesis y/o degradación. Cualquiera o una combinación de éstos podría dar lugar a una alteración de los niveles normales en membrana.
- La regulación de su localización espacial. Aunque la cantidad de receptores o transportadores no se haya visto alterada, un error en la localización de éstos en la membrana alteraría su función, ya que sólo reconocen ligandos extracelulares.
- La función de los receptores y transportadores, ya que están regulados por distintos mecanismos como fosforilación-defosforilación, unión de co-agonistas, etc.
- Alteración en la liberación o en la recaptación (transportadores) del neurotransmisor.
- Alteraciones en cualquier paso de las vías de transducción de señales asociadas a los diferentes tipos de receptores, pueden dar como resultado una neurotransmisión alterada.

1.5 Estado actual y terapias emergentes

La potente investigación llevada a cabo en la última década ha dado como resultado diversos nuevos enfoques tanto para el tratamiento de la EH como para el diagnóstico temprano de la EHM, permitiendo anticiparse a sus síntomas clínicos.

Para el tratamiento de la EH crónica, tradicionalmente se ha intentado reducir los niveles de amonio reduciendo la cantidad de proteínas en la dieta o la producción de éste por la flora intestinal mediante antibióticos como la neomicina. Estudios recientes indican que la rifaximina es el antibiótico más efectivo (Bass et al., 2010). También se utiliza lactulosa para acidificar el lumen intestinal y reducir el transporte de amonio al torrente sanguíneo.

La investigación realizada en la última década ha dado lugar a una serie de nuevas estrategias terapéuticas que actúan sobre dianas en el cerebro implicadas en el deterioro cognitivo y motor. Como hemos visto, la reducción del GMPc por la alteración de la vía glutamato-óxido nítrico-GMPc es una de las responsables del deterioro en el aprendizaje. Aumentar los niveles de GMPc en cerebelo mediante un inhibidor de la fosfodiesterasa 5 restaura la función cognitiva en ratas con EHM (Monfort et al. 2007). Por otro lado, un antagonista de los receptores GABA_A (como la bicuculina) restauran la capacidad de aprendizaje en ratas con EHM (Cauili et al. 2009). Por último, también se han desarrollado estrategias centradas en la reducción de la neuroinflamación. Se ha demostrado que el tratamiento con ibuprofeno en ratas restauraba las alteraciones cognitivas y motoras pero, en pacientes con fallo hepático, el ibuprofeno podría inducir en el paciente fallo renal. Por lo tanto,

se han probado otro tipo de antiinflamatorios como los inhibidores de p38. Este inhibidor reduce la activación de la microglía reduciendo la neuroinflamación sin afectar a los riñones y restaura la función cognitiva y motora en ratas con EH (Agusti et al., 2011).

2- OBJETIVOS

El principal objetivo del presente trabajo es analizar la expresión en membrana de transportadores de glutamato y de diferentes subunidades de receptores ionotrópicos de glutamato y de GABA implicados en la neurotransmisión, en cerebelo de ratas control y estudiar si están alterados en ratas con hiperamonemia crónica.

Los objetivos concretos son:

- 1.** Analizar la expresión en membrana de receptores NMDA (subunidades NR1 y NR2A), AMPA (subunidades GluR1 y GluR2) y GABA (subunidad GABA α 1) en cerebelo de ratas control en condiciones basales.
- 2.** Analizar la expresión en membrana de los transportadores de glutamato EAAC1 y GLT-1 en cerebelo de ratas control en condiciones basales.
- 3.** Estudiar si la hiperamonemia altera la expresión en membrana de los receptores ionotrópicos NMDA (subunidades NR1 y NR2A), AMPA (subunidades GluR1 y GluR2) y GABA (subunidad GABA α 1), y los transportadores de glutamato EAAC1 y Glt-1 en condiciones basales.
- 4.** Evaluar el efecto de la activación de receptores AMPA sobre la expresión en membrana del transportador de glutamato EAAC1 en cortes de cerebelo ex vivo y sus posibles alteraciones en hiperamonemia.

3- MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Modelos Animales

De los modelos animales antes mencionados, para el desarrollo de esta experimentación se utilizó el modelo de hiperamonemia crónica sin fallo hepático, diseñado en este laboratorio (Felipo et al., 1988; Azorin et al, 1989). Éste consiste en elevar el nivel de amonio en sangre de las ratas modelo mediante una dieta rica en amonio (25% acetato amónico p/p) durante un mínimo de 3 semanas. Esta dieta provoca un aumento sostenido de los niveles de amonio tanto en sangre como en tejidos (41, 37 y 51% respectivamente en cerebro, hígado y músculo), simulando así las condiciones de un paciente con problemas crónicos hepáticos.

Los niveles de urea en sangre alcanzan ≈ 16 mM y la eliminación de urea es de 25 mmoles/24 h, aproximadamente el doble que en las ratas control.

3.2 Obtención de las muestras

Se decapitaron las ratas y se les extrajo el cerebelo. Se sumergieron en solución Krebs (en mM: NaCl 119, KCl 2.5, KH_2PO_4 1, NaHCO_3 26.2, CaCl_2 2.5 y glucosa 11), enfriada con hielo y se burbujearon con carbógeno (95% O_2 y 5% de CO_2). Se hicieron cortes transversales de unos 400 μm con un Vibrótomo (LEICA, Vt1000s), cuidando siempre que los cortes estén en solución Krebs y correctamente burbujeados con carbógeno.

3.3 Tratamiento de las muestras

Una vez obtenidas las muestras, se pasan a los pocillos del incubador (Campden Instruments, Ltd. Modelo 745) (*Figura 2*), que cuenta con un sistema de perfusión que permite que a los pocillos llegue la solución elegida (Krebs burbujeadado con carbógeno o tratamiento). La temperatura es constante a lo largo de todo el experimento a 35°C, monitorizada con un controlador de temperatura.



Figura 2. Sistema de perfusión.

Se colocaron 4 cortes de cerebelo en cada pocillo y se estabilizaron durante 20 minutos con solución Krebs. Para estudiar la cantidad de receptores o transportadores basales tanto en condiciones fisiológicas como en hiperamonemia, los cortes fueron únicamente estabilizados en Krebs. Además, para el estudio de la expresión del transportador de glutamato EAAC1 en respuesta a la activación del receptor AMPA, tras la estabilización, se añade 1 mL de tratamiento con el agonista AMPA en cada pocillo. Las concentraciones de AMPA utilizadas fueron: un basal sólo con Krebs, 0.3, 1 y 2 mM de AMPA, tanto para los cortes de ratas control como hiperamonémicas. A su vez, cada tratamiento se realizó a tiempos distintos. Los tiempos de tratamiento fueron de 8 y 15 minutos.

Tras la estabilización y el tratamiento, se transfirieron los cortes de cada pocillo a dos tubos distintos. Uno de ellos con el crosslinker BS³ (Bis[sulfosuccinimidyl] suberate) (Pierce, Rockford, IL) 2 mM, y el otro sólo con Krebs. El BS³ es un crosslinker que se unirá específicamente a proteínas de membrana, provocando que éstas se queden en los pocillos del gel de acrilamida y permitiéndonos determinar únicamente la cantidad de proteína de membrana. Se mantienen los tubos en agitación continua a una temperatura de 4°C durante 30 minutos y, posteriormente, se detiene la reacción añadiendo glicina (100 mM en Krebs) durante otros 10 minutos a 4°C.

Por último, se transfirieron los cortes a un tubo con 200 µL de tampón de fosforilación (Tris-HCl 66 mM pH 7.4, SDS 1%, EGTA 1 mM, Glicerol 10%, Leupeptina 0.2 mg/mL, NaF 1 mM, Na orto-vanadato 1 mM), y se homogenizaron por sonicación durante 20 segundos. Después, se guardó una alícuota para la determinación de la cantidad de proteína y se almacenaron las muestras a -20°C.

3.4 Determinación de la cantidad de proteína

Se cuantificó la cantidad de proteína de cada muestra por duplicado por el método colorimétrico del ácido bicinónico (BCA Protein Assay Kit, Thermo). Se colocó una curva patrón con BSA (Albúmina de Suero Bovino), y las muestras por duplicado. Se añadieron los reactivos Pierce® BSA Protein Assay Reagents A y B, y se incubó la placa a 37 °C durante 30 minutos. Por último se midió la absorbancia a 570 nm.

3.5 Análisis del contenido de proteínas totales y de membrana por Western-Blot

Se separaron las proteínas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 8% con SDS. La muestra se diluyó (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 termoblock. La cantidad de proteína por muestra fue de 100, 200 o 250 µg según la proteína a analizar.

Los geles de poliacrilamida constan de dos partes. La parte superior o “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 facilita la concentración de la muestra en una banda estrecha antes de que entre en la segunda parte del gel o “separating” (Tris Base 0.4 M, 0.1% SDS, pH a 8.8, Acrilamida 8 %, Bisacrilamida 0.2%, APS 0.04% y TEMED), en el cual se separan las proteínas en función de su masa relativa. El tampón utilizado para la electroforesis fue el tampón “running” (Tris Base 0.3%, 0.02% SDS, Glicina 1.5%) y se realizó en geles grandes de 20 pocillos. La intensidad de corriente fue de 10 mA por gel durante 16 horas (overnight).

Una vez finalizada la electroforesis, se transfirieron las proteínas a una membrana de PVDF (rehidratada previamente en metanol) en tampón de transferencia (Tris Base 0.025 M, Glicina 0.05 M), durante 5 horas a una intensidad de 250 mA.

A continuación, se bloqueó la membrana con una solución de leche en polvo al 5% en TBS-Tween (NaCl 0.15 M, Tris Base 50 mM, Tween-20 0.05%, pH 7.5) durante 45-60 minutos y se incubaron con el anticuerpo primario específico (*Tabla 2*) diluido en BSA al 5% en TBS-Tween durante 16 horas en agitación a 4°C. Se lavaron las membranas 4 veces durante 10 minutos con TBS-Tween y se incubó con el anticuerpo secundario correspondiente conjugado con fosfatasa alcalina, diluido también en la solución de BSA 5%, durante 1 hora.

Tabla 2. Anticuerpos primarios y secundarios utilizados con su correspondiente dilución.

Anticuerpo 1°	Dilución	Anticuerpo 2°	Dilución
Anti Glt-1 (ABCAM)	1:2000	Anti-IgG cabra-f.a.* contra IgG conejo (Sigma)	1:4000
Anti EAAC1 (ALPHA DIAGNOSTIC)	1:1000	Anti-IgG cabra-f.a.* contra IgG conejo (Sigma)	1:4000
Anti GABA α 1 (ABCAM)	1:500	Anti-IgG cabra-f.a.* contra IgG conejo (Sigma)	1:4000
Anti GluR1 (Calbiochem)	1:1000	Anti-IgG cabra-f.a.* contra IgG conejo (Sigma)	1:4000
Anti GluR2 (CHEMICON)	1:2000	Anti-IgG cabra-f.a.* contra IgG conejo (Sigma)	1:4000
Anti NR2A (UPSTATE)	1:1000	Anti-IgG cabra-f.a.* contra IgG conejo (Sigma)	1:4000
Anti NR1 (BD)	1:1000	Anti-IgG cabra-f.a.* contra IgG rata (Sigma)	1:4000

*f.a. Fosfatasa alcalina

La membrana se lavó 4 veces durante 10 minutos con TBS-Tween y un último lavado de 10 minutos en tampón sustrato (NaCl 100 mM, MgCl₂ 5 mM, Tris-HCl 100 mM a pH= 9.5). Por último, se reveló utilizando un método colorimétrico para la enzima fosfatasa alcalina con una solución de revelado (NaCl 100 mM, MgCl₂ 5 mM, Tris-HCl 100 mM, 0.6% stock NBT, 0.35% stock BCIP, pH= 9.5).

Las imágenes de las bandas fueron capturadas en un escáner Hewlett Packard Scanjet 5300C y la intensidad de las bandas fue cuantificada con el programa AlphaImager 2200 (AlphaEaseFC 2200 for Windows, Cambridge, UK).

Para analizar la expresión en membrana de los receptores y transportadores de interés, se utilizó el crosslinker BS_3 que se une específicamente a proteínas de membrana.

Se cuantificó la intensidad de banda, correspondiente a muestras tratadas sin y con crosslinker BS_3 . La intensidad de banda de muestras no tratadas con BS_3 corresponde a la cantidad total de la proteína de interés (receptor/transportador). Mientras que la intensidad de banda de muestra que fue tratada con BS_3 corresponderá únicamente a la proteína de interés (receptor/transportador) presente en el citosol, ya que la proteína transmembrana con crosslinker quedará retenida en el pocillo del gel. Así, la diferencia entre la intensidad de banda negativa (sin BS_3) y positiva (con BS_3) corresponderá a la cantidad de proteína transmembrana (Figura 3). Los resultados se expresaron como porcentaje respecto a la rata control.

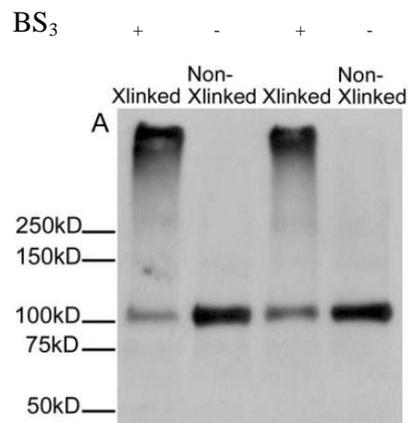


Figura 3. Representación de un Western-Blot con BS_3 . Los pocillos impares (Xlinked) corresponden a muestras que han sido tratadas con BS_3 , quedando retenidas las proteínas de membrana en el gel stacking. Los pocillos pares (Non-Xlinked) corresponden a muestras que no han sido tratadas con BS_3 y se separan con normalidad. La diferencia entre la intensidad de la banda sin BS_3 (Non-Xlinked) y con BS_3 (Xlinked) es la cantidad de proteína de membrana que contiene la muestra.

3.6 Análisis estadísticos

Se emplearon distintos métodos de análisis estadístico dependiendo de los resultados a comparar. Todos ellos se realizaron con el programa Prism 5 (GraphPad Software, Inc.). Se realizó un análisis de la varianza (ANOVA) seguido por un test post-hoc Tukey en los casos en los que se compararon más de dos grupos o test t-Student en los casos de dos grupos. Se consideró como significativo un valor de $p < 0.05$. Los resultados se expresan como media \pm SEM (Error estándar de las medias) del número de animales indicados en cada caso.

4- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Expresión en membrana de transportadores y receptores ionotrópicos de glutamato y GABA en modelo de hiperamonemia crónica sin fallo hepático en condiciones basales

4.1.1 La expresión en membrana basal de las subunidades (NR1, NR2A, GluR1 y GluR2) de receptores ionotrópicos de glutamato está disminuida en hiperamonemia crónica

En ratas hiperamonémicas la expresión basal en membrana de las subunidades NR1 y NR2A del receptor de NMDA, está disminuida a un $81 \pm 8\%$ ($p < 0.05$) y a un $71 \pm 10\%$ ($p < 0.05$) respectivamente, respecto a las ratas control (*Figura 4*).

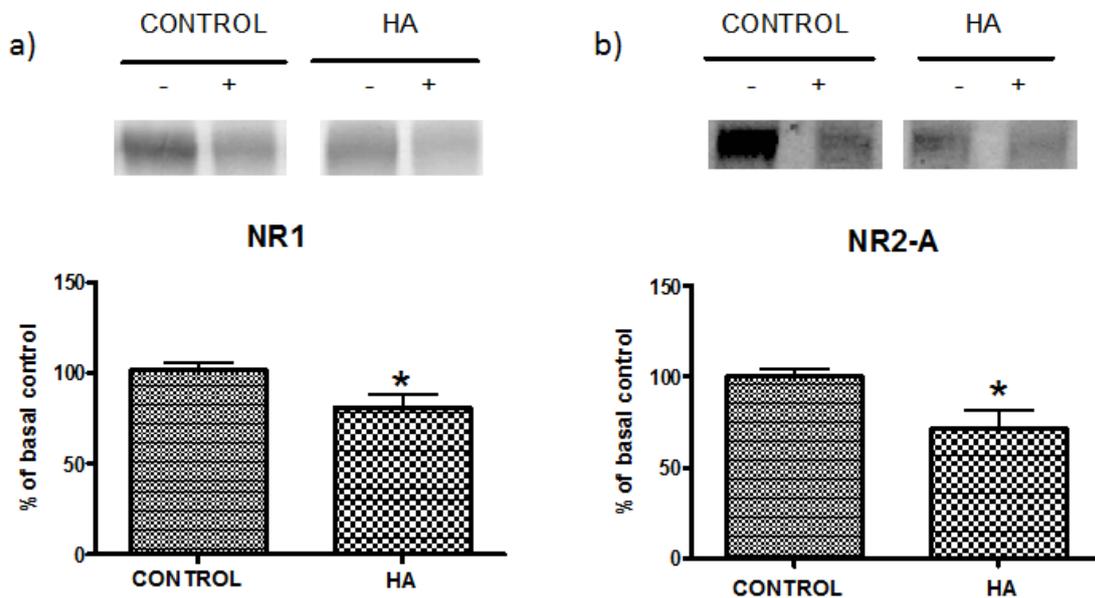


Figura 4. La expresión basal en membrana de las subunidades NR1 (a) y NR2A (b) está disminuida en cerebelo de ratas hiperamonémicas. Los datos son la media \pm error estándar de (a) 27 y (b) 20 ratas por grupo. *diferencia significativa respecto al control ($p < 0.05$).

La expresión en membrana de las subunidades del receptor AMPA, GluR1 y GluR2, también está disminuida en ratas con hiperamonemia crónica, a un $62 \pm 9\%$ ($p < 0.001$) y $72 \pm 8\%$ ($p < 0.05$) respectivamente, respecto a las ratas control (*Figura 5*).

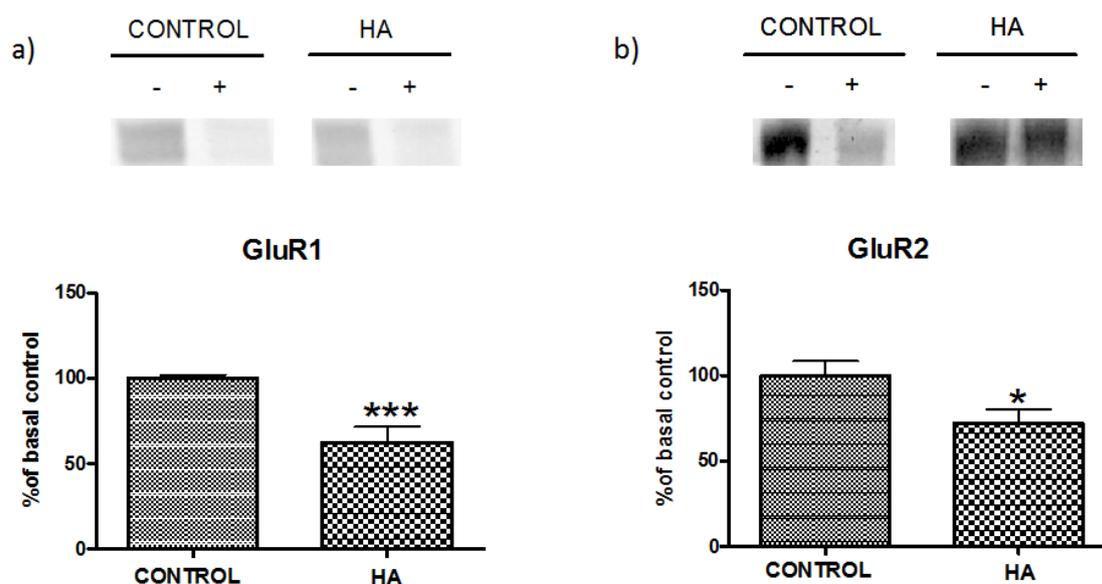


Figura 5. La expresión en membrana de las subunidades GluR1 (a) y GluR2 (b) está disminuida en cerebelo de ratas hiperamonémicas. Los datos son la media \pm error estándar de (a) 9 y (b) 14 ratas por grupo. *diferencia significativa respecto al control ($p < 0.05$); *** diferencia significativa respecto al control ($p < 0.001$).

La actividad y función de estos receptores está regulada por distintos factores: (i) la cantidad de receptor (expresión, síntesis y degradación), (ii) la localización subcelular, (iii) unión a co-agonistas o fosforilación y (iv) la concentración extracelular del neurotransmisor. La disminución de la cantidad de receptores NMDA y AMPA en membrana de ratas hiperamonémicas podría implicar una disminución en su función. La disminución de la expresión en membrana podría deberse tanto a una alteración en la síntesis o degradación como a un transporte irregular del receptor a la membrana.

Como consecuencia, la actividad y función de estos receptores podría estar alterada. Esto conllevaría una alteración en la neurotransmisión, postulada como principal factor causante de la EH.

En relación con las subunidades del receptor de NMDA, distintos estudios muestran una respuesta opuesta de estos receptores en el fallo hepático agudo y crónico. Mientras que en el fallo hepático agudo la excesiva activación de los receptores NMDA puede llegar a provocar la muerte, en los casos de fallo hepático crónico los niveles de amonio no son lo suficientemente elevados como para inducir este aumento y desencadenan una respuesta adaptativa. Esto es debido a que la excesiva activación de los receptores NMDA causa toxicidad celular, responsable de la muerte en el fallo hepático agudo. La respuesta adaptativa frente a la hiperamonemia crónica evitará esta toxicidad celular pero, al disminuir la activación de estos

receptores, provocará déficits en las vías de transducción de señales en las que está implicado (por ejemplo, la vía glutamato-óxido nítrico-GMPc, ver *Figura 1*) induciendo déficits cognitivos, de aprendizaje y memoria (Llansola et al. 2007).

Yonden et al. (2010) estudiaron la expresión de las subunidades NR1 y NR2A en homogenados de hipocampo de ratas tratadas con amonio, encontrando también una disminución significativa de ambos receptores. Sin embargo, Llansola et al. 2006 muestran únicamente disminuido NR2A en homogenados de hipocampo y estriado en modelos de hiperamonemia crónica, mientras que en homogenados de cerebelo no aprecian alteración, poniendo de manifiesto la alta variabilidad en la expresión de los receptores según la zona estudiada. No obstante, estos resultados de expresión de subunidades son en muestras de homogenados, mientras que los obtenidos en el presente trabajo representan la cantidad de receptor en membrana.

Monfort et al. (2007) estudiaron en homogenados de cerebelo de ratas con anastomosis porta-cava tanto la expresión de los receptores NMDA como AMPA. Los resultados mostraron que la cantidad total de receptor no se encontraba significativamente alterada. Posteriormente, para comprobar si la expresión en membrana estaba alterada sin que la cantidad total lo estuviese, analizaron por inmunohistoquímica únicamente la expresión del receptor en la membrana, encontrándose significativamente disminuida. Por ello, postularon que su disminución en membrana se debía al tráfico de éstos hacia la membrana.

El receptor NR1 modula su expresión en membrana mediante la fosforilación de los residuos de serina S890, S896 y S897. La proteína quinasa C (PKC) fosforila el residuo de serina 890 y 896 y la proteína quinasa AMPc-dependiente (PKA) fosforila el residuo de serina 897. Por un lado, la activación simultánea de PKA y PKC llevará a una fosforilación de los residuos S896 y S897, que promoverán la salida de la subunidad desde el retículo endoplasmático hasta la superficie de la membrana (Scott et al. 2001, 2003; Traynelis et al., 2010). Por otro lado, se ha demostrado que la fosforilación PKC-dependiente de la S890 interrumpe la formación de los clusters de NR1 en la superficie de la membrana (Tingley et al. 1997).

Monfort et al. (2007), analizaron por Western-Blot si alteraciones en la fosforilación de NR1 podría ser la causante de la alteración encontrada en la expresión en membrana de este receptor. Encontraron significativamente aumentados los niveles de fosforilación de NR1 en los residuos de serina S890 y S897. En la misma línea, Sánchez Pérez et al. 2006 demuestran cómo el amonio reduce la expresión en membrana de NR1 y NR2A en cultivos de neuronas de cerebelo - aunque NR1 en cerebelo se encuentra en las mismas cantidades totales - tras el análisis de la fosforilación encuentran también aumentada la fosforilación de S890 y S897,

demostrando que la clave de la expresión en membrana de los receptores de NMDA está en su transporte.

Por lo tanto, aunque distintos estudios muestran que los receptores de NMDA no están alterados en su expresión total (homogenados), nuestros resultados apoyan la hipótesis de que éstos tienen reducida su expresión en membrana en modelos de hiperamonemia.

El siguiente paso consistiría en comprobar la causa de esto, intentando verificar si la disminución en membrana del receptor es debida a la fosforilación alterada que da como resultado una incorrecta distribución en la membrana de los clusters de NR1 que formarán los receptores de NMDA, y estudiar el posible responsable de esa fosforilación, el cual podría ser una potencial diana terapéutica. El primer candidato a estudiar sería la fosforilación de la serina S890 a la que Tingley et al. (1997) apuntan como responsable último de la distribución de NR1, ahondando en el porqué de esta alteración en la fosforilación. También podríamos optar por investigar como la activación simultánea de las serinas S896 y S897 por PKC y PKA, que promueven la translocación y si esta vía está alterada en modelo animal de EH.

En relación a las subunidades del receptor AMPA, la expresión en membrana de las subunidades del receptor GluR1 y GluR2, también son significativamente menores en ratas hiperamonémicas respecto a las ratas control (*Figura 7*). Suárez et al. (1997), con estudios de inmunohistoquímica, demuestran que la expresión de ambos está aumentada en cerebelo de ratas con anastomosis porta-cava. Cabrera-Pastor et al. (2012) estudiaron por Western-Blot la expresión de ambas subunidades, las cuales estaban también aumentadas en homogenados de cerebelo. La disminución de la expresión en membrana de ambas subunidades, GluR1 y GluR2, observada en nuestros resultados (*Figura 7*) podría explicarse de forma similar a las subunidades anteriores NR1 y NR2A. El aumento en homogenados sólo indica un aumento en la expresión total pero no en membrana. Una alteración en la translocación de estas subunidades explicaría su disminución en la membrana independientemente del aumento de la cantidad total.

La disminución de la expresión de GluR1 y GluR2 obtenida en nuestros resultados parece estar también apoyada por resultados obtenidos en el estudio de la fosforilación del residuo de serina S831 de GluR1, que aumenta la función del receptor AMPA (Benke et al. 1998). Ya que esta fosforilación se ha demostrado significativamente reducida en hiperamonemia (Monfort et al. 2007), esta podría ser la causa de la disminución de las subunidades AMPA obtenida en nuestros resultados. Además, al igual que para el receptor de NMDA, el receptor AMPA contiene regiones de fosforilación que determinarán su translocación a la membrana. Así, se ha demostrado que la fosforilación por parte de PKC de las serinas S816 y S818 de la subunidad GluR1 permiten la interacción de esta subunidad con la proteína de unión a actina 4.1N, que es la encargada de la facilitación de la inserción de esta subunidad en la membrana plasmática

(Boehm et al., 2006; Lin et al., 2009). También se ha demostrado que la fosforilación de GluR1 por PKA permite a la subunidad translocarse a la membrana sináptica (Esteban et al., 2003; Man et al., 2007).

Todo ello indica que una alteración en la fosforilación de los receptores por parte de PKA y/o PKC podría ser la causante de la disminución de la expresión en membrana de las subunidades analizadas, por lo que se deberían de investigar estas vías de fosforilación y analizar si están alteradas en modelos de hiperamonemia.

4.1.2 La expresión en membrana basal de la subunidad GABA α 1 del receptor GABA está disminuida en hiperamonemia crónica

Se analizó la expresión en membrana de la subunidad GABA α 1 en ratas control e hiperamonémicas. Se escogió esta subunidad por ser de las más representativas en el cerebelo (Vithlani et al., 2011).

Se observa una disminución en la expresión en membrana de la subunidad GABA α 1 a un $73 \pm 9\%$ ($p < 0.05$) en condiciones basales (Figura 6).

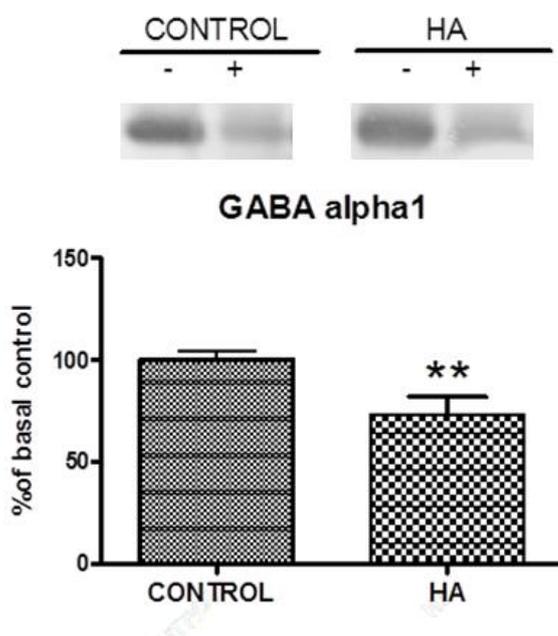


Figura 6. La expresión en membrana de la subunidad GABA α 1 está disminuida en cerebelo de ratas hiperamonémicas en condiciones basales.

Los datos son la media \pm error estándar de 24 ratas por grupo. **diferencia significativa respecto al control ($p < 0.01$).

El estudio de la neurotransmisión GABAérgica en modelos de EH ha mostrado principalmente un aumento del tono GABAérgico en cerebelo (Cauli et al., 2009a y 2009b), que contribuye a las alteraciones cognitivas y motoras en la EH.

Las posibles causas de este aumento del tono GABAérgico son: a) aumento en la cantidad de receptores GABA en la membrana post-sináptica, b) un aumento en el GABA extracelular y c) síntesis aumentada de neuroesteroides. Además, también se ha demostrado que la alteración en la liberación y captación del GABA puede ser debida a una alteración de los transportadores en astrocitos en modelos de hiperamonemia (Bender et al. 2000).

Tanto la alteración en la liberación y captación de GABA por alteración en la expresión de sus transportadores, como la síntesis de neuroesteroides podrían aumentar el tono GABAérgico en el cerebelo. Como consecuencia, podría desarrollarse un proceso de adaptación similar al referenciado en los receptores de NMDA, por el que se intente de forma natural reducir ese aumento en el tono GABAérgico mediante la disminución de la expresión en membrana de su receptor, tal como indican nuestros resultados.

4.1.3 La expresión en membrana de los transportadores de glutamato GLT-1 y EAAC1 está disminuida en condiciones basales de hiperamonemia crónica

De forma análoga se estudió la expresión basal en membrana de los transportadores de glutamato EAAC1 (localizado en neuronas) y GLT-1 (localizado en astrocitos).

Se observó una disminución de ambos transportadores, de EAAC1 a un $73 \pm 10\%$ ($p < 0.01$) y de GLT-1 a un $70 \pm 11\%$ ($p < 0.05$) (*Figura 7*).

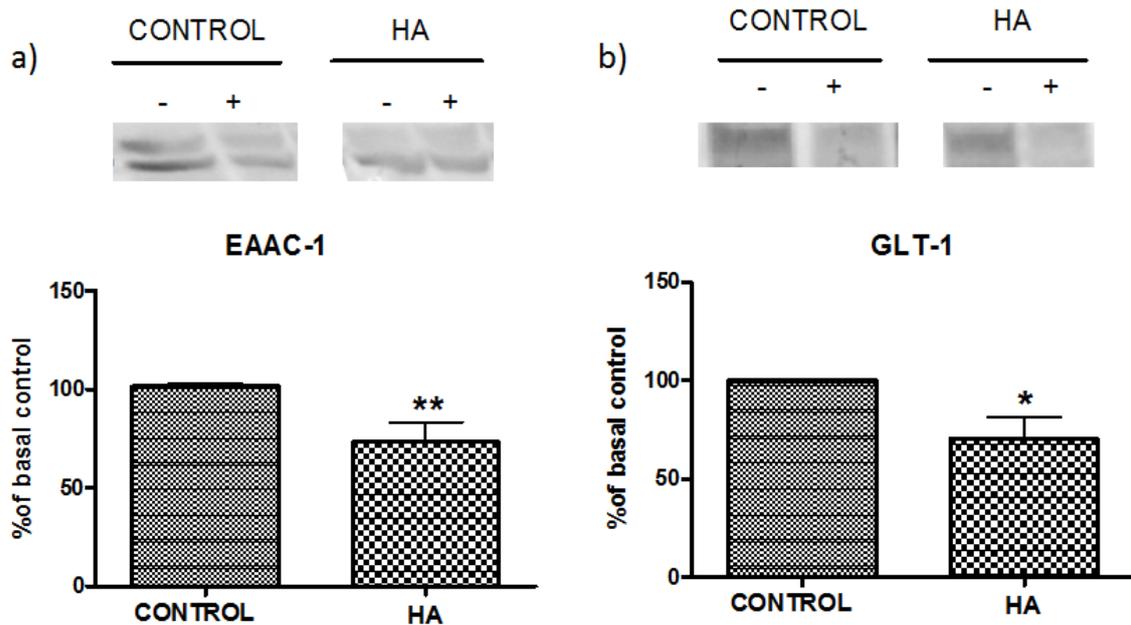


Figura 7. La expresión basal en membrana de los transportadores de glutamato EAAC1 (a) y Glt-1 (b) está disminuida en cerebelo de ratas hiperamonémicas. Los datos son la media \pm error estándar de (a) 16 y (b) 8 ratas por grupo. *diferencia significativa respecto al control ($p < 0.05$); ** diferencia significativa respecto al control ($p < 0.01$).

El glutamato es el principal neurotransmisor excitador en cerebro. La acumulación excesiva de glutamato en el medio extracelular es neurotóxica y puede inducir degeneración y muerte neuronal. Por lo tanto, la correcta eliminación de éste no sólo afectará al correcto funcionamiento de la neurotransmisión sino también a la supervivencia de la neurona. Un aumento basal en los niveles de glutamato extracelular ha sido demostrado en modelos de hiperamonemia y fallo hepático agudo (J. de Knegt et al. 1994).

Una disminución en la expresión en membrana de los transportadores EAAC1 y Glt-1 llevará asociado un aumento del glutamato extracelular ante la imposibilidad de poder recaptarlo, con un aumento de la toxicidad asociado a hiperexcitabilidad y excitotoxicidad (Butterworth 2002). Esta es una hipótesis ya planteada por Vaquero y Butterworth (2006) y que nuestros resultados apoyan.

Diferentes estudios obtienen resultados similares. Raghavendra et al. (1998) y Norenberg et al. (1997) observan una disminución en la expresión génica de Glt-1 en modelos de daño cerebral e hiperamonemia, respectivamente. Suarez et al. 2000 también obtienen una disminución en los niveles de expresión de Glt-1 y EAAC1 en cerebelo de ratas con anastomosis porta-cava. Observan que el mRNA de Glt-1 en modelo de fallo hepático agudo

estaba disminuido. Así pues, la represión de la expresión génica podría ser una posible causa de la disminución de la expresión en membrana de los transportadores de glutamato EAAC1 y Glt-1.

Como conclusión, la expresión en membrana de las subunidades NR1 y NR2A del receptor NMDA, GluR1 y GluR2 del receptor AMPA y GABA α 1 del receptor GABA está disminuida en ratas con hiperamonemia crónica (*Figura 8*). En consecuencia, esto podría alterar la neurotransmisión y contribuir a las alteraciones en la función cognitiva y motora en pacientes con encefalopatía hepática.

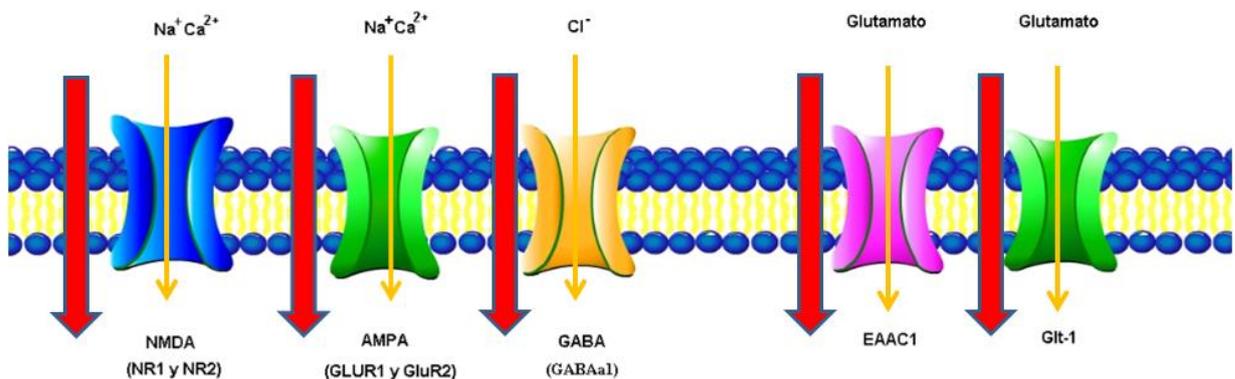


Figura 8. Resumen de las alteraciones de la expresión en membrana de los receptores NMDA, AMPA y GABA y de los transportadores de glutamato EAAC1 y Glt-1 en ratas con hiperamonemia crónica. Tanto los receptores ionotrópicos de NMDA, AMPA y GABA como los transportadores EAAC1 y Glt-1 tienen disminuida su expresión en membrana.

4.2 Expresión en membrana del transportador de glutamato EAAC1 tras la activación del receptor AMPA a diferentes dosis y tiempos de incubación con un agonista

Una vez estudiada la expresión basal tanto de receptores como de transportadores, analizamos la expresión en membrana del transportador de glutamato EAAC1 en respuesta a la unión de AMPA a su receptor.

La activación de los receptores AMPA y/o NMDA provoca un aumento rápido de la expresión en membrana del transportador de glutamato EAAC1 (Waxman et al, 2007). Además, estudios de microdialisis in vivo han demostrado que la unión de un agonista a estos receptores aumentaba los niveles de glutamato extracelular, y esta podría aumentar la

translocación de EAAC1 en membrana, para recaptar el exceso de glutamato. La secuencia de eventos en orden cronológico sería la siguiente: activación de los receptores AMPA y/o NMDA, aumento del glutamato extracelular, aumento en la expresión en membrana de EAAC1, recaptación del glutamato por éste y rápida disminución del glutamato extracelular hasta alcanzar niveles basales. En este proceso, los receptores AMPA de alta y baja afinidad podrían jugar un papel clave. Los receptores AMPA de alta afinidad no alteran los niveles de glutamato extracelular pero los de baja afinidad si, aumentando transitoriamente hasta que disminuye a niveles basales por el aumento de la expresión de EAAC1 (Cabrera-Pasor et al., 2015 enviado, no publicado).

Como hemos visto anteriormente, la hiperamonemia provoca un descenso en la expresión en membrana basal de los receptores ionotrópicos. Además, se ha visto en estudios de microdialisis in vivo un efecto de la hiperamonemia sobre la liberación de glutamato tras la activación de los receptores AMPA a diferentes concentraciones. Por todo ello, en este trabajo estudiamos cómo afecta el tratamiento con AMPA a la expresión en membrana del transportador EAAC1, y si existen diferencias en la respuesta a distintas concentraciones y a distintos tiempos de incubación con el agonista AMPA. Para ello se trataron cortes de cerebelo de ratas control e hiperamonémicas con 0.3, 1 y 2 mM de AMPA y cada uno de estos, a su vez, durante 8 o 15 minutos.

4.2.1 El tratamiento con AMPA altera la expresión en membrana del transportador EAAC1 observándose un efecto dosis y un efecto tiempo

El tratamiento con diferentes concentraciones de AMPA induce cambios en la expresión en membrana de EAAC1. En ratas control, se observa un efecto dosis dependiente a los 8 minutos. A concentraciones bajas de AMPA (0.3 mM), la expresión en membrana de EAAC1 aumenta a $162 \pm 44\%$ y a concentraciones altas de AMPA (2 mM) disminuye progresivamente su expresión en membrana ($49 \pm 14\%$) ($p < 0.05$). Esto parece indicar que el AMPA a altas concentraciones no sólo no aumenta sino que disminuye la expresión de EAAC1 en el tratamiento de 8 minutos. Sin embargo, en las ratas control, el tratamiento con AMPA de 15 minutos parece aumentar los niveles del transportador sin importar su concentración, manteniéndose en niveles similares de aumento (AMPA 0.3 mM = $170 \pm 29\%$ $p < 0.05$; AMPA 1 mM = $182 \pm 33\%$ $p < 0.05$ y AMPA 2 mM = $186 \pm 24\%$ $p < 0.05$) (Figura 9 y 10).

En las ratas hiperamonémicas, los tratamientos con AMPA tanto a los 8 como a los 15 minutos aumentan la expresión en membrana del transportador EAAC1 respecto tanto a su basal como al control, sin apreciarse un efecto de la dosis en ambos casos (Figura 9 y 11).

El efecto del tiempo de tratamiento no se aprecia en las ratas hiperamonémicas, alcanzándose los niveles de expresión en membrana de forma similar tanto en distintas dosis como a distintos tiempos. Sin embargo, en las ratas control hay un efecto significativo del tiempo, a concentraciones de 1 y 2 mM de AMPA ($p < 0.05$ y $p < 0.01$ respectivamente) (Figura 9, 10 y 11).

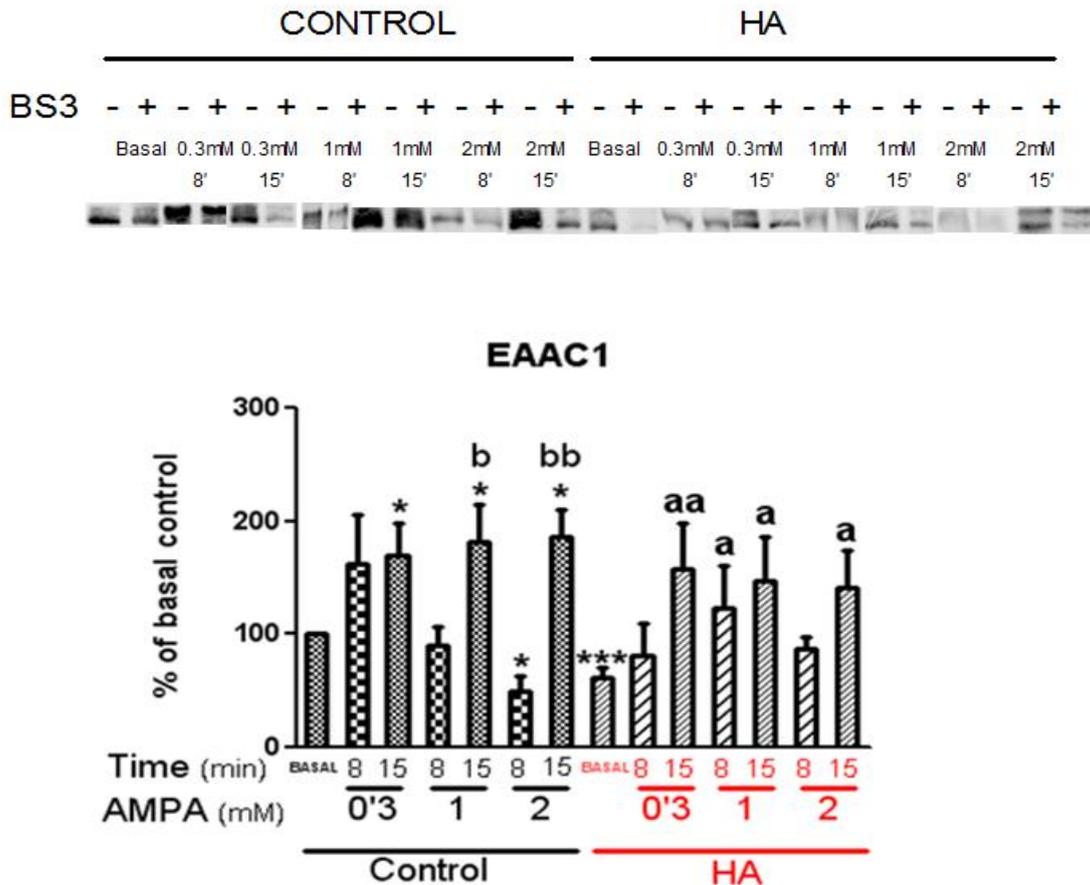


Figura 9. Expresión en membrana de EAAC1 tras la activación del receptor AMPA a diferentes dosis y tiempo en ratas control e hiperamonémicas. La expresión en membrana de EAAC1 en ratas control a los 8 minutos de tratamiento parece seguir un efecto dosis, disminuyendo su expresión hasta alcanzar niveles inferiores al basal a concentraciones de 2 mM. A los 15 minutos la expresión aumenta de forma similar a distintas concentraciones, desapareciendo el efecto dosis. En las ratas hiperamonémicas, a los 8 y 15 minutos de tratamiento se alcanzan niveles de expresión superiores al control basal, sin observarse el efecto dosis. Los datos son la media \pm error estándar de 15 ratas por grupo. *diferencia significativa respecto al control basal ($p < 0.05$); *** diferencia significativa respecto al control basal ($p < 0.001$); b diferencia significativa entre 8 y 15 minutos ($p < 0.05$); bb diferencia significativa entre 8 y 15 minutos ($p < 0.01$); a diferencia significativa respecto al basal de hiperamonemia ($p < 0.05$); aa diferencia significativa respecto al basal de hiperamonemia ($p < 0.01$)

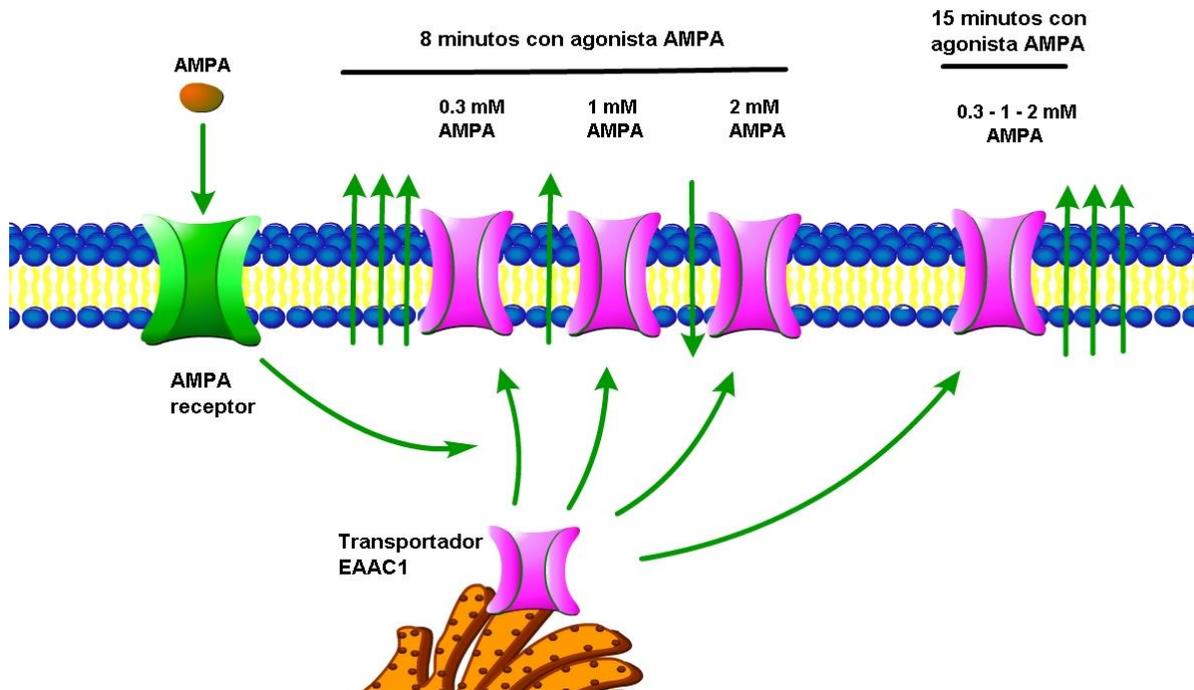


Figura 10. Resumen de la expresión en membrana del transportador EAAC1 tras la activación del receptor AMPA en ratas control. En el tratamiento de 8 minutos se observa un mayor aumento de la expresión de EAAC1 a concentraciones de 0.3 mM de AMPA, un menor aumento a concentraciones de 1 mM de AMPA y un descenso a concentraciones de 2 mM (efecto dosis). En el tratamiento de 15 minutos se observa un aumento de la expresión en membrana de EAAC1 que no se ve alterada por la dosis.

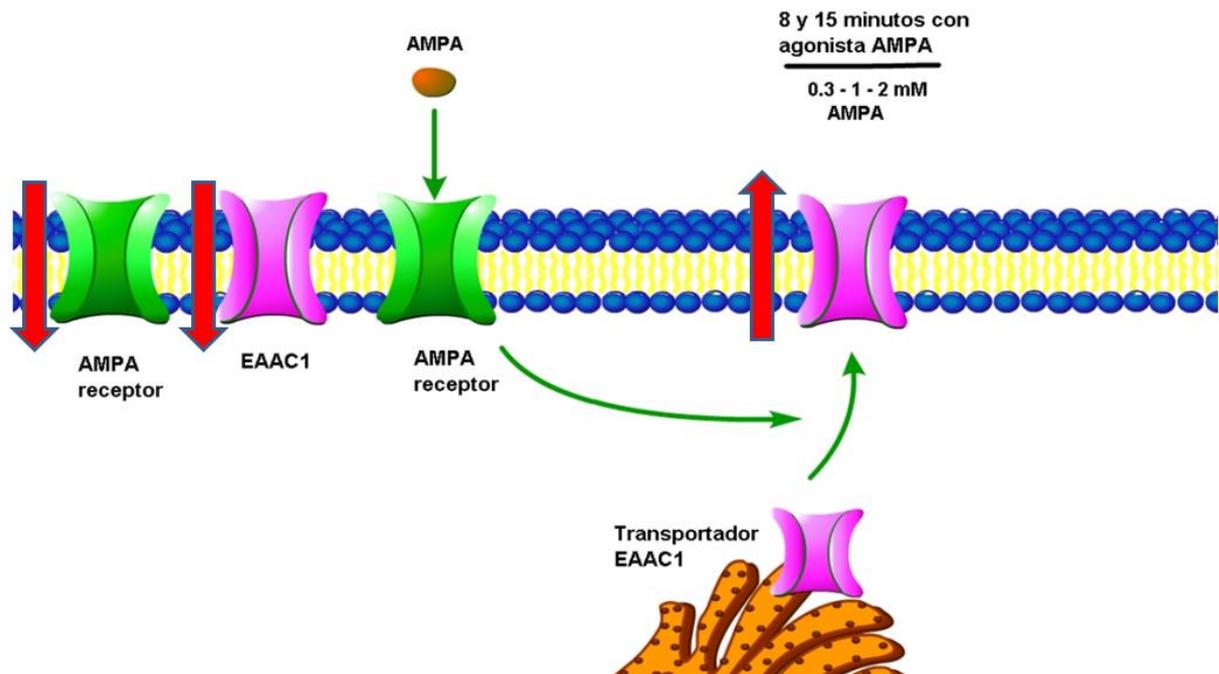


Figura 11. Resumen de la expresión en membrana del transportador EAAC1 tras la activación del receptor AMPA en ratas hiperamonémicas. En hiperamonemia tanto la expresión basal del receptor AMPA como la del transportador EAAC1 están disminuidas. La activación del receptor AMPA aumenta los niveles de expresión en membrana de EAAC1 alcanzando niveles significativamente aumentados respecto a su basal, independientemente de la concentración y el tiempo del tratamiento.

Para explicar estos resultados, y como se ha comentado anteriormente (ver Introducción), se pueden distinguir receptores AMPA de baja y alta afinidad. Los receptores AMPA de alta afinidad inhiben a los receptores NMDA a través de un mecanismo no ionotrópico basado en el estado de apertura del receptor AMPA (abierto, cerrado o desensibilizado) similar a un mecanismo de unión a ligando (Bai et al., 2002). Una inhibición de los receptores NMDA disminuirá la expresión en membrana de EAAC1. Esto explicaría el efecto dosis encontrado en el tratamiento con AMPA de 8 minutos en ratas control, en el que a mayor concentración menor expresión en membrana del transportador se observa.

Como altas concentraciones de AMPA inhibirían en mayor medida los receptores NMDA, este resultado concuerda con el obtenido por Cabrera-Pastor et al. (2012) donde la liberación de glutamato con 0.1 mM de AMPA fue mayor que a una concentración de 0.3 mM en ratas control. Trussell et al. (1993) demostraron que altas concentraciones de neurotransmisor podían desensibilizar los receptores AMPA. Otra posible explicación a este efecto dosis sería que el aumento de glutamato inducido tras la activación de los receptores AMPA, producirá una desensibilización de éstos a altas concentraciones de AMPA, lo que conduciría a la disminución de la expresión de EAAC1.

El efecto del tiempo de tratamiento sobre la expresión de EAAC1 en membrana en ratas control podría deberse a una estabilización de los niveles tras un periodo de adaptación. En las ratas hiperamonémicas no se observa efecto del tiempo ni de la dosis en los niveles de expresión del transportador, en todos los casos aumentan significativamente su expresión en membrana respecto a su basal.

Como conclusión final, podemos afirmar que la hiperamonemia crónica altera la expresión en membrana de receptores y transportadores. Ésto alterará la neurotransmisión sináptica y en consecuencia, contribuirá a las alteraciones de la función cognitiva y motora en pacientes con encefalopatía hepática.

5- CONCLUSIONES

1. La expresión en membrana de las subunidades NR1 y NR2A (receptor NMDA), GluR1 y GluR2 (receptor AMPA) y GABA α 1 (receptor GABA) está disminuida en cerebelo de ratas con hiperamonemia crónica.
2. La expresión en membrana de los transportadores de glutamato EAAC1 y Glt-1 está disminuida en cerebelo de ratas con hiperamonemia crónica.
3. La unión del agonista AMPA a su receptor modula la expresión del transportador de glutamato EAAC1 dependiendo de la dosis y el tiempo tratamiento.
4. En ratas con hiperamonemia crónica está alterada la modulación de la expresión del transportador de glutamato EAAC1 tras la activación del receptor AMPA.
5. La hiperamonemia crónica altera la expresión en membrana de receptores y transportadores, esto alterará la neurotransmisión sináptica y en consecuencia contribuirá a las alteraciones en la función cognitiva y motora en pacientes con encefalopatía hepática.

6- BIBLIOGRAFÍA

AGUSTI, A.; CAULI, O.; RODRIGO, R.; LLANSOLA, M.; HERNÁNDEZ-RABAZA, V.; & FELIPO, V. (2011). p38 MAP kinase is a therapeutic target for hepatic encephalopathy in rats with portacaval shunts. *Gut*, 60(11), 1572-1579.

AZORIN, I.; MINANA, MD.; FELIPO, V.; GRISOLIA, S. (1989) A simple animal model of hyperammonemia. *Hepatology* 10: 311-314

BAI, D.; MULLER, R. U.; & RODER, J. C. (2002). Non-ionotropic cross-talk between AMPA and NMDA receptors in rodent hippocampal neurones. *The Journal of physiology*, 543(1), 23-33.

BASILE, A. S. & JONES, E. A. (1997). Ammonia and GABA-ergic neurotransmission: Interrelated factors in the pathogenesis of hepatic encephalopathy. *Hepatology*, 25(6), 1303-1305.

BASS, N. M. et al. Rifaximin treatment in hepatic encephalopathy. *N. Engl. J. Med.* 362,1071–1081 (2010).

BENDER, A. S. & NOREMBERG, M. D. (2000). Effect of ammonia on GABA uptake and release in cultured astrocytes. *Neurochemistry international*, 36(4), 389-395.

BENKE, T. A.; LÜTHI, A.; ISAAC, J. T.; & COLLINGRIDGE, G. L. (1998). Modulation of AMPA receptor unitary conductance by synaptic activity. *Nature*, 393(6687), 793-797.

BOEHM, J.; Kang, MG.; JOHNSON, RC.; ESTEBAN, J.; HUGANIR, RL.; and MALINOW, R. (2006) Synaptic incorporation of AMPA receptors during LTP is controlled by a PKC phosphorylation site on GluR1. *Neuron* 51:213–225.

BOIX, J.; CAULI, O.; & FELIPO, V. (2010). Developmental exposure to polychlorinated biphenyls 52, 138 or 180 affects differentially learning or motor coordination in adult rats. Mechanisms involved. *Neuroscience*, 167(4), 994-1003.

BUTTERWORTH, R. F.; NOREMBERG, M. D.; FELIPO, V.; FERENCI, P.; ALBRECHT, J.; & BLEI, A. T. (2009). Experimental models of hepatic encephalopathy: ISHEN guidelines. *Liver International*, 29(6), 783-788.

BUTTERWORTH, R. F. (2002). Pathophysiology of hepatic encephalopathy: a new look at ammonia. *Metabolic brain disease*, 17(4), 221-227.

- CABRERA-PASTOR, A.; LLANSOLA, M.; REZNIKOV, V.; BOIX, J.; 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: 63-71
- CAULI, O. et al. (2013). Cerebral edema is not responsible for motor or cognitive deficits in rats with hepatic encephalopathy. *Liver Int.* <http://dx.doi.org/10.1111/liv.12258>
- CAULI, O.; Rodrigo, R.; LLANSOLA, M.; MONTOLIU, C.; MONFORT, P.; PIEDRAFITA, B., ... & FELIPO, V. (2009a). Glutamatergic and gabaergic neurotransmission and neuronal circuits in hepatic encephalopathy. *Metabolic brain disease*, 24(1), 69-80.
- CAULI, O.; RODRIGO, R.; BOIX, J.; PIEDRAFITA, B.; AGUSTI, A.; & FELIPO, V. (2008). Acute liver failure-induced death of rats is delayed or prevented by blocking NMDA receptors in brain. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 295(3), G503-G511.
- CAULI, O.; MANSOURI, M. T.; AGUSTI, A.; & FELIPO, V. (2009b). Hyperammonemia increases GABAergic tone in cerebellum but decreases it in rat cortex. *Gastroenterology* 136, 1359–1367
- CHIU, CS.; Brickley, S.; JENSEN, K.; Southwell, A.; MCKINNEY, S.; CULL-CANDY, S.; MODY, I.; LESTER, HA. (2005). GABA transporter deficiency causes tremor, ataxia, nervousness, and increased GABA induced tonic conductance in cerebellum. *JNeurosci* 25: 3234-3245
- CLEMMESSEN, J.O.; LARSEN, F.S.; KONDRUP, J.; HANSEN, B.A.; OTT, P. (1999). Cerebral herniation in patients with acute liver failure is correlated with arterial ammonia concentration. *Hepatology* 29: 648-653
- CONN, H. & LIEBERTHAL, M. M. (1979). Assessment of mental state. *The Hepatic Coma Syndromes and Lactulose*. 1st Ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 169-88.
- COOKE, S. F.; & BLISS, T. V. P. (2006). Plasticity in the human central nervous system. *Brain*, 129(7), 1659-1673.
- CORBALÁN, R. et al., (2002) Region selective alterations of soluble guanylate cyclase content and modulation in brain of cirrhotic patients. *Hepatology*. 36, 1155–1162.
- DE KNEGT, R. J.; SCHALM, S. W.; VAN DER RIJ, C. C.; FEKKES, D., DALM, E.; & HEKKING-WEYMA, I. (1994). Extracellular brain glutamate during acute liver failure and

during acute hyperammonemia simulating acute liver failure: an experimental study based on in vivo brain dialysis. *Journal of hepatology*,20(1), 19-26.

EL-MLILI, N.; RODRIGO, R.; NAGHIZADEH, B.; CAULI, O. & FELIPO, V. (2008). Chronic hyperammonemia reduces the activity of neuronal nitric oxide synthase in cerebellum by altering its localization and increasing its phosphorylation by calcium-calmodulin kinase II. *J. Neurochem.* 106,1440–1449

ERCEG, S.; et al. (2005) Oral administration of sildenafil restores learning ability in rats with hyperammonemia and with portacaval shunt. *Hepatology* 45, 2–10.

ESTEBAN, J.A.; SHI, S.H.; WILSON, C.; NURIYA, M.; HUGANIR, R.L.; and MALINOW, R. (2003) PKA phosphorylation of AMPA receptor subunits controls synaptic trafficking underlying plasticity. *Nat Neurosci* 6:136–143.

FELIPO, V. (2013) Hepatic encephalopathy: effects of liver failure on brain function. *Nature Reviews Neuroscience.* 14, 851–858

FELIPO, V.; MIÑANA, M. D.; & GRISOLIA, S. (1988). Paradoxical protection of both protein-free and high protein diets against acute ammonium intoxication. *Biochemical and biophysical research communications*, 156(1), 506-510.

GIBSON, G.E.; ZIMMER, A.; KROOK, L.; RICHARDSON, E.P.; VISEK, W.J. (1974). Brain histology and behavior of mice injected with urease. *J Neuropathol Exp Neurol* 33: 201-211

GORDON, N. (2007). The cerebellum and cognition. *Eur J Paediatr Neurol* 11: 232-234

HANCHAR, H.J.; DODSON, P.D.; OLSEN, R.W.; OTIS, T.S.; WALLNER, M. (2005). Alcohol-induced motor impairment caused by increased extrasynaptic GABA(A) receptor activity. *Nat Neurosci* 8: 339-345

HERMENEGILDO, C.; MONTOLIU, C.; LLANSOLA, M.; MUÑOZ, M. D.; GAZTELU, J. M.; MIÑANA, M. D.; & FELIPO, V. (1998). Chronic hyperammonemia impairs the glutamate–nitric oxide–cyclic GMP pathway in cerebellar neurons in culture and in the rat in vivo. *European Journal of Neuroscience*, 10(10), 3201-3209.

JALAN, R. et al. (2004). Moderate hypothermia in patients with acute liver failure and uncontrolled intracranial hypertension. *Gastroenterology* 127, 1338–1346

KALE, R. A. et al. (2006). Demonstration of interstitial cerebral edema with diffusion tensor MR imaging in type C HE. *Hepatology* 43, 698–706

- LIN, D.T.; MAKINO, Y.; SHARMA, K.; HAYASHI, T.; NEVE, R.; TAKAMIYA, K.; and HUGANIR, R.L. (2009). Regulation of AMPA receptor extrasynaptic insertion by 4.1N, phosphorylation and palmitoylation. *Nat Neurosci* 12:879–887.
- LIU, S. J.; & CULL-CANDY, S. G. (2005). Subunit interaction with PICK and GRIP controls Ca²⁺ permeability of AMPARs at cerebellar synapses. *Nature neuroscience*, 8(6), 768-775.
- LLANSOLA, M.; RODRIGO, R.; MONFORT, P.; MONTOLIU, C.; KOSENKO, E.; CAULI, O.; ... & FELIPO, V. (2007). NMDA receptors in hyperammonemia and hepatic encephalopathy. *Metabolic brain disease*, 22(3-4), 321-335.
- LLANSOLA, M.; RODRIGO, R.; CAULI, O.; EL MLILI, N.; & FELIPO, V. (2006) Differential alterations of glutamate receptors in different rat brain areas in chronic hyperammonemia.
- MALINOW, R., & MALENKA, R. C. (2002). AMPA receptor trafficking and synaptic plasticity. *Annual review of neuroscience*, 25(1), 103-126.
- MAN, H.Y.; SEKINE-AIZAWA, Y.; and HUGANIR, R.L. (2007) Regulation of {alpha}-amino-3- hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor trafficking through PKA phosphorylation of the Glu receptor 1 subunit. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:3579– 3584
- MARTIN, L.A.; GOLDOWITZ, D.; MITTLEMAN, G. (2003). The cerebellum and spatial ability: dissection of motor and cognitive components with a mouse model system. *Eur J Neurosci* 18: 2002-2010
- MONFORT, P.; MUNOZ, M.D.; KOSENKO, E.; FELIPO, V. (2002). Long-term potentiation in hippocampus involves sequential activation of soluble guanylate cyclase, cGMPdependent protein kinase, and cGMP-degrading phosphodiesterase. *J Neurosci* 22: 10116-10122
- MONFORT, P. et al. (2009) Transport of AMPA receptors during long-term potentiation is impaired in rats with hepatic encephalopathy. *Neurochemistry International*. 55, 514-520
- MONFORT, P.; MUÑOZ, M. D.; ELAYADI, A.; KOSENKO, E.; & FELIPO, V. (2002). Effects of hyperammonemia and liver failure on glutamatergic neurotransmission. *Metabolic brain disease*, 17(4), 237-250.
- MONFORT, P.; ERCEG, S.; PIEDRAFITA, B.; LLANSOLA, M.; & 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.

- MONTOLIU, C. et al. (2009) IL-6 and IL-18 in blood may discriminate cirrhotic patients with and without minimal hepatic encephalopathy. *Journal of Clinical Gastroenterology*. 43(3) 272-9.
- NORENBERG, M.D. (1987). The role of astrocytes in hepatic encephalopathy. *Neurochem Pathol* 6: 13-33
- NORENBERG, M. D.; HUO, Z.; NEARY, J. T.; & ROIG-CANTESANO, A. (1997). The glial glutamate transporter in hyperammonemia and hepatic encephalopathy: relation to energy metabolism and glutamatergic neurotransmission. *Glia*, 21(1), 124-133.
- ODEH, M. et al. (2004) Serum levels of tumor necrosis factor-alpha correlate with severity of hepatic encephalopathy due to chronic liver failure. *Liver International*. 24(2) 110-6.
- RAGHAVENDRA; RAO V. L.; BAŞKAYA, M. K.; DOĞAN, A.; ROTHSTEIN, J. D.; & DEMPSEY, R. J. (1998). Traumatic brain injury down-regulates glial glutamate transporter (GLT-1 and GLAST) proteins in rat brain. *Journal of neurochemistry*,70(5), 2020-2027.
- RODRIGO, R. 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, 435–43.
- RODRIGO, R.; CAULI, O.; GOMEZ-PINEDO, U.; AGUSTI, A.; HERNANDEZ-RABAZA, V.; GARCIA-VERDUGO, J.M.; FELIPO, V. (2010). Hyperammonemia induces neuroinflammation that contributes to cognitive impairment in rats with hepatic encephalopathy. *Gastroenterology* 139: 675-684
- SALONEN, V.; KALLINEN, S.; LOPEZ-PICON, F. R.; KORPI, E. R.; HOLOPAINEN, I. E.; & UUSI-OUKARI, M. (2006). AMPA/kainate receptor-mediated up-regulation of GABA A receptor δ subunit mRNA expression in cultured rat cerebellar granule cells is dependent on NMDA receptor activation. *Brain research*, 1087(1), 33-40.
- SCHAFFER, D.F.; JONES, E.A. (1982). Hepatic encephalopathy and the gamma-aminobutyric-acid neurotransmitter system. *Lancet* 1: 18-20
- 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* 45:755–767.
- SCOTT, D.B.; BLANPIED, T.A.; SWANSON, G.T.; ZHANG. C. and EHLERS MD (2001) An NMDA receptor ER retention signal regulated by phosphorylation and alternative splicing. *J Neurosci* 21:3063–3072

- SUAREZ, I.; BODEGA, G.; & FERNANDEZ, B. (1997). Modulation of AMPA receptor subunits GluR1 and GluR2/3 in the rat cerebellum in an experimental hepatic encephalopathy model. *Brain research*, 778(2), 346-353.
- SUAREZ, I.; BODEGA, G.; & FERNANDEZ, B. (2000). Modulation of glutamate transporters (GLAST, GLT-1 and EAAC1) in the rat cerebellum following portocaval anastomosis. *Brain research*, 859(2), 293-302.
- TINGLEY, W. G.; EHLERS, M. D.; KAMEYAMA, K.; DOHERTY, C.; PTAK, J. B.; RILEY, C. T.; & HUGANIR, R. L. (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. *Journal of Biological Chemistry*, 272(8), 5157-5166.
- TRAYNELIS, S. F.; WOLLMUTH, L. P.; MCBAIN, C. J.; MENNITI, F. S.; VANCE, K. M.; OGDEN, K. K.; ... & DINGLEDINE, R. (2010). Glutamate receptor ion channels: structure, regulation, and function. *Pharmacological reviews*, 62(3), 405-496.
- VAQUERO, J.; & BUTTERWORTH, R. F. (2006). The brain glutamate system in liver failure. *Journal of neurochemistry*, 98(3), 661-669.
- VEZINA, P.; & KIM, J. H. (1999). Metabotropic glutamate receptors and the generation of locomotor activity: interactions with midbrain dopamine. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 23(4), 577-589.
- VITHLANI, M.; TERUNUMA, M.; & MOSS, S. J. (2011). The dynamic modulation of GABAA receptor trafficking and its role in regulating the plasticity of inhibitory synapses. *Physiological reviews*, 91(3), 1009-1022.
- WAXMAN, E. A.; BACONGUIS, I.; LYNCH, D. R.; & 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.
- WEISSENBORN, K. et al. (2001) Neuropsychological characterization of hepatic encephalopathy. *Hepatology*. 34(5) 768-773
- WIGGS, C.L.; WEISBERG, J.; MARTIN, A. (1999). Neural correlates of semantic and episodic memory retrieval. *Neuropsychologia* 37: 103-118
- XIN, W. K.; KWAN, C. L.; ZHAO, X. H.; XU, J.; ELLEN, R. P.; MCCULLOCH, C. A.; & YU, X. M. (2005). A functional interaction of sodium and calcium in the regulation of NMDA receptor activity by remote NMDA receptors. *The Journal of neuroscience*, 25(1), 139-148.

YONDEN, Z.; AYDIN, M.; KILBAS, A.; DEMIRIN, H.; SUTCU, R.; & DELIBAS, N. (2010). Effects of ammonia and allopurinol on rat hippocampal NMDA receptors. *Cell biochemistry and function*, 28(2), 159-163.