



PRINCIPE FELIPE
CENTRO DE INVESTIGACION



UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍA AGRONÓMICA Y DEL MEDIO NATURAL

TRABAJO DE FIN DE GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

Caracterización de la neuroinflamación en ratas
hiperamonémicas y efecto del tratamiento con infliximab
durante 8 semanas

REALIZADO POR:

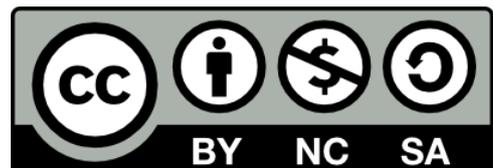
Ponce Mora, Alejandro

TUTORES:

Marta Llansola Gil y Tiziano Balzano

TUTORA ACADÉMICA:

Pilar Hernández Pérez



Valencia, 16 de junio de 2017

Alumno: Alejandro Ponce Mora

Tutores: Marta Llansola Gil y Tiziano Balzano

Tutor Académico: Pilar Hernández Pérez

Localidad y fecha: Valencia, junio de 2017

Título: Caracterización de la neuroinflamación en ratas hiperamonémicas y efecto del tratamiento con infliximab durante 8 semanas

Resumen

La encefalopatía hepática (EH) hace referencia al conjunto de anormalidades neuropsiquiátricas que están asociadas con el fallo en la función hepática. Se trata de un síndrome que está caracterizado por la existencia de deterioro psicomotor, intelectual y cognitivo. Está causado por la acumulación en el flujo sanguíneo de sustancias tóxicas que normalmente son eliminadas por el hígado. Una de estas moléculas, el amonio, juega un papel fundamental en la patogénesis de la enfermedad. Su acumulación provoca un estado de hiperamonemia, que junto con la inflamación periférica induce neuroinflamación, contribuyendo así al deterioro cognitivo y motor. Los objetivos de este trabajo son: estudiar el efecto de la hiperamonemia sobre la inflamación periférica, caracterizar la neuroinflamación y el deterioro cognitivo en ratas hiperamonémicas y, por último, evaluar el efecto del tratamiento con infliximab sobre la inflamación periférica, la neuroinflamación y el deterioro cognitivo. Para alcanzar estos objetivos, se utiliza un modelo de hiperamonemia sin fallo hepático en ratas, obtenido con una dieta enriquecida con amonio. A lo largo del trabajo se desarrollan diferentes metodologías. En primer lugar, se recurre a técnicas de inmunohistoquímica, a nivel tanto de cerebelo como de hipocampo. Para ello, se emplean cuatro anticuerpos: anti-Iba-1 como marcador de la microglía, anti-GFAP, marcador específico de los astrocitos y anti-TNF- α y anti-IL-1 β , anticuerpos cuya diana son dos citocinas inflamatorias fundamentales. Asimismo, para estudiar la inflamación periférica, se analizan algunos factores inflamatorios en plasma sanguíneo mediante técnicas de Western Blot. Por último, para evaluar el deterioro cognitivo, se implementa el laberinto radial de 8 brazos, un test para evaluar el aprendizaje y memoria espaciales.

Palabras clave

Encefalopatía hepática, Hiperamonemia, Inflamación periférica, Neuroinflamación, Astrocitos, Microglía, Inmunohistoquímica, Infliximab

Student: Alejandro Ponce Mora

Tutors: Marta Llansola Gil y Tiziano Balzano

Professor: Pilar Hernández Pérez

Date: Valencia, June 2017

Title: Characterization of neuroinflammation in hiperammonemic rats and the effects of treatment with infliximab during 8 weeks

Abstract

Hepatic Encephalopathy (HE) refers to the set of neuropsychiatric abnormalities which are related to hepatic failure. This syndrome is characterized by psychomotor, intellectual and cognitive impairment. It's caused by the accumulation in the blood flow of toxic compounds that are, in normal conditions, detoxified by the liver. The ammonia, one of these compounds, play an essential role in the pathogenesis of this syndrome. Its accumulation leads to hiperamonemia, which acts synergistically with peripheral inflammation, inducing to neuroinflammation, and so, to motor and cognitive impairment. The aims of this project are: to study the effects of hyperammonemia on peripheral inflammation, to characterize the neuroinflammation and cognitive impairment in hyperammonemic rats and to study the effects of the infliximab treatment on the peripheral inflammation, neuroinflammation and cognitive impairment. In order to reach these aims, rats were used as an animal model of chronic hyperammonemia without liver failure. The rats were made hyperammonemic by being feed with an ammonia high level diet. Over the project different working methods were performed. Firstly, an immunochemistry assay was performed in the hippocampus and cerebellum to analyze neuroinflammation. Four different antibodies were used: anti-Iba-1 as a marker of microglia, anti-GFAP to study specifically the astrocytes, anti-TNF- α and anti-IL-1 β , two antibodies which target are two central cytokines. In addition, in order to evaluate the peripheral inflammation, inflammatory factors in blood plasma were studied by Western Blot. Finally, to assess the cognitive impairment, the radial maze was implemented, a learning and memory spatial task.

Key words

Hepatic encephalopathy, Hyperammonemia, Peripheral inflammation, Neuroinflammation, Astrocyte, Microglia, Inmuhistochemistry, Infliximab

Agradecimientos

En este apartado me gustaría mencionar a algunas de las muchas personas que me han ayudado a lo largo de los 4 años de carrera y/o durante la realización de este trabajo.

- En primer lugar, quería dar las gracias a Vicente Felipo por haberme permitido realizar el trabajo en el laboratorio de Neurobiología.
- Me gustaría agradecer también el trato recibido por todos los componentes del laboratorio. Han sido unos meses fantásticos en los que me he sentido muy cómodo y he aprendido mucho.
- El papel que han tenido Marta y Tiziano en este trabajo ha sido fundamental. A Marta me gustaría darle las gracias por ayudarme a dar los primeros pasos y por su interés e implicación en mi trabajo. Tiziano se ha convertido en un referente tanto a nivel personal como profesional. Gracias por tu esfuerzo y tu infinita paciencia.
- Me gustaría dar las gracias a mis amigos y compañeros de clase. No podría haber tenido más suerte con vosotros.
- Aprovecho también para mencionar a mis amigos Danny, Tomás y Borja. Amistades verdaderas, de esas en las que solo es necesario una mirada para entenderse. Ha sido maravilloso contar con vosotros.
- Estoy muy agradecido también a mi amigo Pascual. Por haber compartido tantos momentos, por confiar en mí y por estar siempre ahí. Durante estos 4 largos años hemos sufrido y disfrutado, pero siempre ha sido juntos, uña y carne, y ha sido un verdadero placer. Gracias por ser cómo eres.
- Debo decir también que la culpa de todo la tienen mis padres. No sería quién soy si no fuera por vosotros: cualquier logro mío es automáticamente vuestro. Agradezco de todo corazón vuestro apoyo incondicional.
- Por último, me gustaría mencionar a mi hermano Alberto, por ser un referente y un ejemplo en todos los sentidos. Eres mi farero, mi luz en los momentos más oscuros.

Índice

1. Introducción	1
1.1. Encefalopatía hepática	1
1.2. Patogénesis de la encefalopatía hepática	2
1.2.1 Amonio y EH	3
1.2.2. Inflamación periférica	4
1.2.3. Neuroinflamación y EH.....	5
1.2.4. Citocinas proinflamatorias	8
1.3. Infliximab	9
2. Objetivos	10
3. Materiales y métodos	11
3.1. Modelo de hiperamonemia crónica y tratamiento con infliximab	11
3.2. Esquema del diseño experimental	12
3.3. Análisis de la inflamación periférica.....	12
3.3.1. Obtención de plasma.	12
3.3.2. Determinación de los niveles de amonio en sangre	12
3.3.3. Análisis de los factores inflamatorios periféricos mediante Western Blot.....	13
3.4. Análisis de la neuroinflamación	14
3.4.1. Inmunohistoquímica	14
3.4.2. Cuantificación de la inmunohistoquímica	15
3.5. Aprendizaje y memoria espaciales.....	17
3.5.1. Laberinto radial de 8 brazos.....	17
3.6. Análisis estadístico	17
4. Resultados	18
4.1. Caracterización de la neuroinflamación.....	18
4.1.1. Hipocampo	18
4.1.2. Cerebelo	21
4.2. Niveles de amonio en sangre y caracterización de la inflamación periférica.	25
4.2.1. Niveles de amonio en sangre	25
4.2.2. Factores inflamatorios en sangre.....	26
4.3. Test de memoria y aprendizaje espaciales	28
5. Discusión	30
5.1. Niveles de amonio e inflamación periférica.....	30

5.2. Neuroinflamación.....	31
5.3. Deterioro cognitivo	32
5.4. Efecto del infliximab.....	33
6. Conclusiones.....	35
7. Bibliografía	36

Índice de tablas

Tabla 1. Citocinas analizadas para estudiar la inflamación periférica y anticuerpos utilizados para tal efecto.....	13
---	----

Índice de figuras

Figura 1. La hiperamonemia actúa conjuntamente con la inflamación periférica para inducir la neuroinflamación.....	2
Figura 2. Diseño del experimento.....	12
Figura 3. Fotografía de células de la microglía y fotografía de su correspondiente máscara.....	16
Figura 4. Expresión de Iba-1 en hipocampo.....	18
Figura 5. Expresión de GFAP en hipocampo.....	19
Figura 6. Expresión de IL-1 β en la región CA1 de hipocampo.....	20
Figura 7. Expresión de Iba-1 en cerebelo.....	21
Figura 8. Expresión de GFAP en cerebelo.....	22
Figura 9. Expresión de IL-1 β en cerebelo.	23
Figura 10. Expresión de TNF- α en cerebelo.....	24
Figura 11. Progresión de los niveles de amonio en sangre medidos en μ M durante las 8 semanas del experimento.....	26
Figura 12. Niveles de IL-6 en el plasma.....	27
Figura 13. Niveles de IL-17 en el plasma.....	27
Figura 14. Niveles de IL-10 en plasma.....	28
Figura 15. Resultados del laberinto radial de 8 brazos.....	29

1. Introducción

1.1. Encefalopatía hepática

En nuestro organismo, el hígado es el principal órgano encargado de la detoxificación. Desempeña un papel crucial en la eliminación tanto de sustancias endógenas resultado del metabolismo, así como de sustancias exógenas. Como consecuencia de un fallo en la función hepática, se pueden originar trastornos serios. El daño hepático, por tanto, es un suceso especialmente delicado, por lo que ha sido clasificado en fallo hepático agudo (FHA) y daño hepático crónico (DHC). El FHA hace referencia al daño hepático de carácter grave que suele afectar a pacientes que no presentan ninguna enfermedad hepática anterior (Bernal y Wendon, 2013). El DHC se refiere a un proceso de degeneración progresiva del parénquima hepático, llevando a fibrosis y posteriormente a un estado de cirrosis.

Es bien conocido el hecho de que, cuando el hígado falla, la función cerebral se ve afectada. La deficiente o nula detoxificación por parte del hígado puede provocar que determinados compuestos alcancen el cerebro y afecten la función cerebral. El amonio, como se verá más adelante, juega un papel crucial (Felipo, 2013). La encefalopatía hepática (EH) es un síndrome que se asocia con un conjunto de irregularidades neuropsiquiátricas vistas en pacientes con disfunción hepática, en los que se ha descartado cualquier otro trastorno neurológico potencial. Se trata de un trastorno caracterizado por anomalías psicomotoras, intelectuales y cognitivas. Asimismo, está asociado con irregularidades emocionales, afectivas y conductuales (Cichoż-Lach y Michalak, 2013). La EH se puede clasificar en 3 grandes grupos según el *World Congress of Gastroenterology*, celebrado en 2002. El primer grupo, conocido como tipo A, hace referencia a aquellos pacientes que manifiestan la enfermedad a causa de un FHA. Del mismo modo, el tipo B hace referencia a aquella que aparece en pacientes sin enfermedad hepatocelular intrínseca. Por último, el tipo C engloba a aquellos pacientes que presentan una enfermedad crónica hepática (Ferenci et al., 2002).

También existe otra clasificación que permite evaluar la gravedad de los síntomas presentados: la escala de West Haven. Se trata de un método arbitrario que establece 4 estadios de EH clínica basados en las alteraciones del estado de consciencia, de la función intelectual, de la conducta y en los síntomas neuromusculares (Koff y Mullen, 1994). Los pacientes con el grado 1 presentan cambios en el comportamiento, alteraciones mínimas de consciencia, pérdida de la capacidad de atención, entre otros síntomas. El grado 2 implica la desorientación espacial y temporal, comportamiento inadecuado y cambios en la personalidad. Los pacientes caracterizados con el grado 3 se encuentran en estado de somnolencia. Además, se caracterizan por la desorientación y confusión que presentan. No obstante, responden a los estímulos verbales. Por último, el grado 4 hace referencia al estado de coma. Este criterio de clasificación puede resultar subjetivo en determinados casos, lo que puede suponer una desventaja en la práctica clínica. Recientemente, se han planteado nuevos criterios adaptados, como por ejemplo el *Hepatic Encephalopathy Scaling Algorithm* (HESA) (Córdoba, 2011). Este método permite evaluar los criterios de West Haven de una manera más objetiva.

Por otra parte, los pacientes sin síntomas evidentes de EH pueden presentar encefalopatía hepática mínima (EHM). Este tipo de pacientes presentan deterioro cognitivo leve, déficit de atención, alteración en la velocidad psicomotora y en la percepción visoespacial. Asimismo, presentan dificultades para procesar información y para responder ante estímulos (Stinton y Jayakumar, 2013). Se estima que la EHM está presente entre el 33% y el 50% de los pacientes cirróticos y que potencialmente puede afectar al 80% de las personas con dicha afección hepática (Felipo, 2013). La incidencia de las enfermedades hepáticas crónicas, como por ejemplo la cirrosis, sitúa a la EHM como un trastorno de especial relevancia. Es importante destacar que no se trata solo de un problema médico sino que también reduce la capacidad del paciente de realizar tareas cotidianas, afectando así al ámbito social y económico. Dado que estos síntomas no pueden ser detectados mediante un examen neurológico estándar, se ha llegado al consenso de evaluar la EHM mediante una batería de test psicométricos conocida con el nombre de PHES (*Psychometric Hepatic Encephalopathy Score*) (Weissenborn et al., 2001). Se trata de una metodología validada y estandarizada que permite una evaluación completa en menos de 20 minutos. Es una metodología denominada “de lápiz y papel”, es decir, no computarizada. Permite medir la velocidad y precisión psicomotora, la concentración, la capacidad de construcción visual, la atención y la memoria (Nabi y Bajaj, 2013). El PHES consta de 5 test psicométricos: el test de la clave de números, test de la conexión numérica A, test de la conexión numérica B, test de puntos seriados y el test de la línea quebrada.

1.2. Patogénesis de la encefalopatía hepática

La EH es un trastorno complejo y multifactorial. Los mecanismos patogénicos que caracterizan a la enfermedad no se han descubierto por completo. No obstante, se sabe que la hiperamonemia, la inflamación periférica y la neuroinflamación tienen especial relevancia en la patogénesis del síndrome. La hiperamonemia, que tiene un papel central en la EH, actúa de manera sinérgica con la inflamación periférica, contribuyendo ambas a la aparición de la neuroinflamación, la cual se ha visto que es la responsable del deterioro cognitivo y motor que está asociado con la EH (Montoliu et al., 2015). En la siguiente figura, extraída de (Montoliu et al., 2015) se ilustra la relación expuesta:

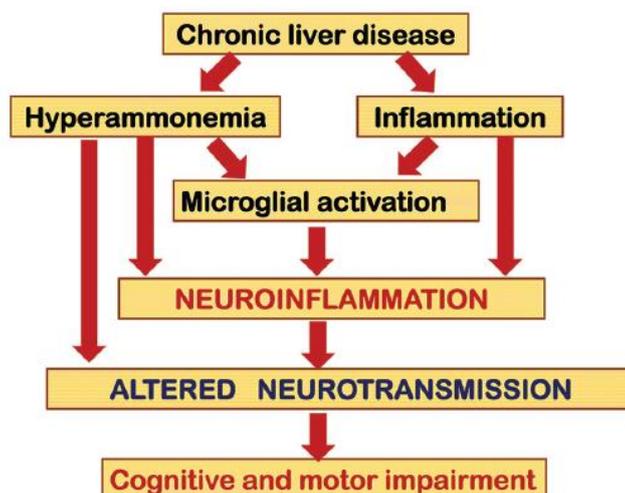


Figura 1: La hiperamonemia actúa conjuntamente con la inflamación periférica para inducir la neuroinflamación. Como consecuencia de un trastorno en la función hepática se genera un estado de hiperamonemia y una respuesta inflamatoria. Estos dos factores actúan de manera sinérgica para conducir a la activación de la microglía y a la neuroinflamación, las cuales alteran la neurotransmisión y por tanto estimulan el deterioro cognitivo y motor asociado con la EH.

1.2.1 Amonio y EH

El amonio es un subproducto del metabolismo de los compuestos nitrogenados y está involucrado en un gran número de reacciones metabólicas. Se caracteriza por su capacidad de generar toxicidad en muchas regiones del organismo. El amonio puede generarse en el organismo de múltiples formas. Proviene fundamentalmente del metabolismo microbiano de las proteínas y de la urea, que ocurre en el colon (Williams, 2007). Del mismo modo, se puede originar también a raíz del metabolismo microbiano de la glutamina en el intestino delgado y, en menor medida, el metabolismo del músculo esquelético y el metabolismo renal también están implicados en la producción de amonio (Cichoż-Lach y Michalak, 2013). En condiciones normales, el amonio es conducido mediante la circulación hacia el hígado, el órgano encargado de su procesamiento. En el hígado, el amonio se convierte en urea, mediante un proceso conocido con el nombre de ciclo de la urea. También, puede ser transformado a glutamina mediante el enzima glutamina sintetasa que se encuentra en los hepatocitos. Posteriormente, el amonio metabolizado será excretado mediante la orina. Atendiendo a lo anterior, un fallo hepático se traducirá en una detoxificación incorrecta del amonio. Este hecho va a provocar un incremento de la concentración plasmática de esta molécula. En presencia de un pH alcalino, el amonio es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica (BHE), alcanzando el cerebro y provocando las alteraciones estructurales y funcionales que se relacionan con la EH (Tapper et al., 2017).

La acumulación de amonio en la sangre se traduce en un estado de hiperamonemia. En este sentido, el amonio está directamente relacionado con la fisiopatología cerebral. Uno de los mecanismos por los que el amonio induce toxicidad está mediado por los astrocitos. La glutamina sintetasa juega un papel fundamental. Se trata de una enzima que sintetiza glutamina a partir de glutamato y amonio. Los astrocitos son las únicas células cerebrales que presentan esta enzima y que pueden metabolizar el amonio. Un aumento en los niveles de amonio induce una mayor producción de glutamina, acumulándose esta en los astrocitos. Como consecuencia directa, los astrocitos aumentan su osmolaridad intracelular, favorecen la entrada de agua y, por tanto, aumentan su volumen, proceso conocido con el nombre de edematización de los astrocitos (Häussinger et al., 2000). Este proceso está relacionado con la aparición de edema cerebral y el aumento de la presión intracraneal, típicos de la EH.

La presencia de amonio en las mitocondrias de los astrocitos fomenta la aparición de estrés oxidativo y nitrosativo (Cichoż-Lach y Michalak, 2013). Los receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) son uno de los mediadores de este proceso. En presencia de amonio, los astrocitos incrementan la producción de especies reactivas del nitrógeno (RNS) y de especies reactivas del oxígeno (ROS). La hiperamonemia incrementa la producción de receptores NMDA,

dando lugar a la menor producción de enzimas antioxidantes y aumentando así la presencia de moléculas tóxicas (Norenberg et al., 2004). Por otro lado, se ha comprobado que la glutamina, producida por la glutamina sintetasa, es capaz de incrementar la producción de RNS y ROS. Al entrar en la mitocondria del astrocito es capaz de estimular la generación de radicales libres mediante rutas dependientes de calcio (Albrecht y Norenberg, 2006). Los RNS y ROS están también involucrados en la oxidación del RNA, provocando alteraciones en la expresión proteica. Estas especies reactivas también median la nitrosilación de tirosinas, afectando así a la permeabilidad de la BHE.

El amonio genera un estado neuroinhibitorio, característica patológica de la EH. Esta molécula provoca la depolarización de las neuronas, la inactivación de sus bombas de extrusión de cloro, la supresión de la formación del potencial post-sináptico inhibitorio y la alteración del potencial de reposo de las membranas celulares (Basile y Jones, 1997)

La hiperamonemia conduce también a la generación de neuroesteroides (Cauli et al., 2008). Se trata de un tipo de esteroides del sistema nervioso central. Estas moléculas pueden interferir y modificar la actividad neuronal modulando su excitabilidad. Este hecho se fundamenta en su capacidad de unirse a los receptores de los neurotransmisores. Por otro lado, se ha comprobado que la hiperamonemia tiene efectos sobre el metabolismo energético cerebral. El amonio influye en el transporte de sustratos metabólicos como la glucosa pero también de los precursores de óxido nítrico (NO) y de aminoácidos.

1.2.2. Inflamación periférica

Un aspecto relevante es que la hiperamonemia por sí sola no explica todos los desórdenes que caracterizan a la EH. En este sentido, la inflamación periférica juega un papel importante en la encefalopatía hepática. Se cree que existe una sinergia entre la inflamación periférica y la hiperamonemia, dos factores que actúan conjuntamente dando lugar a la neuroinflamación (Shawcross et al., 2007; Montoliu et al., 2009; Felipo et al., 2011).

Como consecuencia del daño hepático, se generará un estado de inflamación sistémica. Se genera una cascada de inflamación, que se le conoce con el nombre de Síndrome de Respuesta Inflamatoria Sistémica (SRIS). En este escenario, el nivel de citocinas proinflamatorias aumenta y puede afectar a la función cerebral, mediante la señalización al cerebro a través de distintas vías. La inflamación periférica puede ser evaluada mediante el estudio de los niveles de interleucinas, entre las que destacan la IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-16, IL-17, IL-1 β e IL-18, así como estudiando los niveles de otras citocinas como por ejemplo, el TNF- α . Estos mediadores pueden potenciar la respuesta inflamatoria, siendo factores proinflamatorios, o bien pueden ser antiinflamatorios, inhibiendo la liberación de más mediadores inflamatorios. El TNF- α y la IL-1 β tienen una importancia crucial. El TNF- α se ha visto que está involucrado en el cambio de la permeabilidad de la BHE y en el aumento de flujo sanguíneo cerebral.

Por otro lado, los niveles de las interleucinas proinflamatorias IL-6 e IL-18 están aumentadas en pacientes con EHM comparados con pacientes sin EHM. Además, la

concentración en suero de estas interleucinas es útil para discriminar entre pacientes cirróticos sin y con EHM (Montoliu et al., 2009). Esto sugiere que la inflamación relacionada con IL-6 e IL-18 parece contribuir a la EHM.

Estos resultados apoyan los de (Shawcross et al., 2007). En dicho estudio, se demostró que la inflamación periférica determina la aparición de EHM y también está relacionada con su severidad. No obstante, la presencia y la severidad de la EHM son independientes tanto del grado de daño hepático como de la concentración de amonio. Los marcadores de la inflamación periférica son significativamente mayores en aquellos pacientes con EHM con respecto aquellos sin EHM.

Se ha investigado también el papel de la inflamación y la hiperamonemia en la inducción de deterioro cognitivo leve en pacientes con distintas enfermedades hepáticas y dermatológicas, con diferentes grados de hiperamonemia y/o inflamación. Ni la hiperamonemia ni la inflamación periférica por sí solas son capaces de producir deterioro cognitivo, pero la combinación de ciertos niveles de ambos factores son capaces de inducirlo, incluso sin daño hepático.

Recientes estudios indican que la hiperamonemia provoca la sensibilización del cerebro a los efectos de la inflamación periférica ((Shawcross et al., 2007; Jalan and Bernau., 2007; Rovira et al., 2007 and Wright et al., 2012). Por otra parte, la nitrosilación de proteínas, mecanismo patológico común en el síndrome, no puede explicarse solo por la hiperamonemia y tampoco en ausencia de un proceso inflamatorio sistémico. Un hecho importante es la evidencia de que el uso de inhibidores de TNF- α , como por ejemplo el ibuprofeno y el infliximab, restaura la capacidad de aprendizaje y la memoria tanto en humanos como en ratas (Cauli et al., 2007)

Este hecho pone de manifiesto la importancia de la inflamación periférica sobre la EH. Tanto el ibuprofeno como el infliximab actúan a nivel periférico, ya que no son capaces de atravesar la BHE. Por último, es importante destacar que esta relación entre inflamación periférica y la función cerebral ya ha sido evidenciada en otros procesos patológicos, como es el caso del Alzheimer.

1.2.3. Neuroinflamación y EH

La inflamación periférica y la hiperamonemia afectan la función cerebral mediante la inducción de la neuroinflamación (Dadsetan et al., 2016a). Se cree que es el factor responsable del deterioro cognitivo y motor asociado con la EHM y la EH clínica.

Estudios tanto en pacientes como en el modelo animal de la enfermedad evidencian la importancia de la neuroinflamación en la EH. Se ha comprobado que ratas con fallo hepático debido a anastomosis portacava (PCS) presentan neuroinflamación debido a que tienen afectada la ruta del glutamato-óxido nítrico (NO)-GMPc (Erceg et al., 2005). Asimismo, ratas con ligación del ducto biliar presentan activación de la microglía y, además, el tratamiento con

ibuprofeno redujo los niveles de neuroinflamación (Rodrigo et al., 2010). Además, esta activación de la microglía está presente en el tejido cerebral de pacientes cirróticos (Dennis et al., 2013).

El sistema inmunitario periférico se comunica con el cerebro en respuesta a la inflamación. La BHE está compuesta por células endoteliales vasculares. Este tipo celular presenta en su membrana receptores para ciertas citocinas, como por ejemplo receptores de TNF- α y de IL-1 β (Coltart et al., 2013). Por tanto, van a ser capaces de transducir el estado de inflamación periférica al cerebro, mediante, por ejemplo, la activación de enzimas que darán lugar a la síntesis de NO y prostaglandinas. Por otra parte, los mediadores inflamatorios pueden llegar al cerebro atravesando la BHE mediante transporte activo o mediante su paso por zonas en las que no hay BHE. Además, las señales inflamatorias pueden afectar al cerebro mediante la señalización del nervio vago. En ratas, la inflamación periférica se traduce en una reducción de los niveles de I κ B en hipocampo y el aumento de NF- κ B. Por tanto, se induce la transcripción de TNF- α y de IL-1 β , induciendo alteraciones en la capacidad de aprendizaje espacial (Dadsetan et al., 2016b). Estas capacidades están moduladas por los receptores NMDA y AMPA, situados en el hipocampo.

En la neuroinflamación, dos tipos celulares tienen especial relevancia: la microglía y los astrocitos. Los mediadores proinflamatorios periféricos pueden activar a estos tipos celulares, provocando que sintetizen ellos mismos una gran cantidad de citocinas.

1.2.3.1. Microglía

Las células de la microglía son las células inmunitarias innatas que residen en el sistema nervioso central. Representan la defensa primaria en el sistema nervioso ante los procesos patológicos, las lesiones y las infecciones (Chen y Trapp, 2015). No obstante, también poseen funciones que no están relacionadas con la respuesta inmune, como, por ejemplo, la contribución al desarrollo cerebral y a la angiogénesis. Se trata de un tipo celular de origen mielóide y que constituye aproximadamente el 15% del sistema nervioso central. Las células de la microglía presentan un pequeño tamaño, con un citoplasma escaso, con el núcleo oval o triangular. Se caracterizan por poseer unas prolongaciones irregulares mediante las cuales se encargan de rastrear el microambiente en busca de restos celulares, virus, microorganismos y moléculas que informen sobre el estado del entorno. Cuando se encuentran con algún elemento extraño, las células de la microglía lo fagocitan. De este modo, se induce a su activación, actuando como células presentadoras de antígenos y segregando citocinas.

En la EH, las células de la microglía pueden ser activadas por distintas moléculas, además de por los factores inflamatorios periféricos. Entre estas moléculas destacan el amonio, el lactato, el glutamato, el manganeso y los neuroesteroides (Butterworth, 2011). La microglía activada, en consecuencia, va a liberar en el cerebro citocinas proinflamatorias, como, por ejemplo, TNF- α , IL-1 β , IL-1 α e IL-6, contribuyendo así a la neuroinflamación. Del mismo modo,

la activación de las células de la microglía desemboca en la producción de CCL2, una molécula que induce el reclutamiento de monocitos al cerebro.

1.2.3.2. Astrocitos

Por su parte, los astrocitos son las principales células neurológicas afectadas en la EH. Es un tipo celular de origen neuroectodérmico y que constituye un tercio del volumen del córtex cerebral (Córdoba, 2014). Los astrocitos desempeñan una gran cantidad de funciones que resultan clave para el mantenimiento de la función nerviosa. En primer lugar, los astrocitos están estrechamente relacionados con las neuronas. Se encargan del transporte de los nutrientes a las neuronas, de modular la transmisión sináptica y la neuroexcitabilidad, así como de proveer a las neuronas de los precursores de los neurotransmisores. Al mismo tiempo, se encargan de controlar el microambiente cerebral, limpiando desechos, manteniendo el equilibrio iónico celular y también el pH. Forman la *glía limitans*, una barrera física e inmunológica que aísla al sistema nervioso central.

Una de las funciones específicas de los astrocitos es la detoxificación del amonio. Este proceso está mediado por la enzima glutamina sintetasa, encargada de la transformación del amonio en glutamina. El estado de hiperamonemia provoca que en los astrocitos se genere un exceso de glutamina, lo que se traduce en estrés osmótico. Como consecuencia de ello, los astrocitos se edematizan, aumentando su volumen. En la EH, los astrocitos adquieren un aspecto característico, conocido con el nombre de astrocitosis tipo II del Alzheimer. Este tipo de astrocitos presentan un notable crecimiento nuclear y celular, un nucléolo prominente, cambios en la cromatina y un aumento de la producción de glicógeno (Albrecht y Jones, 2000). Estas modificaciones en los astrocitos se relacionan directamente con el desarrollo de edema cerebral y con el aumento de la presión intracraneal.

Hay estudios recientes que plantean los mecanismos de acción de la neuroinflamación. Los factores proinflamatorios periféricos inducen a la activación tanto de las células endoteliales como de las células de la microglía. Esta activación se traduce en la estimulación del *Toll-like receptor 4* (TLR4). Este receptor se encarga de activar factores *downstream* como NF- κ B y rutas dependientes de MyD88 (Jayakumar et al., 2015). En consecuencia, se estimula la producción de mediadores inflamatorios, incluyendo especies ROS y NOS, ácido araquidónico y prostaglandinas. Estos factores tienen a los astrocitos como diana principal. Por consiguiente, este proceso conlleva la disfunción de los astrocitos, resultando en la aparición de edema cerebral y de los trastornos asociados con el síndrome.

A pesar de todo, los mecanismos involucrados en la neuroinflamación no han sido elucidados por completo. Los astrocitos y las células de la microglía juegan un rol muy importante en la neuroinflamación y, esta, en la EH. La estrecha y sensible relación entre los astrocitos y las células microglía con las neuronas provoca que cualquier cambio en estos tipos celulares afecte a la función neuronal.

1.2.4. Citocinas proinflamatorias

Las citocinas son un grupo de proteínas de bajo peso molecular, producidas durante las respuestas inmunitarias y que actúan mediando relaciones complejas entre diversos tipos celulares. En particular, se encargan de la comunicación entre células inmunitarias en los procesos inflamatorios, aunque también pueden llevar a cabo funciones efectoras sobre otros tipos celulares. Las citocinas desempeñan una función fundamental en la EH debido a la importancia, como ya se ha visto, de la inflamación periférica y de la neuroinflamación. La síntesis de estos mediadores proinflamatorios va a tener lugar tanto a nivel periférico como a nivel cerebral. Un mayor conocimiento en este tipo de moléculas puede conducir al desarrollo de nuevas aproximaciones terapéuticas.

Tanto a nivel periférico como a nivel cerebral, una de las primeras citocinas que se sintetizan es el factor de necrosis tumoral α , conocido con el nombre de TNF- α . Se trata de una hormona polipeptídica formada por 212 aminoácidos. El TNF- α puede ser sintetizado por una gran cantidad de células, que son capaces de sintetizarla cuando están activadas. Entre estos tipos celulares se incluyen los monocitos, neutrófilos, linfocitos, células de Kupffer en el hígado, y los astrocitos y las células de la microglía en el cerebro, entre otros. Esta citocina tiene un papel fundamental en la estimulación de la fase aguda del proceso inflamatorio. Entre sus funciones biológicas más importantes destacan: la inducción de la síntesis de otras citocinas como, por ejemplo, las interleucinas IL-1 e IL-6, la estimulación la migración leucocitaria y la activación del endotelio vascular.

Se ha demostrado que está fuertemente relacionada con la patogénesis de la EH y que, además, el grado de severidad del síndrome está vinculado con sus niveles circulantes (Odeh et al., 2005). Se cree que este factor proinflamatorio participa en aquellos procesos patogénicos de la EH en los que el amonio está involucrado. El TNF- α incrementa la capacidad de difusión del amonio a través de las células endoteliales del sistema nervioso central. Además, impide que los astrocitos capten el glutamato extracelular, llevando a la acumulación de este y, por tanto, fomentando el desarrollo de la EH y de la neurotoxicidad (Odeh, 2007). Por otra parte, el TNF- α también se relaciona con el GABA, el principal neurotransmisor, con los receptores de benzodiazepinas, y con la toxicidad asociada al elevado nivel de manganeso.

El TNF- α es capaz de atravesar la BHE, afectando a su permeabilidad. Como se expondrá en el siguiente apartado, algunas de las estrategias terapéuticas contra la EH se centran en neutralizar los niveles de TNF- α periféricos.

Por otra parte, las interleucinas IL-1 β y la IL-6 son dos citocinas proinflamatorias que también se relacionan con la EH. La IL-1 β es un importante mediador de la respuesta inflamatoria. Está involucrada en una gran cantidad de funciones celulares, controlando los procesos de diferenciación celular y de apoptosis. La IL-1 β es capaz de modificar la integridad de la BHE debido a que es capaz de activar a la enzima ciclooxigenasa-2, presente en las células endoteliales (De Vries et al., 1996). En la EH, los niveles de la interleucina 6 también se ven aumentados. Este mediador participa en la diferenciación de los linfocitos B, en la producción de inmunoglobulinas y en activación de los linfocitos T citotóxicos, entre otros procesos. Existe

una correlación entre esta citocina y los niveles de amonio, sugiriendo que ambas moléculas juegan un papel sinérgico.

La activación de las células de la microglía resulta en el aumento de las citocinas IL-1 β , IL-6 y TNF- α en el cerebro. Además, recientes estudios revelan que la delección de los genes de los receptores de TNF- α y de IL-1 β retrasa el desarrollo de la EH y disminuye la intensidad del edema cerebral en ratones con FHA (Jalan et al., 2017). Del mismo modo, se ha comprobado que astrocitos expuestos a las citocinas TNF- α , IL-1 β , IL-6 y IFN- γ expresan el mediador NF- κ B. La inactivación del NF- κ B previene la edematización de los astrocitos (Rama Rao et al., 2010).

1.3. Infliximab

En este trabajo, las ratas reciben tratamiento con un fármaco, el infliximab. Conocido comercialmente como Remicade, se trata de un potente fármaco antiinflamatorio. El infliximab es un anticuerpo monoclonal químerico humano-murino: Ig-G₁, producido en células de hibridoma murino mediante la tecnología del ADN recombinante. El infliximab neutraliza la actividad biológica de la citocina proinflamatoria TNF- α uniéndose tanto a la forma soluble como a la forma transmembranal de la proteína e impidiendo que se una a sus receptores específicos. Dado que esta citocina es una pieza fundamental en los procesos inflamatorios, si se neutraliza, se consigue reducir el estado de inflamación. Del mismo modo, inducirá la lisis de aquellas células que expresen en su membrana el TNF- α , reduciendo la infiltración en los tejidos de células inflamatorias.

El infliximab es un fármaco que se utiliza como tratamiento para algunas enfermedades. Dichas patologías tienen en común los elevados niveles de TNF- α a nivel de fluidos o de tejidos. Entre estas enfermedades se encuentran la artritis reumatoide, la enfermedad de Crohn, la colitis ulcerosa, la artritis psoriásica, la psoriasis y las spondiloartropatías.

Este fármaco es administrado vía intravenosa y su administración requiere de supervisión médica. Asimismo, antes de comenzar con el tratamiento, es necesario descartar que el paciente presente alguna infección. Del mismo modo, es necesario tener en cuenta las posibles complicaciones o efectos secundarios del tratamiento.

El infliximab es una sustancia que no puede atravesar la BHE. Por tanto, ejerce sus efectos a nivel periférico. Recientes estudios indican que reduciendo la inflamación periférica mediante el tratamiento con infliximab disminuye la neuroinflamación, lo que mejora la capacidad cognitiva de ratas con EH (Dadsetan et al., 2016a; Dadsetan et al., 2016b).

2. Objetivos

En la patogénesis de la enfermedad, la hiperamonemia juega un papel principal. La inflamación periférica actúa sinérgicamente con ella en la inducción de la neuroinflamación, que es la principal responsable del deterioro cognitivo y motor observado en pacientes con EH. Los mecanismos mediante los cuales la hiperamonemia produce neuroinflamación están todavía por elucidar. Tampoco se conoce bien la contribución de la inflamación periférica en la inducción de la neuroinflamación. Teniendo en cuenta los datos presentados en la introducción, los objetivos de este trabajo son:

- Estudiar el efecto de la hiperamonemia sobre la inflamación periférica.
- Caracterizar la neuroinflamación y el deterioro cognitivo en ratas hiperamonémicas.
- Evaluar el efecto del tratamiento con infliximab sobre la inflamación periférica, la neuroinflamación y el deterioro cognitivo.

3. Materiales y métodos

3.1. Modelo de hiperamonemia crónica y tratamiento con infliximab

Se utilizaron ratas Wistar albinas macho de entre 120 a 140g de peso. Se estabularon en jaulas en ambiente controlado: ciclo de 12 horas de luz (7:00-19:00 h) y 12 h de oscuridad (19:00-7:00 h). Se estableció una temperatura de 23 ± 1 °C y una humedad del $55 \pm 5\%$. Las ratas dispusieron en todo momento de libre acceso a comida y agua. En este trabajo se ha utilizado un modelo de hiperamonemia crónica moderada en ratas y sin daño hepático. La hiperamonemia sin daño hepático está generalmente limitada a su uso en roedores. Se trata de una metodología de bajo coste y fácil de implementar que fue desarrollada por los investigadores españoles Santiago Grisolia, Vicente Felipe, M^ª Dolores Miñana e Inmaculada Azorín (Azorín et al., 1989). Se ha demostrado que la hiperamonemia sin daño hepático afecta a los sistemas de neurotransmisión cerebrales y provoca neuroinflamación causando anormalidades en la capacidad de aprendizaje y de memoria. Resulta útil para evaluar las alteraciones de la EH están asociadas directamente con el exceso de amonio.

El modelo de ratas hiperamonémicas se obtuvo mediante una dieta enriquecida con un 25% (p/p) de acetato amónico. Este tipo de dieta se mantuvo hasta el sacrificio. El tratamiento con infliximab (Remicade; Merck Sharp & Dohme, España) se comenzó 3 días antes de haberse iniciado la dieta enriquecida en amonio. El infliximab se disolvió en agua y se administró (5 mg/kg) mediante inyección intravenosa en la cola. El tratamiento con infliximab se realizó semanalmente y se prolongó durante 8 semanas hasta el sacrificio.

Las ratas se distribuyeron en 4 grupos. En primer lugar, se encuentran las ratas control vehículo, que serán denominadas de aquí en adelante como CV. Son ratas que son alimentadas con una dieta normal y que no reciben ningún tipo de tratamiento. A modo de control, se les inyecta una solución de suero salino de modo que estuvieron sometidas al estrés del pinchazo, como los otros grupos. El segundo grupo está compuesto por las ratas control sometidas al tratamiento con infliximab, por lo que serán catalogadas con las letras CI. Estas ratas se alimentan de una dieta normal pero son sometidas al tratamiento con el fármaco anti-TNF- α . A continuación, se encuentran las ratas hiperamonémicas vehículo. Con la etiqueta de HAV, estas ratas reciben una dieta enriquecida con amonio. En último lugar, el cuarto grupo de ratas se caracteriza por recibir una dieta enriquecida en amonio y además por ser tratadas con infliximab. Este grupo recibe el nombre de ratas HAI.

Es necesario subrayar el hecho de que los experimentos realizados en este trabajo fueron aprobados por el Comité de Experimentación y Bienestar Animal (CEBA) del Centro de Investigación Príncipe Felipe (CIPF) y de acuerdo con las directrices de la Directiva de la Comisión Europea (2010/63/EU). Los animales fueron tratados y alojados en concordancia con la ley 32/2007 de 7 de noviembre y el Real Decreto 53/2013 de 1 de febrero.

3.2. Esquema del diseño experimental

A continuación, se presenta una representación gráfica del diseño del experimento. De este modo, se puede analizar el desarrollo cronológico.

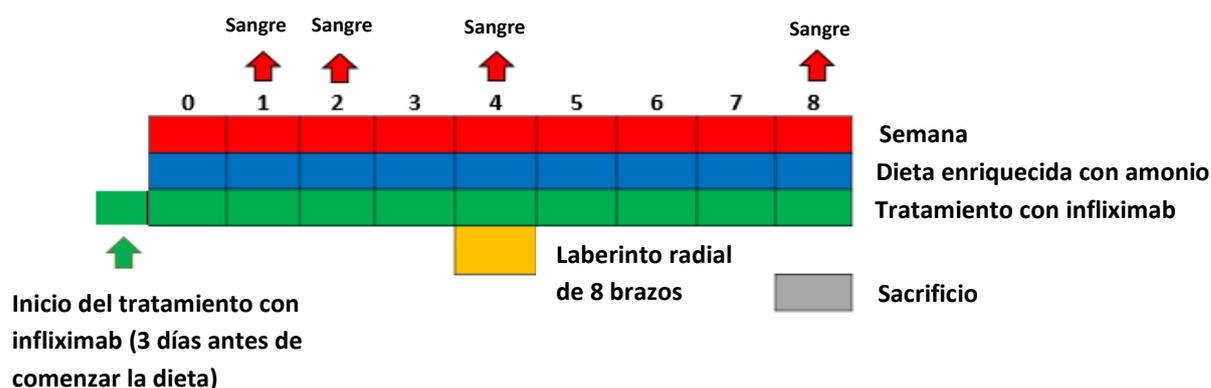


Figura 2: Diseño del experimento. El experimento duró 8 semanas. En las semanas 1, 2, 4 y 8 se extrajo sangre para evaluar los niveles de amonio y los factores proinflamatorios periféricos. En la semana 4 se realizó el laberinto radial de 8 brazos para evaluar el aprendizaje y la memoria espacial. En la última semana, las ratas se sacrificaron mediante perfusión, obteniendo cortes histológicos a nivel de cerebelo e hipocampo, zonas que están vinculadas al deterioro cognitivo. Sobre estas dos zonas se estudió la neuroinflamación mediante inmunohistoquímica.

3.3. Análisis de la inflamación periférica

3.3.1. Obtención de plasma

Se obtuvieron entre 100 y 500 μ l de sangre de cada una de las ratas. La sangre se sacó de la vena safena. Para obtener el plasma, se añadió EDTA 7.5 mM, se centrifugó 5 minutos a 270 g y se recogió el sobrenadante, en el que está el plasma. Este procedimiento se repitió 2 veces.

3.3.2. Determinación de los niveles de amonio en sangre

El amonio en sangre se puede duplicar e incluso triplicar en este tipo de modelo. Los niveles de amonio en sangre son medidos inmediatamente después de la extracción de sangre. Se obtuvo 20 μ l de sangre y se utilizó el *Ammonia Test Kit II for the PocketChemBA system* (Arkay, Inc., Kyoto, Japón).

3.3.3. Análisis de los factores inflamatorios periféricos mediante Western Blot

El Western Blot es un método para la detección y cuantificación relativa de proteínas en una muestra de tejido o en células. Mediante esta técnica, se evaluaron los niveles de distintos mediadores inflamatorios en los plasmas.

Se midió el contenido total de proteína de los plasmas mediante el método del ácido bicinónico (BCA). Se utilizaron los plasmas diluidos 1:10 en tampón Tris. Las proteínas se separaron mediante una electroforesis de proteínas en gel de poliacrilamida al 15%. Se prepararon las muestras diluyéndolas volumen a volumen (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%). Una vez preparadas, se situaron en un termoblock durante 5 minutos para que hiervan. A continuación, las muestras se centrifugaron y se cargaron en los pocillos del gel. Se cargan 75 µg de proteína total de cada muestra. Se realizó la electroforesis a una intensidad de corriente de 25mA por gel durante aproximadamente 1.5 horas. Una vez se han separado las proteínas, se transfirieron a una membrana de PVDF. La membrana debe haber sido hidratada previamente en metanol durante 1 minuto y a continuación en tampón de transferencia (Tris Base 0.025 M, Glicina 0.05 M). La transferencia se llevó a cabo durante 2h a una intensidad de 250mA. Una vez la transferencia se completó, se bloquearon las membranas en BSA durante 45-60 minutos y se incubaron con el anticuerpo primario específico diluido en BSA en una cámara fría a 4 °C, en agitación y durante toda la noche. Al día siguiente, se retiró el anticuerpo primario y se realizaron 4 lavados de 10 minutos cada uno con TBS-Tween 1X. A continuación, las membranas fueron incubadas durante 1 hora a temperatura ambiente en anticuerpo secundario conjugado a la enzima fosfatasa alcalina. El anticuerpo secundario está diluido en BSA. Se recuperó el anticuerpo secundario y se realizaron 4 lavados de 10 minutos cada uno en TBS-Tween 1X. Se realizó un último lavado en tampón sustrato (NaCl 100 mM, MgCl₂ 5 mM, Tris-HCl 100 mM a pH= 9.5) durante 10 minutos. El último paso fue revelar las membranas en solución de revelado (NaCl 100 mM, MgCl₂ 5 mM, Tris-HCl 100 mM, 0.6% stock NBT, 0.35% stock BCIP, pH= 9.5). Una vez la banda de las proteínas es visible, se retira de la solución de revelado antes de que se sature y se lava en agua, dejándose secar.

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

A continuación, se presenta una tabla con los factores inflamatorios periféricos que se estudiaron, así como las diluciones de los anticuerpos utilizados.

Tabla 1: Citocinas analizadas para estudiar la inflamación periférica y anticuerpos utilizados para tal efecto.

Citocina	Anticuerpo 1 ^{ario}	Dilución 1 ^{ario}	Anticuerpo 2 ^{ario}	Dilución 2 ^{ario}
IL-6	Anti-IL-6	1:1000	Anti-IgG conejo	1:4000
IL-10	Anti-IL-10	1:500	Anti-IgG conejo	1:4000
IL-17	Anti-IL-17	1:1000	Anti-IgG conejo	1:4000

3.4. Análisis de la neuroinflamación

3.4.1. Inmunohistoquímica

Las ratas se anestesiaron por inyección intraperitoneal de pentobarbital 1 ml/kg y se perfundieron por vía intracardiaca con suero salino para eliminar la sangre. A continuación, para fijar los tejidos se perfundió con 500 ml de paraformaldehído (PFA) al 4% en tampón fosfato (PB) 0.1 M a temperatura ambiente. Los cerebros se extrajeron cuidadosamente y se mantuvieron en PFA durante un periodo no superior a 24 horas, tras el cual se guardaron en una solución de PB 0.1 M conteniendo azida sódica al 0.01%. A continuación, el cerebro entero se incluyó en parafina y se obtuvieron cortes de 50µm de grosor empleando el microtomo Leica VT 1000S. Para desparafinar las muestras se incubaron los cortes 1 h a 62 °C. Se realizaron lavados en alcoholes decrecientes: dos lavados de 10 minutos en Histowax (mezcla que contiene parafina), un lavado de 5 minutos en alcohol 100%, un lavado de 5 minutos en alcohol 96% y un último lavado de 5 minutos en alcohol 70%.

A continuación se realizó la recuperación antigénica (FLEX TRS High) debido a que durante el proceso de inclusión en parafina se forman enlaces covalentes con los antígenos que dificultan el posterior reconocimiento por el anticuerpo. Mediante un tratamiento con calor (95 °C), se consiguen disociar dichos enlaces para un reconocimiento del anticuerpo primario efectivo.

Para realizar la inmunohistoquímica se utilizó un equipo de tinción Autostainer Link 48 (Dako Diagnósticos). En primer lugar, los cortes se lavaron con un tampón y se incubaron 5 min con Endogenous Enzyme Block (FLEX peroxidasa Block) para bloquear la actividad peroxidasa endógena. Los cortes se lavaron con el mismo tampón y se incubaron con el anticuerpo primario diluido en solución de bloqueo.

Se utilizaron 4 anticuerpos primarios para poder analizar el estado de activación de las células de la microglía, los astrocitos y para caracterizar la neuroinflamación de los animales:

1. Como marcador específico de los astrocitos, se utilizó el anticuerpo anti-GFAP (DAKO, IR524; listo para usar, durante 20 minutos). Se trata de un anticuerpo dirigido contra la proteína ácida fibrilar glial (GFAP). La GFAP es una proteína estructural de los astrocitos: forma parte de los filamentos intermedios. Sirve para evaluar el grado de activación de los astrocitos.
2. Se utilizó el anticuerpo anti-Iba-1 (Wako, 019-19741; 1:300 durante 30 min) para identificar de manera específica a las células de la microglía. Este anticuerpo reconoce a la denominada molécula 1 adaptadora ionizada de unión a calcio (Iba-1). Se trata de una proteína intracelular que se sobreexpresa en respuesta a la inflamación. Este anticuerpo permite estudiar la activación de las células de la microglía.
3. El anticuerpo anti-TNF- α (Abcam, ab66579; 1:2000 durante 45 min).
4. El anticuerpo anti-IL-1 β (Abcam, ab9722, 1:100 durante 30 min).

Para eliminar el anticuerpo primario residual que no ha quedado adherido al tejido, se volvieron a lavar los cortes con el mismo tampón. Los anticuerpos secundarios (listos para usar,

DAKO) tienen unido un sistema de revelado basado en Horseradish Peroxidase (HRP) que reacciona con un sustrato colorimétrico, diaminobenzidina (DAB). Los cortes se incuban con el anticuerpo secundario durante 20 minutos. El anticuerpo secundario residual es eliminado mediante varios lavados. Para el revelado se incubaron los cortes durante 10 minutos con el DAB. A continuación, los cortes fueron tratados con hematoxilina para contrateñir los núcleos y se volvieron a lavar. Finalmente, las muestras se deshidrataron con concentraciones crecientes de alcoholes: 70%, 96% y 100% durante 5, 5 y 10 minutos respectivamente. Tras la deshidratación, los cortes se mantuvieron en xileno al menos durante 10 minutos y se montaron. Una vez secas las preparaciones, se escanearon con la ayuda de un Scanner Panoramic 250 (Automatic Brightfield Scan). Dichas imágenes escaneadas fueron analizadas con el programa Panoramic Viewer 13 que permite realizar fotos de las regiones de interés de los cortes a distintos objetivos, siendo el de 56X el máximo aumento al que se pueden tomar las fotografías sin que estas pierdan resolución.

3.4.2. Cuantificación de la inmunohistoquímica

Con el objetivo de analizar la neuroinflamación, se realizaron fotografías a nivel tanto de cerebelo e hipocampo. Estudiando estas fotografías es posible evaluar el grado de expresión de cada una de las proteínas analizadas. Se utilizaron 3 animales de cada uno de los grupos, haciendo un total de 12 animales.

Microglía (Anticuerpo anti-Iba-1)

Tal y como se ha expuesto anteriormente, el marcador Iba-1 se utiliza para cuantificar la activación de las células de la microglía. Este tipo celular se puede presentar en dos estados diferentes. La microglía se puede encontrar en reposo, en un estado inactivado. En esta situación, se encuentra rastreando el ambiente, presentando unas ramificaciones más largas y un citoplasma más pequeño. Por otra parte, se puede encontrar en un estado activado, en el que presenta unas ramificaciones más cortas y un citoplasma más voluminoso.

Se tomaron 16 fotografías de todo el hipocampo y de la sustancia blanca del cerebelo, utilizando un objetivo de 56X. Por tanto, en el hipocampo se tomaron 16 fotos de cada uno de los 12 animales para el anticuerpo anti-Iba-1. Las fotos se tomaron intentando captar el mayor número de células de la microglía por foto.

Una vez obtenidas las fotos, el tratamiento de la imagen se realizó mediante el software Image J. Lo que se pretende es identificar aquellos elementos de la foto que son células de la microglía y eliminar aquello que corresponde a ruido de fondo o aquellas ramificaciones de células de la microglía que se encuentran en otro plano. Con esa finalidad, se generaron máscaras, es decir, zonas de la fotografía que cumplen las especificaciones de pertenecer a células de la microglía. En la figura 3 se puede apreciar las máscaras obtenidas a partir de una foto.

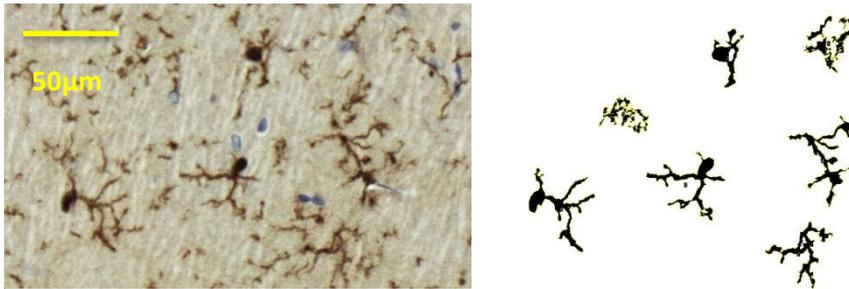


Figura 3: Fotografía de células de la microglía y fotografía de su correspondiente máscara

Para ello, se convirtieron las imágenes a 8 bits (blanco y negro) y se aplicó la función “Autolocal treshold”. Se implementó el método de Bernsen y se ajustó el tamaño de las máscaras filtrando el tamaño de las células a 3000-30000 pixeles en el caso del hipocampo y a 2000-30000 pixeles en el caso del cerebelo. Una vez generadas las máscaras, es necesario revisar que cada una de estas corresponde a células de la microglía y no a otros artefactos.

Se obtuvieron los datos del perímetro de la microglía. El programa ofrece estos datos en pixeles, por lo que es necesario pasarlos a μm . Para ello, se hizo uso de la barra de escala que genera el programa Panoramic Viewer. Dibujando una línea sobre esa barra se puede obtener la equivalencia.

Astrocitos (Anticuerpo anti-GFAP)

El grado de activación de los astrocitos se estudió evaluando el marcador GFAP. Se realizaron 16 fotos a 56X a nivel de hipocampo y de la sustancia blanca del cerebelo para cada animal. Las imágenes fueron primero mejoradas eliminando el ruido de fondo y aumentando el contraste. A continuación, las fotos se convirtieron a 8 bits y se filtraron por intensidad aplicando la función “Autolocal treshold” y utilizando el método Bernsen. Se estableció un filtro de tamaño de 0 a infinito. Los resultados fueron revisados descartando aquellas máscaras que correspondían a artefactos y se expresaron como porcentaje de área teñida por GFAP.

TNF- α

El análisis del contenido de TNF- α se realizó en la sustancia blanca del cerebelo. Se realizaron 16 fotos a un aumento de 40X. La cuantificación consiste en contar manualmente aquellas células que expresan la citocina TNF- α . Para ello, se hizo uso de Image J. Este programa ofrece una herramienta que permite el conteo de células. Se selecciona la opción “Plugins”, luego “Analyze” y por último “Cell counter”. Esta herramienta permite llevar un registro de las células positivas para TNF- α . Una vez se cuentan las células, se expresan los resultados en número de células que expresan la citocina por mm^2 .

IL-1 β

Para evaluar el contenido de IL-1 β se realizaron 8 fotografías a 40X aumentos en la región CA1 de hipocampo y 16 fotos a 40X aumentos en la sustancia blanca del cerebelo. Para cuantificar el contenido de IL-1 β en la región CA1 de hipocampo se utilizó la función ROI Manager de Image J. Se seleccionó la región de interés y se midió su intensidad. Los resultados

se expresaron como medias de la escala de grises. En el cerebelo, el número de células positivas para IL-1 β se contó manualmente utilizando la función "Cell counter" del Image J. Los resultados se expresaron como número de células que expresan IL-1 β por mm².

3.5. Aprendizaje y memoria espaciales

3.5.1. Laberinto radial de 8 brazos

Este test evalúa el aprendizaje espacial y se realiza en un laberinto con un área central que permite el acceso a 8 brazos equidistantes y de idéntico tamaño. Los brazos tienen una longitud de 70 cm y una anchura de 10 cm y el área central tiene 30 cm de diámetro. El laberinto es de plexiglás negro y está a una altura de 1 m sobre el suelo. Cada brazo tiene paredes laterales con una altura superior en el extremo próximo a la zona central (30 cm) que en el extremo distal (5 cm). En el extremo distal de cada brazo, hay un comedero empotrado donde se coloca la comida de recompensa. A las ratas se les reduce la ingesta de comida cuatro días antes de realizar el pre-test y se mantienen con esa dieta restrictiva durante todo el test. En la primera sesión del pre-test se colocan dos ratas en el laberinto durante 5 minutos con comida esparcida por todo el laberinto. En la segunda sesión del pre-test se coloca solo una rata en el laberinto durante 5 minutos con comida en todos los comederos (2 pellets).

A continuación, se realiza el test durante 6 días con 5 ensayos/día. Se coloca la comida en 4 de los 8 comederos: en 2 brazos consecutivos (ejemplo: 1 y 2) y en otros 2 brazos no consecutivos (ejemplo: 4 y 6). Los brazos con/sin comida son diferentes para cada rata. Se espera que la rata se coma todos los pellets pero si no se mueve se esperan como máximo 3 minutos. Si una rata durante 2 días consecutivos no se mueve se elimina del estudio. Se analizan (i) los errores de referencia espacial, que se definen como el número de veces que entra el animal en un brazo sin comida; (ii) los errores de memoria de trabajo, el número de veces que entra en un brazo que ya ha visitado durante ese mismo ensayo y (iii) el número de aciertos en cada ensayo, que corresponde al número de entradas en brazos con comida.

3.6. Análisis estadístico

Se utilizó el programa GraphPad Software, Inc. Prism 5. Se utilizó en primer lugar el test de normalidad de Agostino y Pearson y se comprobó que todos los datos, para todos los grupos y análisis pasaron el test de normalidad, con alfa = 0.05. En todos los casos, las varianzas no fueron estadísticamente diferentes utilizando el test de Barlett. Para el análisis de los factores inflamatorios en sangre, el estudio de la neuroinflamación y para el laberinto radial de 8 brazos, se realizó un análisis de la varianza (ANOVA) de una vía seguido de un post hoc de Tukey. Para evaluar los niveles de amonio en sangre se implementó un análisis ANOVA de dos vías, utilizando un post-hoc test de Bonferroni. Los resultados se expresan como la media \pm SEM (error estándar

de las medias del número de animales indicado en cada caso). Se consideró como significativo un valor de $p < 0.05$.

4. Resultados

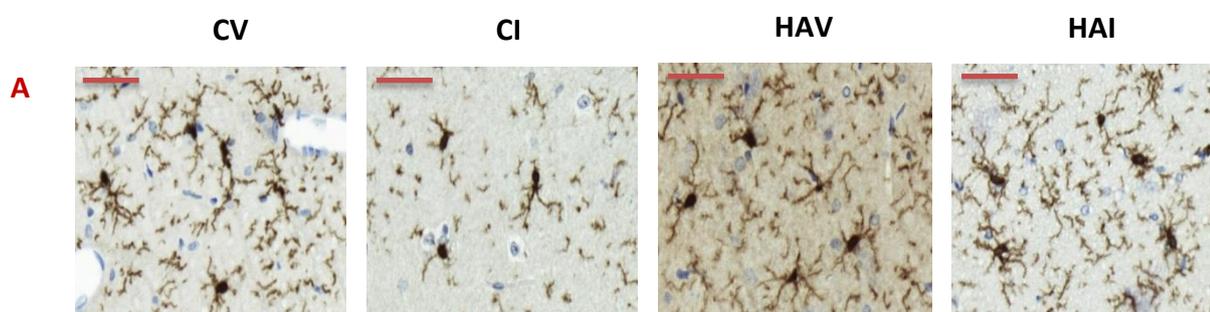
Los resultados se distribuyen en 3 bloques distintos. En el primero se presentarán los resultados que corresponden a la caracterización de la neuroinflamación. En el segundo apartado se presentarán los resultados que corresponden a los niveles de amonio en sangre y la inflamación periférica. Por último, se presentarán los resultados que corresponden al test de memoria espacial.

4.1. Caracterización de la neuroinflamación

4.1.1. Hipocampo

4.1.1.1. La microglía no está activada en el hipocampo de ratas con hiperamonemia crónica a las 8 semanas

El perímetro de la microglía en estado activado es menor que el de la microglía en reposo. La activada presenta un citoplasma más voluminoso, pero se caracteriza por la disminución en el número y en el tamaño de sus ramificaciones. Se analizó la activación de la microglía mediante la expresión de Iba-1 en el hipocampo. A las 8 semanas de hiperamonemia, las ratas hiperamonémicas vehículo (HAV) no presentan una activación significativa de la microglía. Se ha comprobado que el perímetro de la microglía de las ratas HAV ($249 \pm 12 \mu\text{m}$) es menor con respecto a las ratas control vehículo (CV) ($265 \pm 10 \mu\text{m}$) pero no difiere de manera estadísticamente significativa. En comparación con las ratas HAV, el perímetro de la microglía de las ratas hiperamonémicas tratadas con infliximab (HAI) ($237 \pm 10 \mu\text{m}$) no presenta diferencias significativas. El perímetro de ratas control tratadas con infliximab (CI) ($252 \pm 9 \mu\text{m}$) es inferior al de las ratas CV, no obstante, esta diferencia no es significativa.



Barra de escala = 50 μm

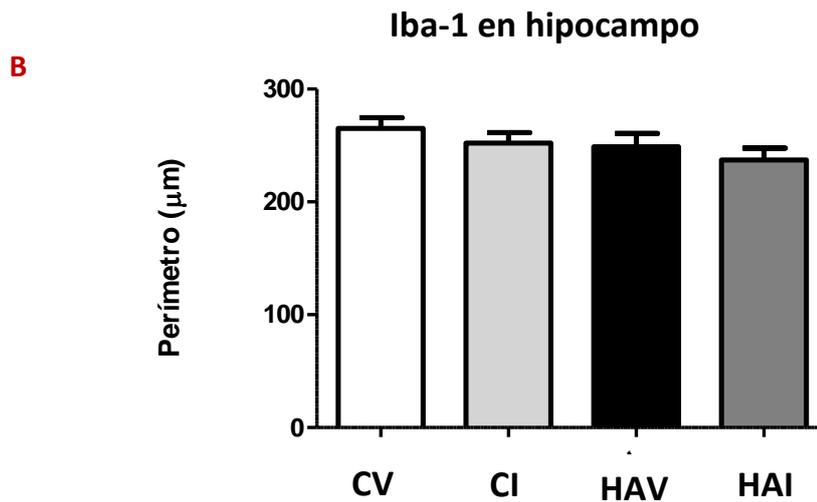
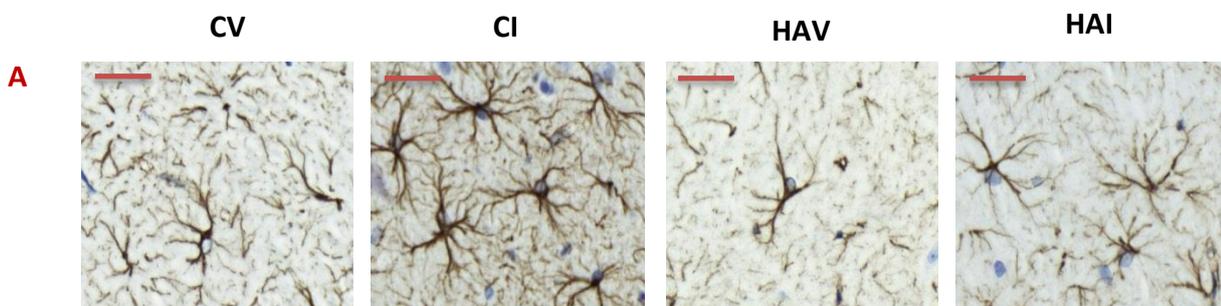


Figura 4. Expresión de Iba-1 en hipocampo. En A se representan fotografías a 56X de la inmunohistoquímica para Iba-1 en el hipocampo en ratas control vehículo (CV), ratas control tratadas con infliximab (CI), ratas hiperamonémicas vehículo (HAV), y ratas hiperamonémicas tratadas con infliximab (HAI). En B se muestran los resultados de la cuantificación de la inmunohistoquímica. Los resultados aparecen como la media del perímetro para cada uno de los grupos \pm SEM. No hay diferencias estadísticamente significativas entre ninguno de los grupos. Barra de escala = 50 μ m.

4.1.1.2. Los astrocitos está activados en el hipocampo de ratas con hiperamonemia crónica a las 8 semanas y su activación se previene por el tratamiento con infliximab

El estudio de los niveles de expresión de la proteína GFAP, marcador específico de los astrocitos, permite evaluar el grado de activación de este tipo celular. En este sentido, a las 8 semanas, las ratas HAV (93465 ± 1641 u.a., $p < 0.05$) presentan una mayor expresión de GFAP que las ratas control (87122 ± 1545 u.a.). Por tanto, los astrocitos están activados en las ratas HAV. Por otra parte, la expresión de GFAP en las HAI (82178 ± 1749 u.a., $p < 0.0001$) está disminuida con respecto a las ratas HAV. No se aprecian diferencias significativas entre las ratas CV y las ratas CI (86524 ± 2074 u.a.).



Barra de escala = 50 μ m

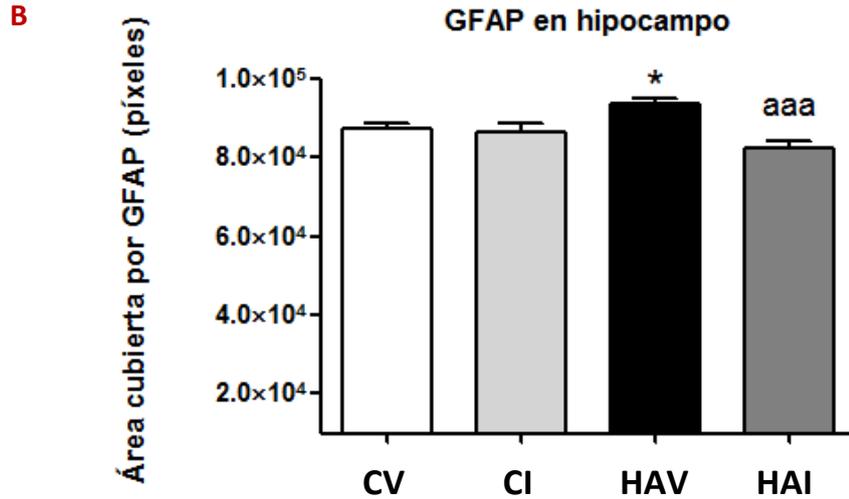
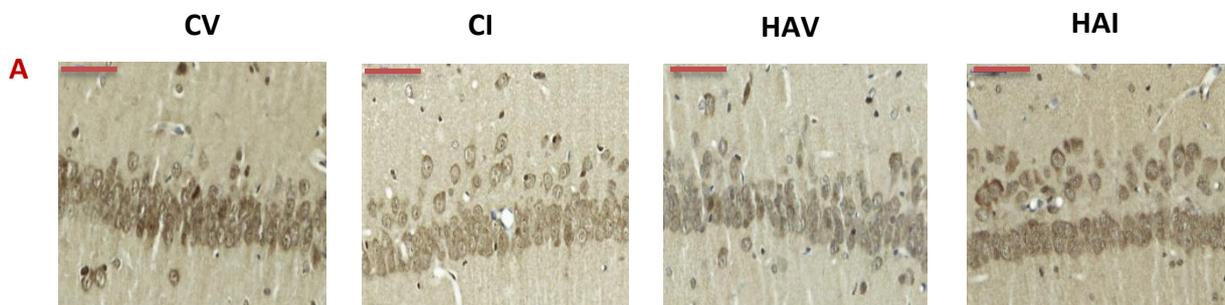


Figura 5. Expresión de GFAP en hipocampo. En A se representan fotografías a 56X de la inmunohistoquímica para GFAP en el hipocampo en ratas CV, CI, HAV y HAI. En B se muestran los resultados de la cuantificación de la inmunohistoquímica. Los resultados aparecen como la media del área cubierta por GFAP \pm SEM. El * indica diferencias significativa con respecto a las CV ($p < 0.05$). Las aaa hacen referencia a la diferencia significativa con respecto a las HAV ($p < 0.0001$).

4.1.1.3. La expresión de IL-1 β no varía significativamente en el hipocampo de los 4 grupos de ratas

La expresión de la citocina IL-1 β fue medida mediante la intensidad de color en la región CA1 del hipocampo. A las 8 semanas de hiperamonemia, el valor de intensidad de color en las ratas HAV (43 ± 2 u.a.) es muy similar al de las ratas control (42 ± 2 u.a.). Por otra parte, el valor en las ratas HAI (41 ± 2 u.a.) es ligeramente inferior con respecto al de las ratas HAV. Si se comparan las ratas CV y las CI ($36,92 \pm 1,57$ u.a.) se puede apreciar que el valor de intensidad de color de las CI es ligeramente más bajo. No obstante, estas diferencias no son estadísticamente significativas.



Barra de escala = 50 μ m

B

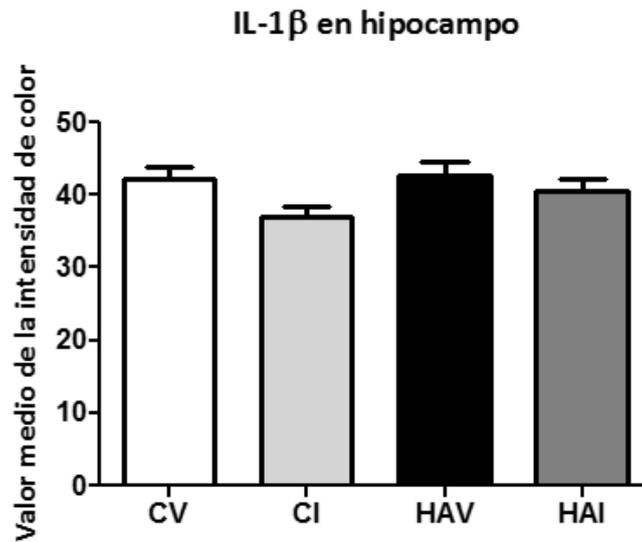
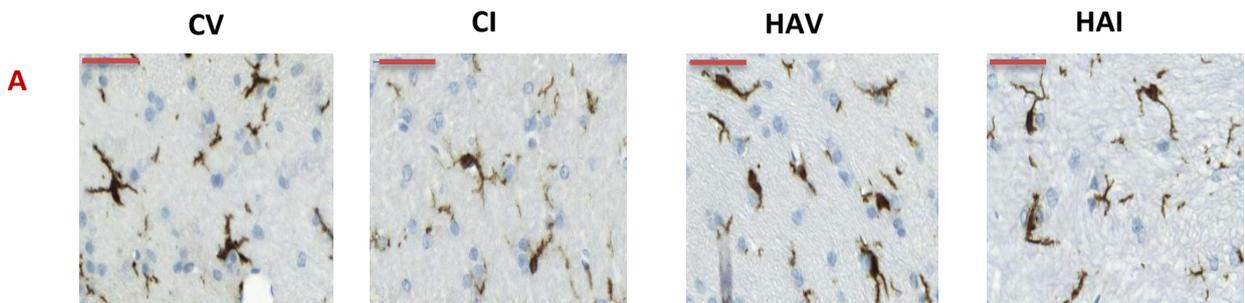


Figura 6. Expresión de IL-1 β en la región CA1 de hipocampo. En A se representan fotografías a 40X de la inmunohistoquímica para IL-1 β en la región CA1 del hipocampo en ratas CV, CI, HAV, HAI. En B se muestran los resultados de la cuantificación de la inmunohistoquímica. Los resultados son la media del valor colorimétrico para cada uno de los grupos \pm SEM. No hay diferencias estadísticamente significativas entre ninguno de los grupos.

4.1.2. Cerebelo

4.1.2.1. La microglía no está activada en el cerebelo de ratas hiperamonémicas a las 8 semanas

Se analizó la activación de la microglía mediante la expresión de Iba-1 en la sustancia blanca del cerebelo. Se obtuvieron datos del perímetro de las células. La microglía no está activada en el cerebelo de ratas HAV ($123 \pm 5 \mu\text{m}$ en HAV y $124,2 \pm 5,5$ para CV). El perímetro de la microglía en la sustancia blanca del cerebelo en las ratas HAI ($125 \pm 5 \mu\text{m}$) es similar al de la microglía de las ratas HAV. Por último, no hay diferencias significativas en la microglía de las ratas CI ($119 \pm 6 \mu\text{m}$) con respecto a las ratas CV.



Barra de escala = 50 μm

B

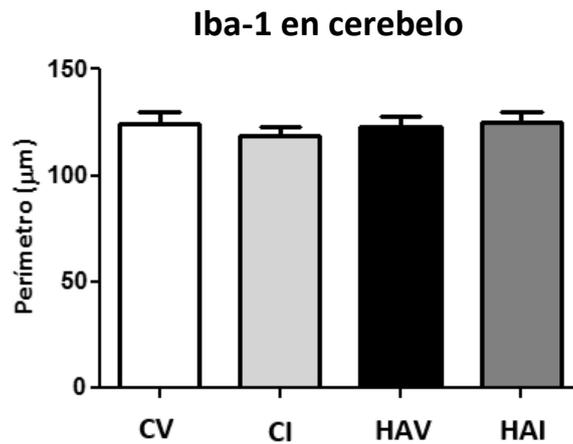
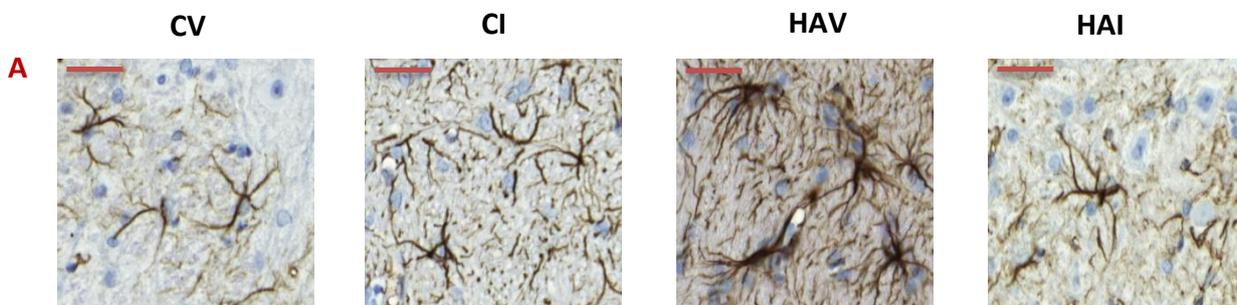


Figura 7. Expresión de Iba-1 en cerebelo. En A se muestran fotografías a 56X de la inmunohistoquímica para Iba-1 en la sustancia blanca de ratas CV, CI, HAV y HAI. En B se muestran los resultados de la cuantificación inmunohistoquímica para los 4 grupos de ratas. Los resultados son la media del perímetro \pm SEM. No hay diferencias estadísticamente significativas entre ninguno de los grupos.

4.1.2.2. La expresión de GFAP está aumentada en la sustancia blanca del cerebelo de las ratas hiperamonémicas y este aumento se previene con el tratamiento con infliximab

A las 8 semanas de hiperamonemia, se analizó la activación de los astrocitos mediante el análisis de la expresión de GFAP en la sustancia blanca del cerebelo. La expresión de GFAP en el cerebelo de ratas HAV (146796 ± 4343 u.a., $p < 0.0001$) está aumentada con respecto a las ratas CV (124947 ± 2985 u.a.). Por tanto, las ratas HAV, como se aprecia en la figura 8, presentan una mayor activación de los astrocitos en la sustancia blanca del cerebelo. También es importante destacar que el tratamiento con infliximab en las ratas hiperamonémicas consigue disminuir de una manera significativa la activación de los astrocitos: la expresión de GFAP en las ratas HAI (110532 ± 2712 u.a., $p < 0.0001$) está significativamente disminuida con respecto a las ratas hiperamonémicas sin tratamiento. No hay diferencias significativas entre CV y CI (CV = 124947 ± 2985 u.a.; CI = 109060 ± 2517).



Barra de escala = 50 µm

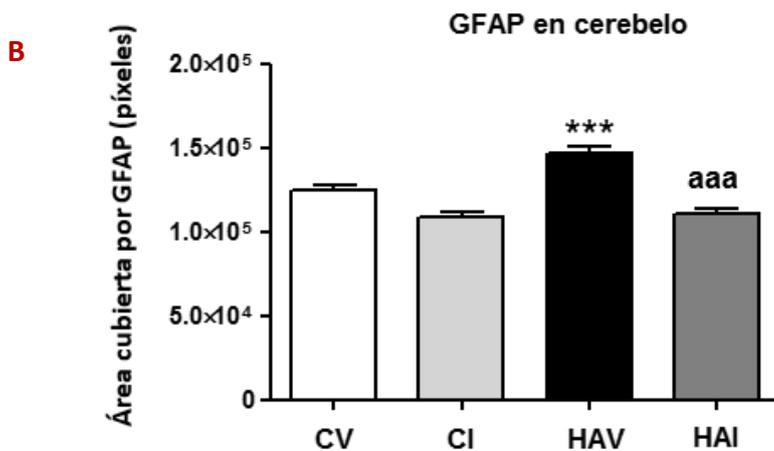
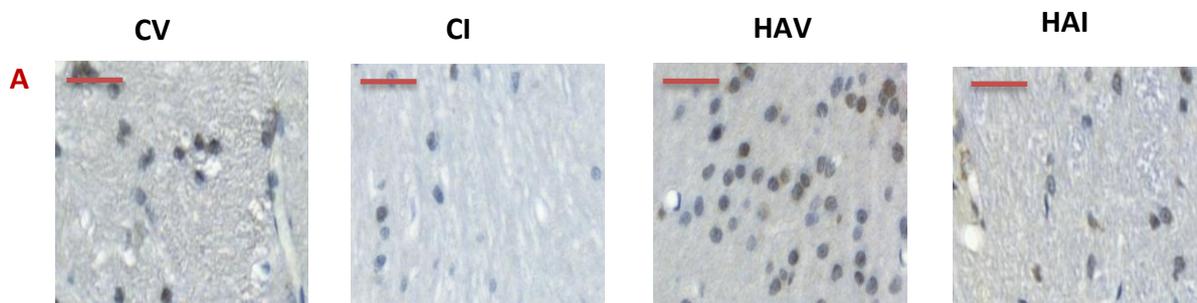


Figura 8. Expresión de GFAP en cerebelo. En A se representan fotografías a 56X de la inmunohistoquímica para GFAP en la sustancia blanca del cerebelo en ratas CV, CI, HAV y HAI. En B se muestran los resultados de la cuantificación de la inmunohistoquímica. Los resultados se muestran como la media del área cubierta por GFAP \pm SEM. Los *** indican una diferencia significativa ($p < 0.0001$) con respecto a las ratas CV. Las aaa hacen referencia a la diferencia significativa con respecto a las ratas HAV ($p < 0.0001$).

4.1.2.3. La expresión de IL-1 β está aumentada en el cerebelo de ratas hiperamonémicas y este aumento se previene con el tratamiento con infliximab

El número de células que expresan IL-1 β por mm² en el cerebelo de ratas HAV (620 ± 32 células por mm², $p < 0.0001$) está aumentado con respecto al de las ratas CV (465 ± 26 células por mm², $p < 0.0001$). El tratamiento con infliximab consigue reducir significativamente la expresión de IL-1 β en el cerebelo de ratas hiperamonémicas (HAI = 452 ± 20 células por mm², $p < 0.0001$). La expresión en las ratas CI (408 ± 20 células por mm²) no varía significativamente con respecto a las ratas CV.



Barra de escala = 50 μ m

B

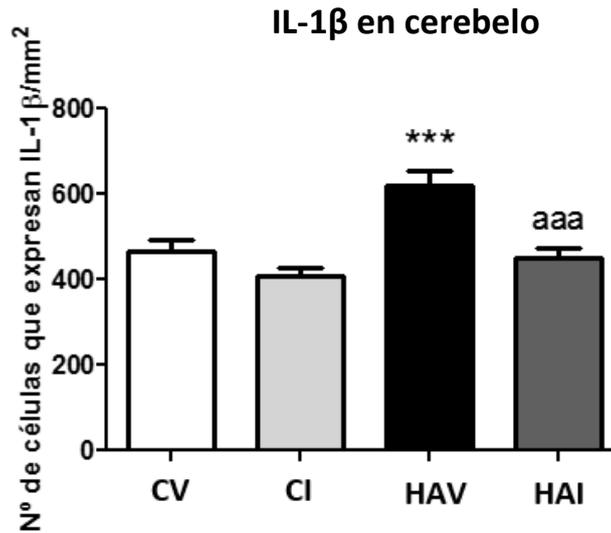
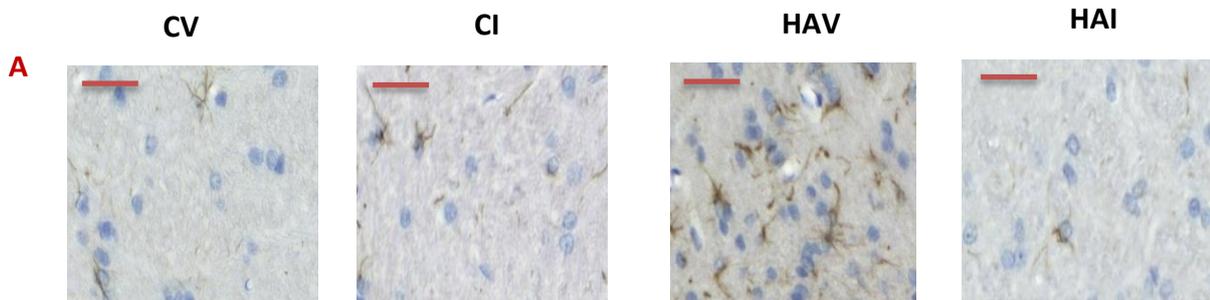


Figura 9. Expresión de IL-1 β en cerebelo. En A se pueden apreciar fotografías a 56X de la inmunohistoquímica en la sustancia blanca del cerebelo para IL-1 β en ratas CV, CI, HAV y HAI. En B se muestran los resultados de la cuantificación de la inmunohistoquímica. Los resultados representan la media de las células que expresan IL-1 β por mm² \pm SEM. Los *** indican diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.0001$) con respecto a las ratas CV. Las aaa indican diferencias significativas ($p < 0.0001$) con respecto a las ratas HAV.

4.1.2.4. La expresión de TNF- α en la sustancia blanca del cerebelo está aumentada en las ratas hiperamonémicas y este aumento se previene con el tratamiento con infliximab

La expresión de TNF- α en el cerebelo se analiza estudiando el número de células que expresan la citocina por mm². Existe una expresión aumentada de TNF- α en las ratas HAV (156 ± 11 células por mm², $p < 0.05$) con respecto a las ratas CV (121 ± 8 células por mm²). Por otra parte, la expresión de TNF- α disminuye de una manera muy significativa en las ratas HAI (104 ± 8 células por mm², $p < 0.0001$) con respecto a las ratas hiperamonémicas que no han sido tratadas. El tratamiento con infliximab en las ratas control no altera la expresión de esta citocina (CI= 120 ± 6 células por mm²).



Barra de escala = 50 μ m

B

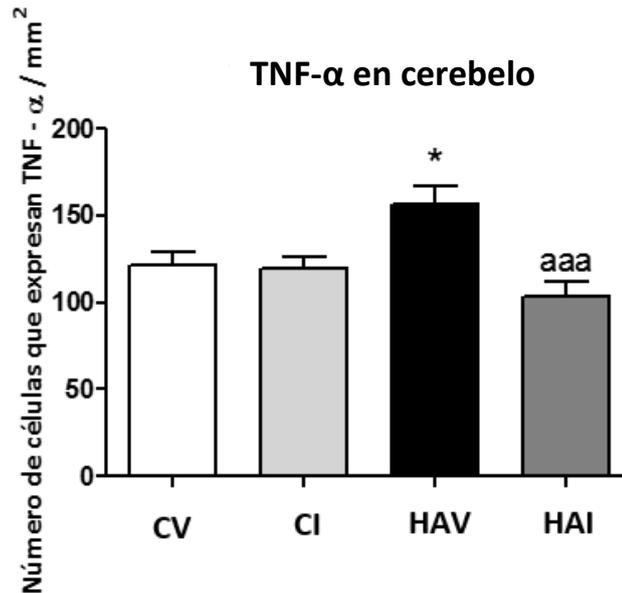


Figura 10. Expresión de TNF- α en cerebelo. En A se pueden apreciar fotografías a 56X de la inmunohistoquímica en la sustancia blanca del cerebelo para TNF- α para ratas CV, CI, HAV y HAI. En la figura 10B se muestran los resultados de la cuantificación de la inmunohistoquímica de los 4 grupos de ratas. Los resultados representan la media de las células que expresan TNF- α por mm² \pm SEM. El * indica diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) con respecto a las ratas CV. Las aaa indican diferencias significativas ($p < 0.0001$) con respecto a las ratas HAV.

4.2. Niveles de amonio en sangre y caracterización de la inflamación periférica

Para estudiar la progresión de la inflamación periférica, se extrajo sangre a las 1, 2, 4 y 8 semanas, y se determinaron los niveles de amonio en sangre y los niveles de distintos factores inflamatorios en el plasma sanguíneo.

4.2.1. Niveles de amonio en sangre

Tal y como se aprecia en la figura 11, los niveles de amonio en sangre son más elevados en los grupos de ratas hiperamonémicas a lo largo de todo el experimento. A las 8 semanas de haber iniciado la dieta rica en amonio, los niveles de amonio en sangre de las ratas hiperamonémicas se ven incluso casi triplicados con respecto a las ratas control ($p < 0.0001$). Las ratas hiperamonémicas tratadas con infliximab muestran una reducción significativa ($p < 0.05$) del amonio en sangre, respecto a las ratas HAV. Sin embargo, las ratas HAI siguen siendo hiperamonémicas.

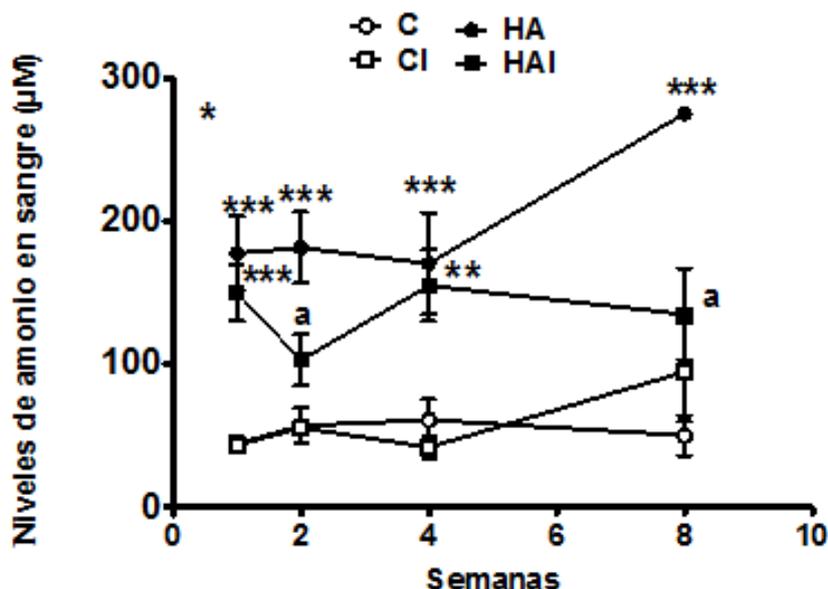


Figura 11. Progresión de los niveles de amonio en sangre medidos en μM durante las 8 semanas del experimento. Los *** o ** hacen referencia a que existen diferencias estadísticamente significativas con respecto a las ratas control.

4.2.2. Factores inflamatorios en sangre

Previamente en el laboratorio se había observado que el $\text{TNF-}\alpha$ estaba significativamente aumentado en el plasma de las ratas hiperamonémicas. Por este motivo se decidió analizar el efecto de un fármaco anti- $\text{TNF-}\alpha$, el cual prevendrá la acción proinflamatoria del $\text{TNF-}\alpha$ en sangre. El efecto del infliximab sobre los niveles de $\text{TNF-}\alpha$ en plasma no se pudo determinar debido a la interferencia entre el anticuerpo monoclonal anti- $\text{TNF-}\alpha$ (infliximab) y al método para determinar los niveles de $\text{TNF-}\alpha$, que siempre implica el uso de anticuerpos (Western Blot).

Mediante la técnica Western Blot, se analizaron los niveles de 3 interleucinas diferentes: IL-6, IL-17 e IL-10. Las IL-6 e IL-17 tienen un efecto proinflamatorio. Por otra parte, la IL-10 está relacionada con la disminución de la respuesta inflamatoria.

4.2.2.1. Los niveles de IL-6 están aumentados en las ratas hiperamonémicas

La inflamación periférica se hace patente mediante el incremento de los niveles de IL-6. Existe una mayor expresión de esta interleucina en las ratas HAV ($154 \pm 14\%$, $p < 0,05$) con respecto a las ratas CV ($98 \pm 5\%$). Las ratas HAI ($132 \pm 12\%$) presentan unos niveles más bajos que las HAV, aunque la diferencia no es estadísticamente significativa. No hay diferencias entre las ratas CV y las CI.

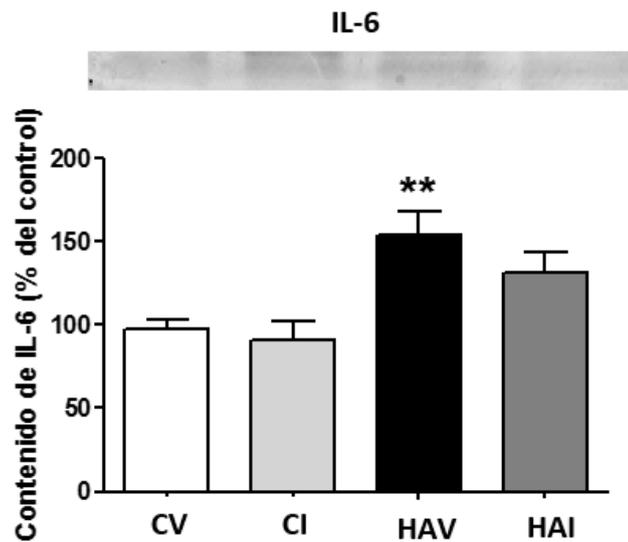


Figura 12. Niveles de IL-6 en el plasma. En la figura se representan la media \pm SEM para los 4 grupos de ratas. Los datos se expresan como % del control \pm SEM. Los ** hacen referencia al nivel de significancia estadística con respecto a las ratas control.

4.2.2.2. El contenido de IL-17 está aumentado en las ratas hiperamonémicas

Los niveles de IL-17, un mediador proinflamatorio, están aumentados en las ratas HAV, en la primera semana de hiperamonemia, con respecto a las ratas CV, aunque esta diferencia no es estadísticamente significativa ya que es necesario aumentar la n. El tratamiento con infliximab parece prevenir este aumento.

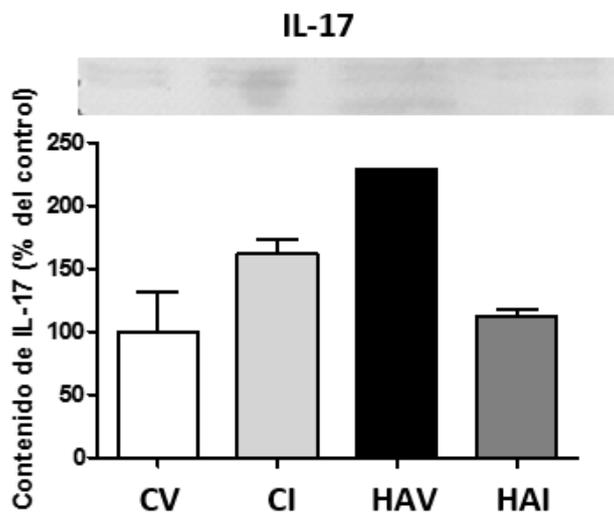


Figura 13. Niveles de IL-17 en el plasma. En la figura se representan la media \pm SEM para los 4 grupos de ratas. Los resultados se presentan como % del control.

4.2.2.3. El contenido de IL-10 está disminuido en las ratas hiperamonémicas

Se midieron los niveles de la interleucina antiinflamatoria IL-10 en el plasma de los 4 grupos de ratas. Se comprobó que los niveles de esta citocina están disminuidos en las HAV ($74 \pm 6 \%$, $p < 0,05$) con respecto a las ratas control vehículo, tras 4 semanas de hiperamonemia. La expresión en las ratas hiperamonémicas tratadas con infliximab ($93 \pm 6 \%$) aumenta, pero no de manera significativa, con respecto a las ratas HAV, sugiriendo que el infliximab podría prevenir la disminución de la IL-10 en plasma. Asimismo, la expresión de IL-10 no varía significativamente entre las ratas CI ($89 \pm 9 \%$) con respecto a las ratas CV.

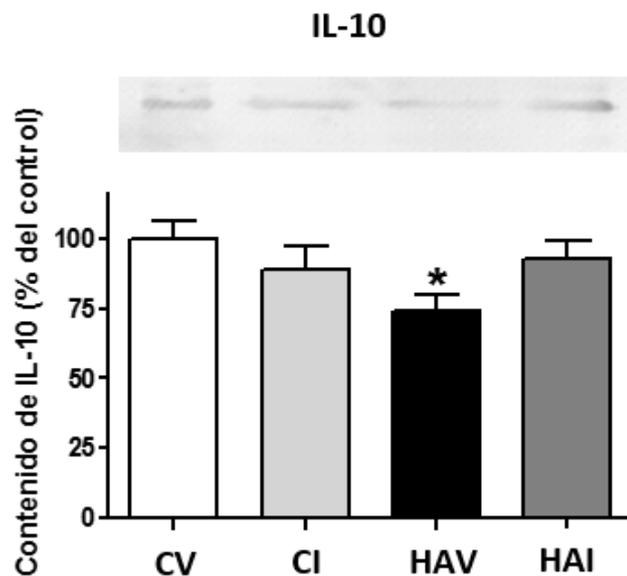


Figura 14. Niveles de IL-10 en plasma. En la figura se representa la media \pm SEM para los 4 grupos de ratas. Los datos se expresan como % del control. El * hace referencia al nivel de significancia estadística con respecto a las CV ($p < 0,05$).

4.3. Test de memoria y aprendizaje espaciales

4.3.1. Las ratas hiperamonémicas tienen empeorada la memoria de trabajo

Como se describe en el apartado de materiales y métodos, se analizó el aprendizaje y memoria espaciales en el laberinto radial de 8 brazos y se calcularon errores de referencia, errores de trabajo y un índice de aprendizaje. Las ratas con hiperamonemia crónica utilizadas en

este estudio no mostraron efectos significativos, diferentes de las controles, en el aprendizaje espacial (errores de referencia e índice de aprendizaje).

Sin embargo, se comprobó que las ratas hiperamonémicas cometen un mayor número de errores de trabajo (66 ± 8 errores de trabajo totales, $p < 0.05$) con respecto a las ratas CV (39 ± 4 errores de trabajo totales). Por tanto, las ratas HA muestran peor memoria de trabajo. Por otra parte, las ratas HAI presentan, de una manera estadísticamente significativa, un menor número de errores de trabajo (40 ± 7 errores de trabajo totales, $p < 0.05$) en comparación con las ratas hiperamonémicas sin tratamiento. No hay diferencias significativas entre las ratas CV y las ratas CI (42 ± 5 errores de trabajo totales). Estos resultados indican que el tratamiento con infliximab previene las alteraciones referidas a la memoria de trabajo.

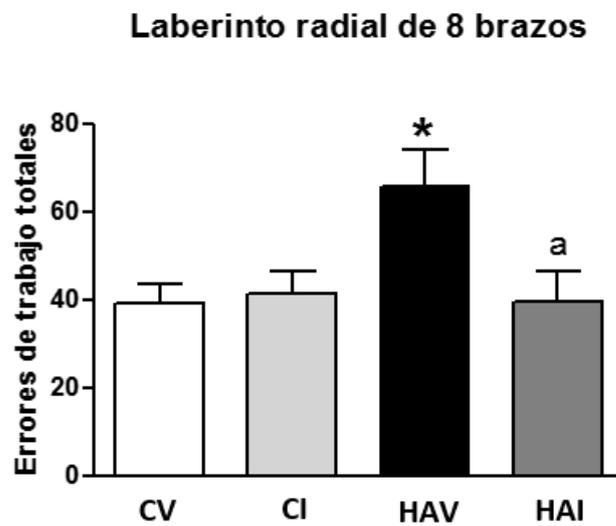


Figura 15. Resultados del laberinto radial de 8 brazos. En el gráfico se muestra la suma de los errores de trabajo durante todos los días de realización del test de los 4 grupos de ratas \pm SEM. El * hace referencia al nivel de significancia estadística existente entre las ratas HAV y las CV ($p < 0.05$). La a hace referencia al nivel de significancia estadística existente entre las ratas HAV y las HAI ($p < 0.05$).

5. Discusión

5.1. Niveles de amonio e inflamación periférica

Como era de esperar, una dieta rica en amonio provoca que el nivel de esta sustancia en sangre se incremente. Las ratas hiperamonémicas presentan niveles de amonio en sangre entre 2 y 3 veces mayores que las ratas control. Las ratas hiperamonémicas tratadas con infliximab presentan unos niveles de amonio en sangre menores que las ratas HA aunque estas ratas siguen teniendo los niveles de amonio en sangre mayores que las ratas control. Esto indica que la disminución de la inflamación periférica por el tratamiento anti-TNF- α tiene un efecto sobre los niveles de amonio. Se ha demostrado que el TNF- α aumenta los niveles y actividad de la glutaminasa, enzima que transforma la glutamina en glutamato más amonio, aumentando así los niveles de amonio (Ye et al., 2013). Una posibilidad es que el infliximab, al bloquear la acción del TNF- α , disminuya la actividad glutaminasa, haciendo así que aumenten menos los niveles de amonio.

Como se ha comentado anteriormente, en las ratas hiperamonémicas se comprobó que el TNF- α en plasma estaba aumentando, indicando que debía haber inflamación periférica. En este trabajo se ha profundizado en el análisis de la inflamación periférica inducida por la hiperamonemia. En el organismo, el sistema inmune mantiene un balance entre distintos factores pro y antiinflamatorios. En respuesta a un proceso patológico, a una infección o a un daño, se liberan en primera instancia distintos mediadores proinflamatorios. Una vez se ha llevado a cabo la respuesta inmune de manera efectiva, se sintetizan factores antiinflamatorios para volver a la homeostasis. El desequilibrio en este proceso puede significar que la respuesta inflamatoria se prolongue en el tiempo más de lo que debería, originándose un desajuste que puede desembocar en un proceso patológico.

En la inflamación, las interleucinas juegan un papel central. En este trabajo se ha analizado el contenido en plasma 3 interleucinas: IL-6, IL-17 y IL-10. La IL-6 y la IL-17 estimulan la respuesta inflamatoria. Por su parte, la IL-10 está relacionada con la actividad antiinflamatoria.

Los niveles de IL-6 se ha visto que están aumentados tanto a nivel cerebral como en el plasma de modelos animales de Alzheimer. Además, es la diana terapéutica para el tratamiento de la artritis reumatoide, una enfermedad autoinmune (Pablos Álvarez, 2009). Tras la primera semana de hiperamonemia, hay un aumento estadísticamente significativo del contenido de IL-6 en las ratas hiperamonémicas, sugiriendo que la hiperamonemia per se produce inflamación periférica.

La IL-17 favorece la respuesta inflamatoria, estimulando la síntesis de distintos mediadores, como IL-6, IL-1 β , TGF- β , y TNF- α . Además, está relacionada con enfermedades inflamatorias, como la psoriasis (Pablos Álvarez, 2009). En nuestro experimento, se comprobó que las ratas hiperamonémicas presentan un aumento en el contenido de la IL-17, en la primera semana de hiperamonemia. Por tanto, la IL-17 podría ser la responsable del aumento de IL-6.

La IL-10, la última interleucina estudiada, es un potente inhibidor de la presentación antigénica y regula y disminuye la respuesta inflamatoria. Se vio en nuestro experimento que

sus niveles están disminuidos en las ratas hiperamonémicas durante varias semanas. La disminución de los niveles de IL-10 en plasma en las ratas hiperamonémicas favorecería que no se inhibiera la expresión de interleucinas proinflamatorias, desplazando así el balance hacia un estado más proinflamatorio.

Los resultados indican que la hiperamonemia, por sí sola, es suficiente para inducir inflamación periférica. El exceso de amonio genera que los niveles de los mediadores inflamatorios se desajusten. Existe un desequilibrio en la respuesta inflamatoria hacia un estado inflamatorio muy marcado. No solo la expresión de citocinas proinflamatorias está aumentada, sino que la respuesta inflamatoria no se revierte debido a la disminución de la expresión de la interleucina antiinflamatoria IL-10.

5.2. Neuroinflamación

La microglía y los astrocitos son los representantes del sistema inmunitario en el cerebro, actuando en los procesos patológicos como células inmunes competentes. En determinadas situaciones, estos dos tipos celulares sufren cambios tanto morfológicos como funcionales. Es bien conocido el hecho de que el sistema inmune y el estado de astrocitos y microglía tienen influencia sobre la función cerebral. La activación como respuesta inmune de estos tipos celulares está relacionada con distintos procesos patológicos, como por ejemplo, en el Alzheimer, el Parkinson (Acosta et al., 2017) y la EH.

Estudios recientes indican la existencia de activación de la microglía tanto en pacientes de EH así como en los modelos animales de la enfermedad (Zemtsova et al., 2011). A parte de cambios en su morfología, la microglía experimenta cambios notables como consecuencia de la activación. La microglía es capaz de sintetizar una gran cantidad de citocinas proinflamatorias, prostanoïdes y mediadores citotóxicos, afectando al ambiente cerebral y causando daño neuronal (Norenberg, 1987). Por su parte, los astrocitos juegan un papel importante en la EH. Los astrocitos en estado patológico se denominan astrocitos del Alzheimer de tipo II siendo esta modificación de los astrocitos indicadora de la existencia de EH.

A las 8 semanas de hiperamonemia no existe activación de la microglía ni en el hipocampo ni en el cerebelo. Por otro lado, los astrocitos están activados tanto en el hipocampo como en la sustancia blanca del cerebelo.

Estos resultados están de acuerdo con estudios recientes, en los que se constata que la activación de la microglía es un suceso de neuroprotección que ocurre de manera temprana en los procesos patológicos (Dennis et al., 2013). Por tanto, a las 8 semanas de hiperamonemia, la activación de la microglía no se hace patente: la microglía se inactiva tras una respuesta de activación inicial. Además, en un trabajo paralelo en nuestro laboratorio, se ha observado que a las 4 semanas de hiperamonemia sí que hay activación de la microglía, lo que refuerza la hipótesis de la inactivación de la microglía tras una respuesta de activación inicial.

Asimismo, en (Liu et al., 2011), se expone que la activación de la microglía y de los astrocitos está relacionada pero ocurre con un patrón espacial y temporal distinto. La microglía

se activa en primera instancia, induciendo la activación de los astrocitos mediante la IL-1. Los astrocitos, una vez han sido activados, inhiben la acción de la microglía.

Por otra parte, la activación de los astrocitos y de la microglía conlleva la expresión de numerosos factores inflamatorios a nivel cerebral. El TNF- α es uno de los primeras citocinas que se sintetizan y juega un papel central en el proceso inflamatorio. Los astrocitos son las principales células productoras de TNF- α a nivel cerebral. La producción de esta citocina está relacionada con los cambios en la permeabilidad de la BHE, induce la activación de otras células y estimula la infiltración de células inmunitarias. Además, el co-cultivo de astrocitos activados con neuronas tiene como resultado la muerte de estas últimas. En estado activado, los astrocitos y la microglía también son capaces de sintetizar IL-1 β . Esta interleucina tiene también efectos citotóxicos sobre las neuronas y los oligodendrocitos. Además, fomenta la síntesis de mediadores proinflamatorios, como la IL-6.

A las 8 semanas de hiperamonemia, la neuroinflamación también se manifiesta a través del aumento de la expresión de IL-1 β y TNF- α en la sustancia blanca de cerebelo. Por otro lado, no hay diferencias significativas en la expresión de IL-1 β a nivel de la región CA1 de hipocampo entre los 4 grupos de ratas. Este aspecto pone de relieve el hecho de que los mecanismos de la neuroinflamación son diferentes en las dos áreas estudiadas, añadiendo un plus de complejidad a la caracterización de la neuroinflamación. El cerebelo parece ser un área más sensible y más susceptible a la neuroinflamación. En el hipocampo, la activación de astrocitos en las ratas hiperamonémicas podría inducir la expresión de otras citocinas, mediadoras de la neuroinflamación, diferentes del TNF- α e IL-1 β , lo cual está siendo actualmente estudiado.

A la luz de los resultados obtenidos, se puede decir que la hiperamonemia genera inflamación periférica, actuando los dos factores conjuntamente para inducir neuroinflamación. El exceso de amonio genera un desequilibrio en los niveles de citocinas periféricas. Estos mediadores proinflamatorios son capaces transducir sus efectos al cerebro.

En la literatura, hay diferentes estudios que relacionan la hiperamonemia con la neuroinflamación. En (Rodrigo et al., 2010), se demostró que en ratas hiperamonémicas sin daño hepático existe neuroinflamación. Estas ratas presentaban una microglía activada y un aumento en la expresión de iNOS, IL-1 β y PGE-2, No obstante, la hiperamonemia puede inducir neuroinflamación directamente por otros mecanismos independientes de la inflamación periférica. El amonio es capaz de alterar la homeostasis del potasio en los astrocitos, aumentando su concentración extracelular y provocando desajustes en la neurotransmisión GABAérgica (Rangroo Thrane et al., 2013). La adición de amonio al cultivo in vitro de células de la microglía induce estrés oxidativo y la expresión de Iba-1. Del mismo modo, la adición de amonio al cultivo in vitro de astrocitos provoca un aumento de la expresión de factores proinflamatorios, como son la IL-1 β y las prostaglandinas.

5.3. Deterioro cognitivo

El deterioro cognitivo está causado fundamentalmente por la alteración de la función cerebral debida a alteraciones en la neurotransmisión. Los mecanismos mediante los cuales la

neuroinflamación produce deterioro cognitivo y motor en ratas hiperamonémicas están siendo estudiados y estos estudios sugieren que la neuroinflamación altera la neurotransmisión, tanto GABAérgica como glutamatérgica (Hernández et al., 2016, Cabrera-Pastor et al., 2016). Además, existen distintos tipos de alteraciones cognitivas, que se caracterizan por ser controladas por distintos mecanismos en zonas cerebrales distintas. La neuroinflamación en cerebelo e hipocampo afectará a la capacidad de implementar, por parte de las ratas, diferentes procesos de memoria y aprendizaje.

En este trabajo las ratas hiperamonémicas tienen empeorada la memoria de trabajo espacial, la cual se modula por el hipocampo, pero también están implicadas otras áreas cerebrales como la corteza prefrontal o el cerebelo, implicado en la memoria de procedimiento (Yoon et al., 2008; Nadel y Hardt, 2010). Por tanto, la existencia de neuroinflamación en el hipocampo y en el cerebelo se traduce en trastornos en la memoria de trabajo en las ratas hiperamonémicas.

5.4. Efecto del infliximab

Como ponen de manifiesto los resultados, el tratamiento con infliximab consigue prevenir la neuroinflamación. En las ratas HAI, el tratamiento con infliximab previene la activación de los astrocitos. Además, el tratamiento con infliximab provoca que la expresión de IL-1 β y TNF- α no esté aumentada a nivel cerebral.

En este escenario, es importante recordar que el infliximab, un potente anti-TNF- α , no consigue atravesar la BHE, por lo que ejerce su función sobre el TNF- α periférico. Aquí hemos demostrado también que el infliximab reduce en parte la inflamación periférica en ratas con hiperamonemia crónica, al prevenir la disminución de la IL-10 antiinflamatoria y reducir la expresión de las interleucinas proinflamatorias IL-6 e IL-17. Los resultados indican que, reduciendo la inflamación periférica, es posible disminuir la respuesta neuroinflamatoria. Este hecho subraya la sinergia existente entre la hiperamonemia y la inflamación periférica para desencadenar la neuroinflamación. Si se restringe la inflamación periférica, aunque haya hiperamonemia, se disminuye la neuroinflamación. La hiperamonemia induce inflamación periférica. Ambos factores en conjunto producen la neuroinflamación.

El tratamiento con infliximab consigue prevenir la neuroinflamación. Además, hemos comprobado en este trabajo que el tratamiento con infliximab en ratas hiperamonémicas previene el deterioro de la memoria de trabajo espacial, ya que disminuye los errores de trabajo en el laberinto radial de 8 brazos. Estos resultados apoyan las hipótesis planteadas en la literatura. El tratamiento con ibuprofeno consiguió restaurar la capacidad de aprender una tarea de discriminación condicionada dependiente del cerebelo en ratas hiperamonémicas (Rodrigo et al., 2010). Del mismo modo, en (Dadsetan et al., 2016a; Dadsetan et al., 2016b) se demostró que el tratamiento con infliximab consigue reducir la inflamación periférica y la neuroinflamación, mejorando la capacidad de aprendizaje en el laberinto radial de 8 brazos y la coordinación motora en ratas con fallo hepático, y de este modo, el deterioro cognitivo y motor.

Por último, es importante destacar que los resultados obtenidos en este trabajo plantean la posibilidad del uso de fármacos anti-TNF- α como posible aproximación terapéutica para la reversión del deterioro cognitivo y motor en EH.

6. Conclusiones

La hiperamonemia crónica induce inflamación periférica.

- Los niveles de IL-17 y IL-6 en plasma están aumentados
- Los niveles de IL-10 en plasma están disminuidos.

La inflamación periférica conduce a la inducción de la neuroinflamación.

- En hipocampo, hay activación de los astrocitos.
- En el cerebelo hay activación de los astrocitos y además los niveles de TNF- α e IL-1 β están aumentados.

Reduciendo la inflamación periférica mediante el tratamiento con infliximab se disminuye la neuroinflamación y el deterioro cognitivo en ratas hiperamonémicas.

7. Bibliografía

- Acosta, C., Anderson, H., & Anderson, C. (2017). Astrocyte dysfunction in Alzheimer disease. *Journal Of Neuroscience Research*.
- Albrecht, J., & Jones, E. (2000). Erratum to 'Hepatic encephalopathy: molecular mechanisms underlying the clinical syndrome'. *Journal Of The Neurological Sciences*, 172(1), 77
- Albrecht, J., & Norenberg, M. (2006). Glutamine: A Trojan horse in ammonia neurotoxicity. *Hepatology*, 44(4), 788-794.
- Azorín, I., Miñana, M., Felipo, V., & Grisolia, S. (1989). A simple animal model of hyperammonemia. *Hepatology*, 10(3), 311-314.
- Basile, A., & Jones, E. (1997). Ammonia and GABA-ergic neurotransmission: Interrelated factors in the pathogenesis of hepatic encephalopathy. *Hepatology*, 25(6), 1303-1305.
- Bernal, W., & Wendon, J. (2013). Acute Liver Failure. *New England Journal Of Medicine*, 369(26), 2525-2534.
- Butterworth, R. (2011). Hepatic encephalopathy: A central neuroinflammatory disorder?. *Hepatology*, 53(4), 1372-1376.
- Cabrera-Pastor, A., Hernandez-Rabaza, V., Taoro-Gonzalez, L., Balzano, T., Llansola, M., & Felipo, V. (2016). In vivo administration of extracellular cGMP normalizes TNF- α and membrane expression of AMPA receptors in hippocampus and spatial reference memory but not IL-1 β , NMDA receptors in membrane and working memory in hyperammonemic rats. *Brain, Behavior, And Immunity*, 57, 360-370.
- Cauli, O., Rodrigo, R., Llansola, M., Montoliu, C., Monfort, P., & Piedrafita, B. et al. (2008). Glutamatergic and gabaergic neurotransmission and neuronal circuits in hepatic encephalopathy. *Metabolic Brain Disease*, 24(1), 69-80.
- Cauli, O., Rodrigo, R., Piedrafita, B., Boix, J., & Felipo, V. (2007). Inflammation and hepatic encephalopathy: Ibuprofen restores learning ability in rats with portacaval shunts. *Hepatology*, 46(2), 514-519.
- Chen, Z., & Trapp, B. (2015). Microglia and neuroprotection. *Journal Of Neurochemistry*, 136, 10-17
- Cichoż-Lach, H., & Michalak, A. (2013). Current pathogenetic aspects of hepatic encephalopathy and noncirrhotic hyperammonemic encephalopathy. *World Journal Of Gastroenterology*, 19(1), 26.
- Coltart, I., Tranah, T., & Shawcross, D. (2013). Inflammation and hepatic encephalopathy. *Archives Of Biochemistry And Biophysics*, 536(2), 189-196.
- Córdoba, J. (2011). New assessment of hepatic encephalopathy. *Journal Of Hepatology*, 54(5), 1030-1040.
- Cordoba, J. (2014). Hepatic Encephalopathy: From the Pathogenesis to the New Treatments. *ISRN Hepatology*, 2014, 1-16.

- Dadsetan, S., Balzano, T., Forteza, J., Agusti, A., Cabrera-Pastor, A., & Taoro-Gonzalez, L. et al. (2016a). Infliximab reduces peripheral inflammation, neuroinflammation, and extracellular GABA in the cerebellum and improves learning and motor coordination in rats with hepatic encephalopathy. *Journal Of Neuroinflammation*, 13(1).
- Dadsetan, S., Balzano, T., Forteza, J., Cabrera-Pastor, A., Taoro-Gonzalez, L., & Hernandez-Rabaza, V. et al. (2016b). Reducing Peripheral Inflammation with Infliximab Reduces Neuroinflammation and Improves Cognition in Rats with Hepatic Encephalopathy. *Frontiers In Molecular Neuroscience*, 9.
- Dennis, C., Sheahan, P., Graeber, M., Sheedy, D., Kril, J., & Sutherland, G. (2013). Microglial proliferation in the brain of chronic alcoholics with hepatic encephalopathy. *Metabolic Brain Disease*, 29(4), 1027-1039.
- De Vries, H., Blom-Roosemalen, M., Oosten, M., de Boer, A., van Berkel, T., Breimer, D., & Kuiper, J. (1996). The influence of cytokines on the integrity of the blood-brain barrier in vitro. *Journal Of Neuroimmunology*, 64(1), 37-43.
- Erceg, S., Monfort, P., Hernández-Viadel, M., Rodrigo, R., Montoliu, C., & Felipo, V. (2005). Oral administration of sildenafil restores learning ability in rats with hyperammonemia and with portacaval shunts.
- Felipo, V., Urios, A., Montesinos, E., Molina, I., Garcia-Torres, M., & Civera, M. et al. (2011). Contribution of hyperammonemia and inflammatory factors to cognitive impairment in minimal hepatic encephalopathy. *Metabolic Brain Disease*, 27(1), 51-58.
- Felipo, V. (2013). Hepatic encephalopathy: effects of liver failure on brain function. *Nature Reviews Neuroscience*, 14(12), 851-858.
- Ferenci, P., Lockwood, A., Mullen, K., Tarter, R., Weissenborn, K., & Blei, A. (2002). Hepatic encephalopathy—Definition, nomenclature, diagnosis, and quantification: Final report of the Working Party at the 11th World Congresses of Gastroenterology, Vienna, 1998. *Hepatology*, 35(3), 716-721.
- Häussinger, D., Kircheis, G., Fischer, R., Schliess, F., & Dahl, S. (2000). Hepatic encephalopathy in chronic liver disease: a clinical manifestation of astrocyte swelling and low-grade cerebral edema?. *Journal Of Hepatology*, 32(6), 1035-1038.
- 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(1).
- Jalan, R., & Bernuau, J. (2007). Induction of cerebral hyperemia by ammonia plus endotoxin: Does hyperammonemia unlock the blood–brain barrier?. *Journal Of Hepatology*, 47(2), 168-171.
- Jalan, R., Pollok, A., Shah, S., Madhavan, K., & Simpson, K. (2017). *Liver derived pro-inflammatory cytokines may be important in producing intracranial hypertension in acute liver failure.*
- Jayakumar, A., Rama Rao, K., & Norenberg, M. (2015). Neuroinflammation in Hepatic Encephalopathy: Mechanistic Aspects. *Journal Of Clinical And Experimental Hepatology*, 5, S21-S28.

- Koff, R., & Mullen, K. (1994). Hepatic encephalopathy: Syndromes and therapies. Edited by H.O. Conn and J. Bircher, 429 pp. Bloomington, IL: Medi-Ed Press, 1994. \$63.95. *Hepatology*, 20(4), 1099-1100.
- Liu, W., Tang, Y., & Feng, J. (2011). Cross talk between activation of microglia and astrocytes in pathological conditions in the central nervous system. *Life Sciences*, 89(5-6), 141-146.
- Montoliu, C., Llansola, M., & Felipo, V. (2015). Neuroinflammation and neurological alterations in chronic liver diseases. *Neuroimmunology And Neuroinflammation*, 2(3), 138.
- Montoliu, C., Piedrafita, B., Serra, M., del Olmo, J., Urios, A., Rodrigo, J., & Felipo, V. (2009). IL-6 and IL-18 in Blood May Discriminate Cirrhotic Patients With and Without Minimal Hepatic Encephalopathy. *Journal Of Clinical Gastroenterology*, 43(3), 272-279.
- Nabi, E., & Bajaj, J. (2013). Useful Tests for Hepatic Encephalopathy in Clinical Practice. *Current Gastroenterology Reports*, 16(1).
- Nadel, L., & Hardt, O. (2010). Update on Memory Systems and Processes. *Neuropsychopharmacology*, 36(1), 251-273.
- Norenberg, M. (1987). The role of astrocytes in hepatic encephalopathy. *Neurochemical Pathology*, 6(1-2), 13-33.
- Norenberg, M., Jayakumar, A., & Rama Rao, K. (2004). Oxidative Stress in the Pathogenesis of Hepatic Encephalopathy. *Metabolic Brain Disease*, 19(3/4), 313-329.
- Odeh, M. (2007). Pathogenesis of hepatic encephalopathy: the tumour necrosis factor- α theory. *European Journal Of Clinical Investigation*, 37(4), 291-304.
- Odeh, M., Sabo, E., Srujo, I., & Oliven, A. (2005). Relationship between tumor necrosis factor-alpha and ammonia in patients with hepatic encephalopathy due to chronic liver failure. *Annals Of Medicine*, 37(8), 603-612.
- Pablos Álvarez, J. (2009). La interleucina 6 en la fisiopatología de la artritis reumatoide. *Reumatología Clínica*, 5(1), 34-39.
- Rama Rao, K., Jayakumar, A., Tong, X., Alvarez, V., & Norenberg, M. (2010). Marked potentiation of cell swelling by cytokines in ammonia-sensitized cultured astrocytes. *Journal Of Neuroinflammation*, 7(1), 66.
- Rangroo Thrane, V., Thrane, A., Wang, F., Cotrina, M., Smith, N., & Chen, M. et al. (2013). Ammonia triggers neuronal disinhibition and seizures by impairing astrocyte potassium buffering. *Nature Medicine*, 19(12), 1643-1648.
- Rodrigo, R., Cauli, O., Gomez-Pinedo, U., Agusti, A., Hernandez-Rabaza, V., Garcia-Verdugo, J., & Felipo, V. (2010). Hyperammonemia Induces Neuroinflammation That Contributes to Cognitive Impairment in Rats With Hepatic Encephalopathy. *Gastroenterology*, 139(2), 675-684.
- Rovira, A., Mínguez, B., Aymerich, F., Jacas, C., Huerga, E., Córdoba, J., & Alonso, J. (2007). Decreased white matter lesion volume and improved cognitive function after liver transplantation. *Hepatology*, 46(5), 1485-1490.
- Shawcross, D., Wright, G., Olde Damink, S., & Jalan, R. (2007). Role of ammonia and inflammation in minimal hepatic encephalopathy. *Metabolic Brain Disease*, 22(1), 125-138.

- Stinton, L., & Jayakumar, S. (2013). Minimal Hepatic Encephalopathy. *Canadian Journal Of Gastroenterology*, 27(10), 572-574.
- Tapper, E., Jiang, Z., & Patwardhan, V. (2017). *Refining the Ammonia Hypothesis*.
- Weissenborn, K., Ennen, J., Schomerus, H., Rückert, N., & Hecker, H. (2001). Neuropsychological characterization of hepatic encephalopathy. *Journal Of Hepatology*, 34(5), 768-773.
- Williams, R. (2007). Review article: bacterial flora and pathogenesis in hepatic encephalopathy. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 25, 17-22.
- Wright, G., Vairappan, B., Stadlbauer, V., Mookerjee, R., Davies, N., & Jalan, R. (2012). Reduction in hyperammonaemia by ornithine phenylacetate prevents lipopolysaccharide-induced brain edema and coma in cirrhotic rats. *Liver International*, n/a-n/a.
- Ye, L., Huang, Y., Zhao, L., Li, Y., Sun, L., & Zhou, Y. et al. (2013). IL-1 β and TNF- α induce neurotoxicity through glutamate production: a potential role for neuronal glutaminase. *Journal Of Neurochemistry*, 125(6), 897-908.
- Yoon, T., Okada, J., Jung, M., & Kim, J. (2008). Prefrontal cortex and hippocampus subserve different components of working memory in rats. *Learning & Memory*, 15(3), 97-105.
- Zemtsova, I., Görg, B., Keitel, V., Bidmon, H., Schrör, K., & Häussinger, D. (2011). Microglia activation in hepatic encephalopathy in rats and humans. *Hepatology*, 54(1), 204-215.