

CENTRO DE INVESTIGACIÓN PRÍNCIPE FELIPE
FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD DE VALENCIA



VNIVERSITATIS VALÈNCIA

Papel de los neuroesteroides en la modulación de la vía glutamato-óxido nítrico-GMP cíclico. Alteraciones en hiperamonemia crónica. Papel en las alteraciones cognitivas y motoras en encefalopatía hepática. Mecanismos moleculares e implicaciones terapéuticas.

Tesis doctoral

Presentada por Alba González Usano

Dirigida por Dr. Vicente Felipo

Dr. Omar Cauli

Dr. Esteban Morcillo

Doctorado en Biomedicina y Farmacia

Valencia, 2013



PRINCIPE FELIPE
CENTRO DE INVESTIGACION

El Dr. **Vicente Felipo Orts**, Investigador y Jefe del Laboratorio de Neurobiología del Centro de Investigación Príncipe Felipe,

El Dr. **Omar Cauli**, Investigador y Profesor del departamento de Enfermería de la Universidad de Valencia,

El Dr. **Esteban Morcillo Sánchez**, Investigador y Catedrático del departamento Farmacología de la Universidad de Valencia,

CERTIFICAN:

Que la memoria de Tesis Doctoral realizada por D^a Alba González Usano, titulada "Papel de los neuroesteroides en la modulación de la vía glutamato-óxido nítrico-GMP cíclico. Alteraciones en hiperamonemia crónica. Papel en las alteraciones cognitivas y motoras en encefalopatía hepática. Mecanismos moleculares e implicaciones terapéuticas", ha sido realizada bajo su dirección y reúne todos los requisitos necesarios para su juicio y calificación.

En Valencia, Julio de 2013.

Vicente Felipo

Omar Cauli

Esteban Morcillo

A Emma



AGRADECIMIENTOS

Escribir los agradecimientos puede ser lo más difícil y una de las cosas que más ilusión hace al acabar la tesis. Es difícil concentrar en tan poco espacio la gratitud hacia todas las personas que, de un modo u otro, han hecho posible que llegue a cumplir este sueño.

Gracias a mis directores, principalmente a Vicente Felipo y a Omar Cauli por darme la oportunidad de trabajar en su equipo y brindarme su guía profesional en este mundo de la ciencia.

También un gracias enorme a todos los compis del labo: Anita, Andru, Carleta, Mar, Marta, M^aCarmen, Michele, Paqui-Paqui y Vite. También a los que habéis estado de paso o ya no estáis. Sin vosotros, la tesis estaría coja porque hay parte de todos vosotros en ella. Sois un laboratorio genial y tengo estos cuatro años llenos de recuerdos buenos: las cenitas, el baile para Omar, los cotilleos, las risas... Os voy a echar mucho mucho de menos! No sabéis cuánto!!

No puedo olvidarme de agradecer la importante ayuda involuntaria de mis ratitas, sin vosotras, seguro que no habría sido posible llegar al final. Sobre todo, un recuerdo especial para Bolita.

Gracias también al grupo del Dr. Dalley de Cambridge por darme la oportunidad de realizar mi estancia allí. También agradecérselo a Becca, Anushka y Camilla por todo lo que me enseñaron y las charlas para hacer amena la espera de las ratitas. Y por supuesto a los amigos que hice allí, tanto españoles (Mireia, Cristina, Fermín y Fernando) como ingleses (Margaret y Donald) que me ayudaron a "soportar" el clima inglés y sentirme un poco más cerca de casa.

Quiero también agradecerles el apoyo a mis chicas: Vane, Pilarcilla, Sonieta y M^aCarmen. Os quiero mucho, siempre que os

necesito estáis ahí y estoy muy orgullosa de poder llamaros amigas. También a los chicos, cómo no, sobre todo a Alejandro.

Sin duda, no puedo dejar de agradecer a mi familia el apoyo incondicional que me habéis dado desde que, hace ya unos cuantos años, decidí intentar dedicarme a la ciencia. Gracias mamá por los ánimos, por creer en mí, por intentar entender lo enrevesado de este mundo y ayudarme en todo lo que has podido. Y abuela, muchas gracias por tenerme siempre un platito de comida esperando y todas las velas que le has puesto a San Antonio para que esta tesis llegara a su fin. Os quiero mucho a todos.

Y, cómo no, gracias también a mi Simbi por las horas interminables bajo mi silla mientras escribía esta tesis y tener siempre preparado un lametón o un rabito contento para levantar el ánimo.

Por último, un GRACIAS con mayúsculas a mi compañero, mi amigo y el pilar de mi vida: David. Gracias por tranquilizarme cuando me agobio (que es muchas veces), por tu sensatez, por tu alegría, por hacerme sentir querida, por tener siempre una palabra de cariño y un "guapa" aunque esté hecha una piltrafa,... En definitiva, por dejarme compartir mi vida contigo. Vas a ser un padrazo, ya verás!

TABLA DE ABREVIATURAS

- ALLO: alopregnanolona-acetato
- AMPA: ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropinoico
- BDL: ligadura del conducto biliar
- CamKII: calcio calmodulín kinasa II
- CNT: control/es
- DHEA: dehidroepiandrosterona
- DHEAS: sulfato de dehidroepiandrosterona
- GABA: ácido γ -aminobutírico
- GAD: glutamato descarboxilasa
- GCs: guanilato ciclasa soluble
- Glu: glutamato
- Glu-NO-GMPc: glutamato-óxido nítrico-guanosín monofosfato cíclico
- GMPc: guanosín monofosfato cíclico
- HA: hiperamonémica/s
- HPLC: cromatografía líquida de alta presión
- iGluRs: receptores ionotrópicos de glutamato
- LDP: depresión a largo plazo
- LTP: potenciación a largo plazo
- mGluRs: receptores metabotrópicos de glutamato
- NMDA: N-metil-D-aspartato
- NO: óxido nítrico
- NOS: óxido nítrico sintasa
- NOSn: óxido nítrico sintasa neuronal
- OPA: orto-ftalaldehido
- PregA: pregnanolona
- PregE: pregnenolona
- PregS: sulfato de pregnenolona
- PCS: anastomosis portocava

- SNC: sistema nervioso central
- StAr: proteína de regulación aguda de la esteroidogénesis
- THDOC: tetrahidrodeoxicorticosterona
- TSPO: proteína traslocadora
- VEH: vehículo

ÍNDICE

I. Introducción	1
1. Encefalopatía hepática.....	3
1.1 Alteraciones neuropsiquiátricas	4
2. Amonio.....	7
2.1 Metabolismo	8
2.2 Toxicidad del amonio: situaciones clínicas de hiperamonemia.....	10
3. Modelos animales de encefalopatía hepática	13
3.1 Ligadura biliar (bile duct ligation, BDL)	13
3.2 Anastomosis portocava (portacaval shunt, PCS)	14
3.3 Hiperamonemia crónica sin fallo hepático	15
4. Neurotransmisión glutamatérgica. Papel en las alteraciones asociadas a encefalopatía hepática.....	16
4.1 Receptores de glutamato.....	17
4.2 Alteraciones de la neurotransmisión glutamatérgica en encefalopatía hepática	21
5. Neurotransmisión GABAérgica. Papel en las alteraciones asociadas a la encefalopatía hepática	26
5.1 Receptores GABA	27
5.2 Neurotransmisión GABAérgica en cerebelo	29
5.3 Alteraciones de la neurotransmisión GABAérgica en encefalopatía hepática.....	36
5.4 Tono GABAérgico y coordinación motora.....	39
6. Receptores sigma	40

7. Neuroesteroides	41
7.1 Síntesis de neuroesteroides	42
7.2 Función fisiológica de los neuroesteroides.....	46
7.3 Implicación de los neuroesteroides en el aprendizaje y la memoria.	48
7.4 Posible papel de los neuroesteroides en la modulación de la función de la vía glutamato-óxido nítrico-GMP cíclico.	51
7.5 Alteraciones de las concentraciones neuroesteroides en hiperamonemia y encefalopatía hepática.....	52
II. Objetivos	55
III. Material y Métodos	59
1. Animales	61
2. Análisis de la función de la vía glutamato-óxido nítrico-GMP cíclico por microdiálisis en cerebelo <i>in vivo</i>	62
2.1 Implantación de la guía de microdiálisis en el cerebelo	62
2.2 Experimento de microdiálisis <i>in vivo</i> en cerebelo	63
3. Determinación de citrulina, glutamato, GABA y GMPc en las muestras de microdiálisis.....	66
3.1 Determinación de citrulina, glutamato y GABA	66
3.2 Determinación de GMPc	67
4. Administración crónica intracerebral de sulfato de pregnenolona a las ratas	67
5. Aprendizaje de una tarea de discriminación condicionada. Test del laberinto en Y.....	69
6. Análisis de la función motora.....	71
6.1 Coordinación motora: Beam-walking	71

6.2 Actividad motora	72
7. Determinación de los niveles de amonio en sangre.....	72
8. Análisis estadístico	73
IV. Resultados	75
1. Modulación de la función de la vía Glu-NO-GMPc en cerebelo de ratas control por distintos neuroesteroides.....	77
1.1 Efectos sobre el GMPc extracelular	77
1.2 Niveles de citrulina	83
2. Efectos de la hiperamonemia sobre la modulación de la función de la vía Glu-NO-GMPc en cerebelo por distintos neuroesteroides.....	85
2.1 Efectos sobre el GMPc extracelular	86
2.2 Niveles de citrulina	92
3. Efectos del tratamiento crónico intracerebral con sulfato de pregnenolona sobre la función cognitiva y motora en ratas hiperamonémicas. Mecanismos implicados.....	93
3.1 El sulfato de pregnenolona no afecta los niveles de amonio en sangre	94
3.2 Efecto del tratamiento crónico con sulfato de pregnenolona sobre la concentración extracelular de glutamato y GABA en cerebelo	95
3.3 El tratamiento crónico con sulfato de pregnenolona restaura la coordinación motora en ratas hiperamonémicas.....	96
3.4 Efectos del tratamiento crónico con sulfato de pregnenolona sobre la actividad motora.....	98
3.5 El sulfato de pregnenolona aumenta los niveles basales de GMPc y recupera la función de la vía Glu-NO-GMPc en ratas hiperamonémicas.....	99

3.6 El tratamiento crónico con sulfato de pregnenolona restaura la capacidad de aprendizaje de una tarea de discriminación condicionada en ratas hiperamonémicas.	101
V. Discusión	103
1. Modulación de la vía Glu-NO-GMPc por distintos neuroesteroides en ratas control.....	105
2. Efectos de la hiperamonemia sobre la modulación por neuroesteroides de la función de la vía Glu-NO-GMPc	113
3. Tratamiento crónico intracerebral con sulfato de pregnenolona en ratas control e hiperamonémicas.....	121
3.1 El tratamiento crónico con sulfato de pregnenolona restaura la función de la vía Glu-NO-GMPc en cerebelo y la capacidad de aprendizaje en el laberinto en Y en ratas hiperamonémicas.....	121
3.2 El tratamiento crónico con sulfato de pregnenolona no afecta la actividad motora espontánea.....	123
3.3 El tratamiento crónico con sulfato de pregnenolona normaliza los niveles basales de GABA extracelular y la coordinación motora en ratas hiperamonémicas.....	124
VI. Conclusiones.....	127
VII. Bibliografía	131

I. INTRODUCCIÓN

1. ENCEFALOPATÍA HEPÁTICA

La encefalopatía hepática es un síndrome neuropsiquiátrico complejo que refleja una alteración funcional del sistema nervioso central que se presenta en pacientes con enfermedades hepáticas crónicas o agudas. La encefalopatía hepática se define como una alteración de la función del sistema nervioso central subsiguiente a un fallo hepático y puede progresar en diferentes estadios hasta el coma (1, 2). Se clasifica en 3 tipos (1):

- **Tipo A, o encefalopatía hepática aguda**, suele ocurrir en el marco de un fallo hepático fulminante con necrosis masiva del hígado y una rápida progresión de los síntomas. Entre las causas cabe destacar las hepatitis virales agudas, intoxicación por paracetamol y reacciones idiosincrásicas a fármacos. El grado de mortalidad en la encefalopatía hepática aguda es muy elevado y se debe frecuentemente a un aumento de la presión intracraneal como consecuencia de un edema cerebral.
- **Tipo B, o encefalopatía hepática crónica**, por derivación porto-sistémica sin enfermedad hepatocelular intrínseca. Existen derivaciones porto-sistémicas espontáneas, como la causada por la obstrucción de la vena porta extra-hepática. Es una causa común de hipertensión portal en niños (2). Estos pacientes presentan flujo sanguíneo hepático reducido, concentraciones de amonio en sangre aumentadas, la relación glutamina/creatinina aumentada y en ocasiones anastomosis porta-cava espontánea.
- **Tipo C, o encefalopatía hepática crónica**, asociada a cirrosis hepática e hipertensión portal. Es la más frecuente. También genera derivaciones porto-sistémicas como consecuencia de enfermedades crónicas del hígado, generalmente cirrosis, con una apreciable desviación de la sangre portal a la circulación

sistémica (encefalopatía porto-sistémica). Se pueden producir episodios de encefalopatía hepática clínica como consecuencia de determinados factores desencadenantes (hemorragia digestiva, alta ingesta de proteínas, estreñimiento, infección). Estos episodios de encefalopatía hepática son habitualmente reversibles cuando el factor desencadenante es eliminado. La desviación porto-sistémica también se realiza en los hospitales para tratar problemas como la hemorragia digestiva secundaria a ruptura de várices esofagogástricas, una complicación muy frecuente y severa de los pacientes con cirrosis hepática e hipertensión portal.

Además de estos tres tipos de encefalopatía hepática clínica, existe la encefalopatía hepática mínima. La encefalopatía hepática mínima se da en pacientes con cirrosis hepática que no presentan signos clínicos evidentes de encefalopatía hepática pero presentan diversos déficits cognitivos (percepción visuo-espacial, atención, concentración,...) que no son detectables en un examen neurológico rutinario pero se ponen de manifiesto cuando se realizan tests psicométricos adecuados (3).

La encefalopatía hepática es un factor predictivo de mortalidad en los pacientes cirróticos.

1.1 Alteraciones neuropsiquiátricas

La encefalopatía hepática crónica se desarrolla lentamente y los síntomas varían desde ligeros déficits de atención y cambios en la personalidad en la encefalopatía hepática mínima, a enlentecimiento psicomotor, falta de atención y síntomas extrapiramidales como hipomimia (falta de expresión facial) y bradiquinesia en grado I de encefalopatía hepática, desorientación y comportamiento extraño en grado II, acabando finalmente en estupor y coma en grados III y IV (4). Los signos más tempranos suelen ser alteraciones en el sueño y

cambios en el comportamiento, que no son obvios para el médico que examina al paciente pero sí para los familiares y amigos de éste (5).

El espectro clínico de la encefalopatía hepática es muy amplio, por lo que su diagnóstico puede ser difícil dado que no existe un síntoma o examen de laboratorio específico para su diagnóstico.

La gravedad de la encefalopatía hepática clínica se clasifica en 4 grados según las manifestaciones neuropsicológicas. En la Tabla 1 se presentan los criterios de West–Haven para la estadificación del grado de encefalopatía en pacientes con encefalopatía hepática clínica (6).

Tabla 1: Criterios de West-Haven para la estadificación del estado mental en encefalopatía hepática clínica.

Grado	Sintomatología
0	Sin anormalidad detectada.
1	Leve falta de atención e incapacidad para mantenerla, euforia, ansiedad. Dificultad para realizar suma o sustracción de números sencillos.
2	Letargo, apatía, desorientación en tiempo y espacio. Cambios obvios de la personalidad.
3	Somnolencia a semiestupor, pero con respuesta a estímulos. Confusión, desorientación importante.
4	Coma. Sin posibilidad de realizar pruebas de función mental.

1.1.1 Alteraciones cognitivas

Las alteraciones cognitivas comienzan con falta de concentración y de atención, así como una disminución de la capacidad intelectual. Los pacientes con encefalopatía hepática presentan un descenso continuo en la atención acompañado de un descenso en el estado de alerta desde el grado II al grado III finalizando en coma (4). Incluso los pacientes que parecen no estar clínicamente afectados manifiestan distintos déficits de atención en tests psicométricos, indicando una disfunción de los tres subsistemas que cooperan en la atención: vigilia (capacidad para mantener el

estado de alerta), orientación y funciones ejecutivas (como hacer planes, detección de errores, resolución de conflictos, etc.).

En fases más avanzadas la falta de atención se agudiza de forma que cuando se formula una pregunta a un paciente, frecuentemente hay que repetir la cuestión y las repuestas son lentas y a menudo carentes de sentido (4).

1.1.2 Alteraciones motoras

En pacientes con encefalopatía hepática crónica se presentan frecuentemente alteraciones en la actividad y coordinación motoras (Tabla 2) (7). Los trastornos del movimiento (8) pueden ser debidos a alteraciones en uno o más de los 3 grandes sistemas motores que configuran la organización del sistema en mamíferos: vía cortico-espinal, circuitos de los ganglios basales y cerebelo. En los pacientes con encefalopatía hepática crónica se han descrito alteraciones y síntomas relacionados con los tres niveles de organización.

Tabla 2: Alteraciones motoras en pacientes con encefalopatía hepática (clasificación West-Haven).

Grado	Sintomatología
0	Cambios sutiles en pruebas de conexión numérica o en pruebas psicométricas.
1	Temblor, incoordinación, apraxia ^a .
2	Asterixis ^b , lenguaje lento o incomprensible, ataxia ^c .
3	Reflejos hipoactivos, nistagmo ^d , rigidez muscular y clonus ^e .
4	Postura descerebrada y dilatación pupilar, reflejo oculocefálico ^f , ausencia de respuesta a estímulos en estadios avanzados.

a Trastorno de la ejecución del movimiento aprendido que no puede ser explicado como consecuencia de debilidad muscular, pérdida sensorial o falta de comprensión o atención a las órdenes verbales.

b Temblor de las manos en forma de aleteo.

c Ausencia o irregularidad en la coordinación de los movimientos musculares.

d Espasmo clónico de los músculos motores del globo ocular, que produce movimientos involuntarios de éste en varios sentidos.

e Serie de contracciones rítmicas e involuntarias, de un músculo o grupo muscular por la extensión brusca y pasiva de sus tendones.

f Se desencadena con los ojos abiertos y mediante giro de la cabeza con rapidez de un lado hacia el otro. El paciente comatoso cuyo tallo encefálico este intacto dirige los ojos en la dirección opuesta a aquella en que se gira la cabeza.

Manifestaciones clínicas motoras relacionadas con un mal funcionamiento de los ganglios basales (signos extrapiramidales) se

han descrito en pacientes con encefalopatía hepática mínima y cirrosis hepática compensada (9). La presencia de alteraciones motoras extrapiramidales predice el desarrollo de encefalopatía hepática clínica y los signos como la incoordinación, ataxia o asterixis, avanzan a medida que avanza la enfermedad reduciendo la calidad de vida (9).

Las alteraciones de la coordinación motora (cerebelares) están presentes en pacientes con encefalopatía hepática de grado I y II, y las alteraciones de la vía cortico-espinal en pacientes desde grado I al IV de encefalopatía hepática (4).

1.1.3 Otras alteraciones

Se ha descrito irritabilidad, apatía, trastornos de la conducta, cambios en el apetito, mirada fija, amnesia, cambios en el temperamento y en la personalidad. Algunos pacientes pasan de la depresión a la euforia en pocos minutos. Otros pacientes presentan sólo depresión o euforia alternadas con un temperamento estable. Los síntomas paranoicos suelen ser comunes durante el estupor como resultado de las dificultades en la percepción y la interpretación. También pueden aparecer alucinaciones (10).

Un 50% de los pacientes con cirrosis hepática presentan alteraciones del sueño caracterizadas por somnolencia durante el día, sobre todo a primeras horas, letargia y sopor, mientras que durante la noche la calidad del sueño está disminuida: duermen menos tiempo y el sueño está fragmentado con múltiples despertares (11).

2. AMONIO

Uno de los principales factores que contribuyen al deterioro neurológico en la encefalopatía hepática es el aumento de la concentración de amonio en sangre y cerebro.

2.1 Metabolismo

El amonio tiene un papel fundamental en la homeostasis del nitrógeno y participa en el catabolismo y anabolismo de compuestos importantes para el organismo. Es un producto de la degradación de aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos y otros compuestos, y es el principal producto del metabolismo nitrogenado en todas las células del organismo (12, 13).

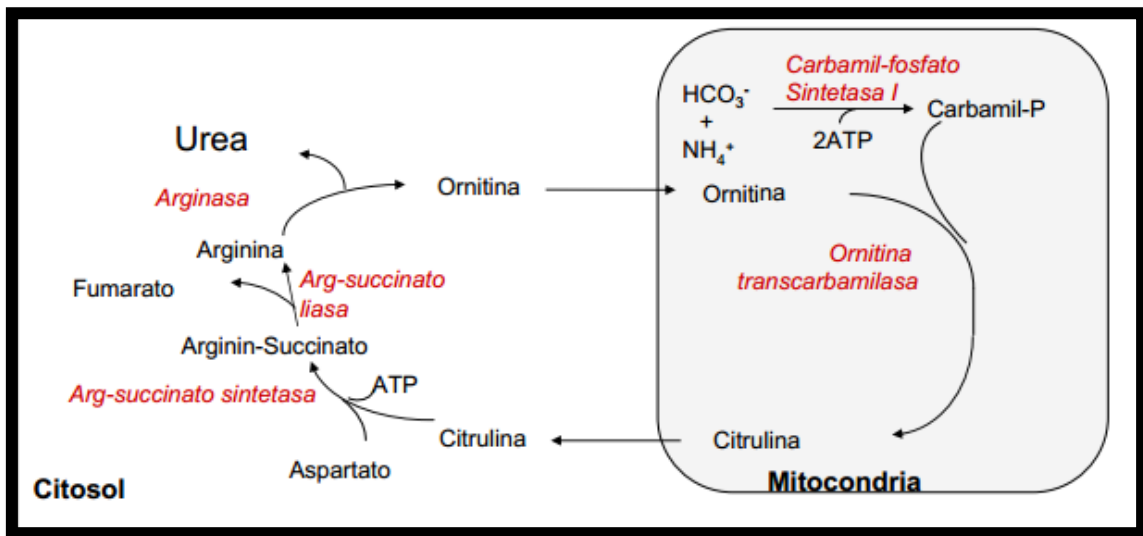


Figura 1: Ciclo de la urea. En la mitocondria el amonio es incorporado por acción de la carbamil-fosfato sintetasa I en carbamil fosfato, el cual junto con la ornitina son sustratos de la ornitina transcarbamilasa que los transforma en citrulina. Ésta sale al citosol donde reacciona con el aspartato dando lugar a arginina por la acción conjunta de la arginina-succinato sintetasa y la arginina-succinato liasa. A continuación, la arginasa degrada la arginina a ornitina, que puede volver a entrar en la mitocondria, y a urea que es eliminada en la orina.

Sin embargo, a concentraciones altas el amonio es tóxico, por lo que el amonio producido debe ser eliminado. El amonio es excretado en forma de urea (organismos ureotélicos), de ácido úrico (organismos uricotélicos) o de amoniaco (organismos amoniotélicos). Los humanos y el resto de mamíferos somos ureotélicos ya que el hígado, mediante el ciclo de la urea, incorpora el amonio en urea que pasa a la sangre desde donde es eliminada en la orina.

I. Introducción

El hígado es el único órgano que expresa todos los enzimas del ciclo de la urea. Para prevenir los efectos tóxicos de los niveles altos de amonio, el resto de tejidos lo incorporan en glutamina. La glutamina permite almacenar el amonio en forma no tóxica de manera temporal, mantenerlo dentro de niveles aceptables y transportarlo hasta el hígado para su eliminación. El proceso de detoxificación del amonio en tejidos no hepáticos es el siguiente:

1. el amonio se une al glutamato mediante una reacción catalizada por la glutamina sintetasa, formando glutamina.
2. la glutamina pasa al torrente sanguíneo desde donde la captura el hígado, que la hidroliza de nuevo en glutamato y amonio por acción de la glutaminasa.
3. este amonio es entonces incorporado en urea y eliminado en la orina.

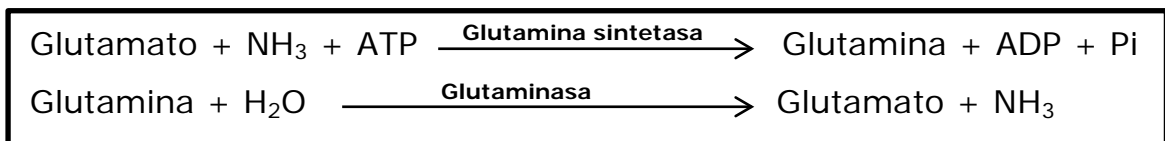


Figura 2: síntesis y desaminación de la glutamina.

La formación de glutamina por la glutamina sintetasa mediante la incorporación de una molécula de amonio a una de glutamato se considera el único mecanismo importante por el que se puede detoxificar el amonio en cerebro.

Los niveles de amonio en sangre ($\approx 100 \mu\text{M}$ en el hombre, $\approx 150 \mu\text{M}$ en la rata) están estrictamente regulados. A concentraciones mayores de amonio comienza a aparecer visión borrosa, pérdida de consciencia, letargia, lesiones cerebrales, coma. La concentración de amonio es el resultado del equilibrio entre su formación y eliminación por diferentes sistemas. Además de los del ciclo de la urea, otros enzimas importantes en el metabolismo del amonio son la glutaminasa, glutamina sintetasa, glutamato deshidrogenasa, AMP

(adenosín-monofosfato) desaminasa y los enzimas que constituyen el llamado ciclo de los nucleótidos de purina. En los mamíferos los enzimas más importantes involucrados directamente en la eliminación del amonio son carbamil fosfato sintetasa, glutamina sintetasa y glutamato dehidrogenasa.

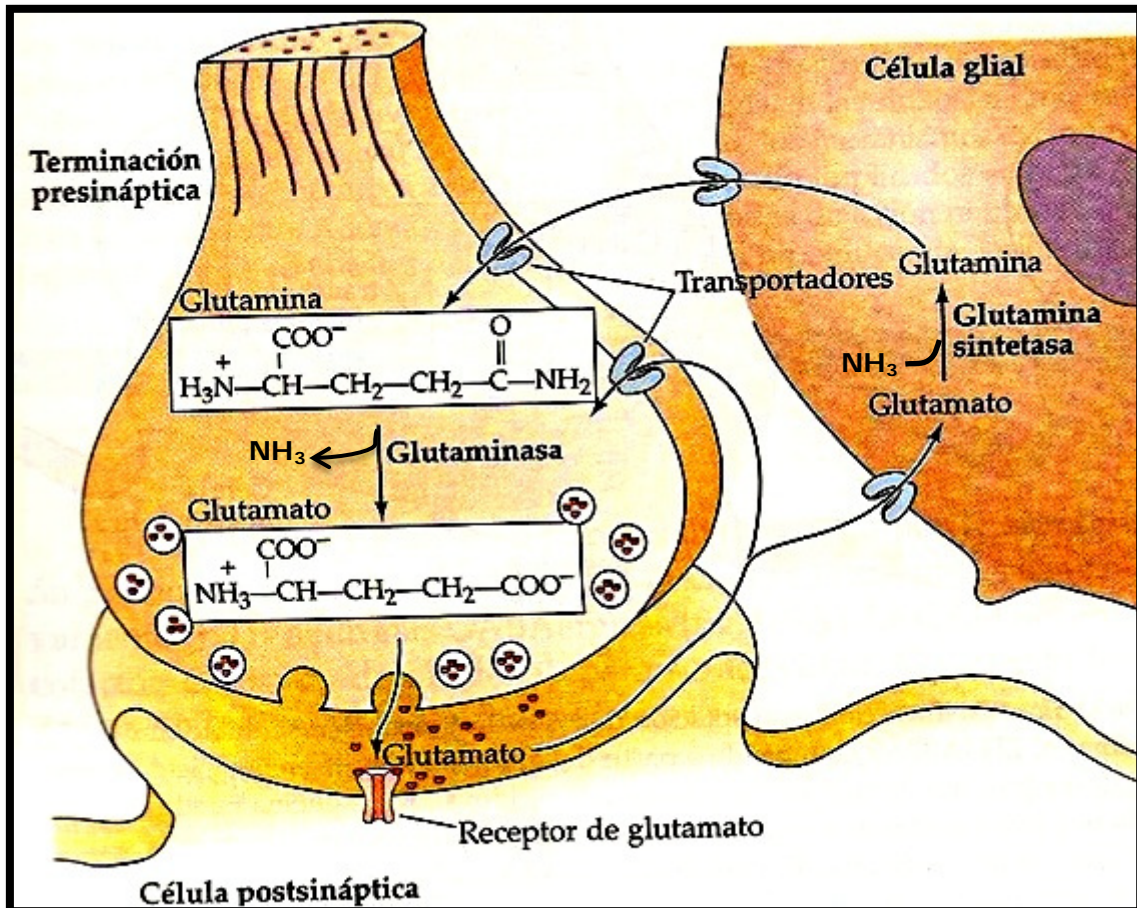


Figura 3: Ciclo glutamato-glutamina. En la neurona presináptica la glutaminasa, localizada en las mitocondrias, transforma la glutamina en glutamato que es almacenado en vesículas presinápticas hasta el momento de ser liberado al espacio sináptico. Allí, se une a los receptores de glutamato de la neurona postsináptica y posteriormente es recaptado por los transportadores del glutamato de la neurona presináptica o de los astrocitos donde la glutamina sintetasa genera glutamina nuevamente a partir del glutamato y amonio.

2.2 Toxicidad del amonio: situaciones clínicas de hiperamonemia

Existen muchas situaciones patológicas asociadas a estados de hiperamonemia. La más frecuente es el fallo hepático crónico (cirrosis

hepática, hepatitis,...). Puede tener diversas causas como el consumo de alcohol, infección por virus (por ejemplo virus de hepatitis B o C), origen autoinmune,... Cualquiera que sea la causa, conduce a una disminución de la eliminación del amonio en el hígado y a hiperamonemia.

En el fallo hepático crónico el principal factor responsable de la hiperamonemia es la deficiente circulación de la sangre a través del hígado, lo que disminuye la metabolización del amonio. La derivación porto-sistémica de la circulación de la sangre que ocurre tras una intervención quirúrgica en un paciente con una enfermedad hepática crónica o bien de manera espontánea en pacientes cirróticos debido a la hipertensión portal, impide la correcta eliminación en el hígado de distintas sustancias tóxicas, como el amonio, que pueden de este modo alcanzar el cerebro y alterar su función.

La hiperamonemia también puede deberse un fallo hepático agudo, menos frecuente que el crónico y que conduce a niveles muy elevados de amonio en sangre y cerebro, debido a la no detoxificación del amonio como consecuencia de la muerte de las células hepáticas.

Otro factor que contribuye a la hiperamonemia en los pacientes con cirrosis hepática es el aumento de la producción de amonio debido al aumento de la glutaminasa intestinal (14).

La hiperamonemia puede ser también debida a errores congénitos de enzimas del ciclo de la urea, por ejemplo en la ornitina transcarbamilasa (que es la más frecuente), la carbamil fosfato sintetasa, la argininasuccinato sintetasa, la argininasuccinasa o la arginasa. También puede producir hiperamonemia la deficiencia en acetilglutamato sintetasa que no forma parte del ciclo de la urea propiamente dicho pero sintetiza acetilglutamato, un activador esencial para la actividad de la carbamil fosfato sintetasa. En estas situaciones los niveles de amonio en sangre pueden llegar a valores

del orden de 1mM y se pueden producir alteraciones neurológicas severas.

Tabla 3: Algunas causas de hiperamonemia*.

- Deficiencias congénitas de enzimas del ciclo de la urea.
- Defectos del transporte de intermediarios en el ciclo de la urea.
- Acidemias orgánicas.
- Otras causas metabólicas: acidosis tubular renal distal, deficiencia primaria en carnitina o defectos en la oxidación de ácidos grasos.
- Shunts portosistémicos.
- Causas urinarias: derivaciones urinarias (ej. ureterosigmoidostomía y conducto ileal) o infecciones del tracto urinario.
- Causas hematológicas: tras trasplante alogénico de células progenitoras de células periféricas, por mieloma múltiple, por leucemia mieloblástica aguda o por leucemia mieloide crónica.
- Drogas:
 - Quimioterapia, por ejemplo el 5-fluoracilo.
 - Valproato sódico.
 - Agentes anestésicos, por ejemplo el halotano.
- Otras: por ejemplo por nutrición parenteral.
- Idiopática.

*Clasificación según Sanz C y cols. (15).

Los niños con errores congénitos del ciclo de la urea parecen normales tras su nacimiento, pero desarrollan rápidamente hiperamonemia. Si ésta no se trata con una terapia adecuada, pueden llegar a morir. Si se tratan adecuadamente pueden sobrevivir, pero la hiperamonemia en el periodo neonatal suele provocar daños en el sistema nervioso central y producir retraso mental, existiendo una correlación inversa entre el coeficiente intelectual y la duración y grado de hiperamonemia neonatal (16).

También se puede presentar hiperamonemia neonatal en niños con asfisia o con parto prematuro (17, 18).

Otras situaciones que cursan con hiperamonemia son el síndrome de Reye, acidemias orgánicas o deficiencias de carnitina. También se puede producir hiperamonemia como consecuencia de

algunos tratamientos terapéuticos como por ejemplo el tratamiento con valproato (antiepiléptico), la hemodiálisis o el tratamiento de algunas leucemias.

Cuando los niveles de amonio en sangre aumentan 4-5 veces sobre los niveles normales producen alteraciones en el funcionamiento del sistema nervioso central y pueden conducir al coma y a la muerte. La alteración de la función cerebral como consecuencia de un fallo previo de la función del hígado se denomina encefalopatía hepática.

3. MODELOS ANIMALES DE ENCEFALOPATÍA HEPÁTICA

Para poder avanzar en el estudio de los mecanismos que causan la encefalopatía hepática y en los posibles tratamientos terapéuticos de la misma se requiere el uso de modelos animales de encefalopatía hepática. Estos modelos reproducen muchas de las alteraciones cognitivas y motoras encontradas en pacientes con encefalopatía hepática.

3.1 Ligadura biliar (bile duct ligation, BDL)

Consiste en obstruir el conducto biliar mediante una o varias ligaduras de modo que se impide totalmente el flujo de bilis al intestino. Esto conduce a la formación de fibrosis hepática que progresa a cirrosis.

Las ratas BDL presentan hiperamonemia (19), ictericia e hipertensión portal (20) fibrosis, translocación bacteriana y disfunción del sistema inmune (21-24). Además, también presentan alteraciones cognitivas y motoras:

- Cognitivas: las ratas con ligadura biliar muestran un deterioro en la capacidad de aprendizaje de una tarea de discriminación condicionada en el laberinto en Y (25), y de aprendizaje espacial en el test del laberinto acuático

de Morris (26). También presentan alteraciones en el test de reconocimiento de objetos (27).

- Motoras: las ratas con ligadura biliar presentan alteraciones en la actividad motora espontánea medida en un actímetro y en la coordinación motora medida con el rotarod (25, 27, 28). La hiperamonemia potencia las alteraciones motoras presentes en las ratas cirróticas por ligadura del conducto biliar (21) sugiriendo que la hiperamonemia contribuye al enlentecimiento motor presente tras el fallo hepático crónico.

3.2 Anastomosis portocava (portacaval shunt, PCS)

Se realiza una cirugía que consiste en seccionar la vena porta, principal aporte sanguíneo al hígado, y suturarla con la vena cava. De esta forma la sangre que proviene del intestino no llega adecuadamente al hígado y la metabolización de sustancias tóxicas por el mismo se reduce notablemente. Entre estas sustancias se encuentra el amonio cuyos niveles aumentan tras la anastomosis porta-cava, produciendo hiperamonemia.

Las ratas con anastomosis portocava (PCS) presentan alteraciones metabólicas como hiperamonemia, aumento de glutamina y amonio en cerebro, y disminución de la utilización de glucosa en cerebro. Además, también presentan alteraciones en ritmos circadianos, así como deterioro cognitivo y motor:

- Cognitivo: las ratas PCS tienen disminuida la capacidad de aprendizaje de una tarea de discriminación condicionada en el laberinto en Y (29, 30) y el aprendizaje espacial evaluado con laberinto acuático de Morris (31, 32).
- Motor: los pacientes con encefalopatía hepática mínima presentan hipoquinesia y enlentecimiento psicomotor

(33). Las ratas PCS también presentan hipoquinesia (34) (30), una menor actividad motora espontánea a partir del día diez desde la operación (30).

3.3 Hiperamonemia crónica sin fallo hepático

Este modelo se desarrolló a finales de los años 80 en nuestro laboratorio (35, 36). Consiste en administrar a las ratas una dieta que contiene acetato amónico (25 % p/p). Esto produce un estado de hiperamonemia crónica moderada en la que los niveles de amonio en sangre son aproximadamente el doble que en las ratas control.

El modelo de hiperamonemia sin fallo hepático reproduce muchas de las alteraciones presentes en la encefalopatía hepática y permite discernir qué alteraciones cerebrales y neurológicas son debidas a la hiperamonemia y cuales son debidas a otros factores asociados al fallo hepático. Este modelo es sencillo y permite mantener hiperamonemia sostenida durante largos periodos de tiempo sin alterar la función hepática. Ha permitido la realización de estudios a largo plazo sobre la regulación del ciclo de la urea (37, 38), toxicidad del amonio (39, 40), alteración de los niveles de tubulina en cerebro (37, 41, 42) y de los niveles de ATP y otros metabolitos en hígado y cerebro (43).

Este modelo se ha empleado también para estudiar el efecto de la hiperamonemia crónica sobre la función de vías de transducción de señales en cerebro in vivo (44), la potenciación a largo plazo o LTP (45) y sobre la capacidad de aprendizaje de una tarea de discriminación condicionada (46).

Entre las principales alteraciones podemos destacar:

- Cognitivas: las ratas hiperamonémicas sin fallo hepático presentan alteraciones en la capacidad de aprendizaje de una tarea de discriminación condicionada en un laberinto en Y (25, 29, 46).

- Motoras: las ratas hiperamonémicas tienen disminuida la actividad motora espontánea medida en el actímetro (19, 47).

Otros modelos de hiperamonemia utilizados en la literatura presentaban algunas desventajas para nuestro trabajo. La infusión de sales de amonio no resulta adecuada para los estudios a largo plazo ya que hubiera exigido mantener a los animales bajo anestesia, con control de la temperatura corporal y de la actividad respiratoria durante largos periodos de tiempo. Por otra parte el método de inducción de hiperamonemia mediante inyección de ureasa requiere dos inyecciones diarias lo que no es práctico para estudios a largo plazo.

4. NEUROTRANSMISIÓN GLUTAMATÉRGICA. PAPEL EN LAS ALTERACIONES ASOCIADAS A ENCEFALOPATÍA HEPÁTICA

Las funciones neurológicas y los procesos cerebrales alterados en la encefalopatía hepática (la memoria, el aprendizaje, la coordinación motora, el sueño, etc.) son el resultado final de alteraciones en la neurotransmisión (48). La hiperamonemia y las enfermedades hepáticas alteran la neurotransmisión glutamatérgica (49).

El glutamato es el principal neurotransmisor excitador en el sistema nervioso central (SNC) en mamíferos y tiene un papel esencial en los procesos de plasticidad sináptica (cambios duraderos en la eficacia sináptica), como la potenciación a largo plazo (LTP) y la depresión a largo plazo (LTD), que se consideran la base molecular de procesos de aprendizaje y memoria.

El glutamato también juega un papel esencial en la modulación de la actividad y coordinación motoras.

Las alteraciones en la neurotransmisión glutamatérgica están implicadas en el daño neuronal observado en una amplia variedad de neuropatologías, como la epilepsia, los accidentes cerebrovasculares, trastornos cognitivos y enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer, el Parkinson, la esclerosis lateral amiotrófica o la corea de Huntington, y otras enfermedades que afectan el SNC como la encefalopatía hepática.

La hiperamonemia, tanto aguda como crónica, afecta a diferentes tipos de receptores de glutamato. Muchos de los efectos sobre los receptores de glutamato y sobre las vías de transducción de señales asociadas son diferentes en hiperamonemia aguda y crónica.

La hiperamonemia aguda induce la activación excesiva de los receptores de NMDA, que es responsable de la muerte en la intoxicación aguda por amonio y que se previene bloqueando los receptores NMDA (50, 51). El bloqueo de los receptores NMDA también previene o retrasa la muerte en el fallo hepático agudo (52).

La hiperamonemia crónica contribuye a muchas alteraciones neurológicas, pero los mecanismos, las áreas cerebrales y los circuitos implicados son diferentes para cada proceso cognitivo o alteración motora específica. La hiperamonemia crónica afecta vías de transducción de señales asociadas a la mayoría de los tipos de receptores de glutamato: receptores NMDA (53), AMPA (54) y a los receptores metabotrópicos (mGluRs) (55).

4.1 Receptores de glutamato

Existen dos grandes grupos de receptores de glutamato: los ionotrópicos y los metabotrópicos. En general los receptores ionotrópicos de glutamato (iGlu) están involucrados en la neurotransmisión rápida en el cerebro. Los receptores iGlu forman un canal catiónico que permite el paso selectivo de iones sodio, potasio o, en el caso de los receptores NMDA y algunos subtipos de

receptores AMPA, calcio, produciendo una despolarización de la neurona.

Los mGluRs no forman canales iónicos, sino que se acoplan a proteínas G y regulan la actividad de enzimas y canales iónicos. De esta forma, los receptores mGlu median la actividad sináptica excitadora lenta, pero prolongada, en el SNC.

4.1.1 Receptores ionotrópicos

Los receptores ionotrópicos son canales iónicos regulados por ligando. La unión del neurotransmisor al receptor provoca la apertura del canal con el consiguiente paso de iones. Se trata de canales catiónicos no selectivos, permeables tanto al sodio como al potasio, de manera que la unión del glutamato provoca una despolarización de la membrana postsináptica (un potencial excitador postsináptico).

Los receptores ionotrópicos de glutamato se clasifican en tres tipos según la afinidad que presentan para unir distintos agonistas: NMDA (N-metil-D-aspartato), AMPA (ácido α -Amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropionico) y kainato (ácido kainico).

El receptor NMDA posee una serie de características distintivas que lo hacen único entre todos los receptores ionotrópicos. Una de estas características, quizá la más significativa, es que su canal permite el paso de los iones calcio, además de sodio y potasio, lo que induce un aumento de la concentración de calcio intracelular en la neurona postsináptica cuando el receptor se activa.

El receptor NMDA es una proteína muy compleja y tremendamente regulada. Su conductancia al calcio es notablemente alta y es ésta quizá su característica más destacable y la responsable de muchas de sus funciones.

Otra característica especial del receptor NMDA es que para que el canal se abra se necesita, además del glutamato, la presencia de un coagonista: la glicina (56-58). El receptor NMDA tiene varios sitios de unión donde se unen distintos tipos de compuestos que modulan su función. Ciertas poliaminas modulan positivamente el canal,

mientras que el zinc o un exceso de protones lo modulan negativamente.

Lo más llamativo de este receptor es que comparte características funcionales de canales regulados por ligando y de canales sensibles al voltaje. En condiciones normales, cuando el potencial de membrana está próximo al valor de reposo, el canal del receptor NMDA está bloqueado por magnesio (57). Este bloqueo es dependiente de voltaje y se elimina cuando la membrana se despolariza, permitiendo el paso de iones calcio, sodio y potasio.

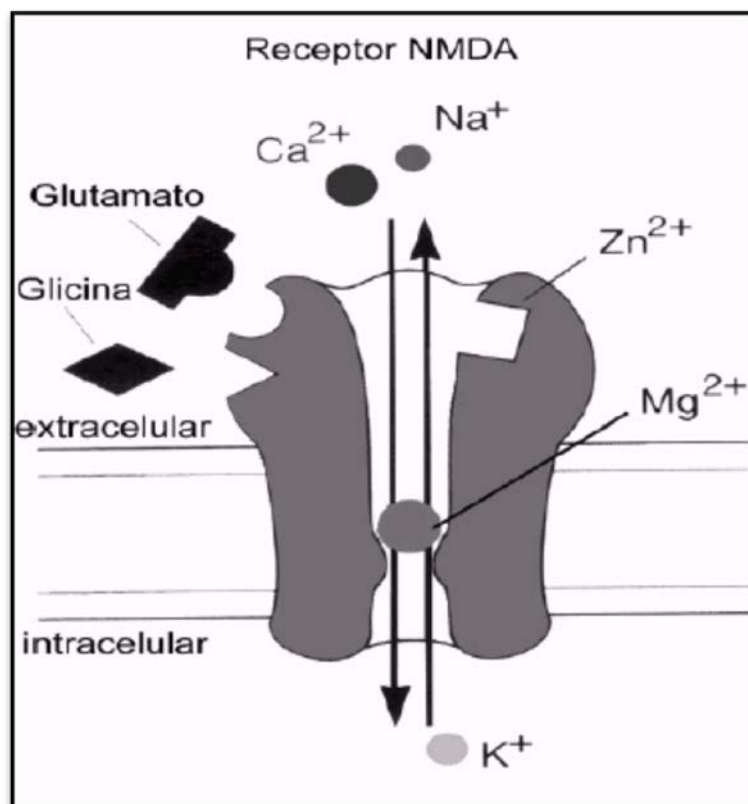


Figura 4: Receptor NMDA.

Los receptores NMDA se localizan en todo el cerebro, siendo más abundantes en cerebelo, hipocampo, ganglios basales y corteza cerebral. En general están formados por diferentes combinaciones de dos tipos de subunidades: NR1 y NR2 aunque también se ha descrito la subunidad NR3.

La subunidad NR1 está presente en todos los receptores NMDA. Tiene 8 variantes de procesamiento alternativo. La subunidad NR2

tiene 4 subtipos denominados NR2A, NR2B, NR2C, NR2D, codificados por cuatro genes diferentes. Existen variantes de procesamiento alternativo de estas subunidades (59, 60). Distintas combinaciones de la subunidad fundamental NR1 con las distintas clases de subunidades NR2 dan lugar a receptores NMDA con propiedades funcionales diferentes, que pueden estar distribuidos en áreas cerebrales específicas y/o pueden producir respuestas fisiológicas o patológicas distintas en respuesta al glutamato. Para la formación de receptores NMDA funcionales es esencial la coexpresión de subunidades NR1 y NR2.

Los receptores NMDA están implicados en numerosas funciones cerebrales, algunas de ellas tan importantes como el aprendizaje o la memoria (60). Sin embargo, su activación patológica, por ejemplo por liberación excesiva de glutamato, produce brotes epilépticos (fenómeno "Kindling") y puede conducir a la degeneración y la muerte neuronal (61), jugando un importante papel en el daño neuronal que se produce en la isquemia cerebral, en algunas enfermedades neurodegenerativas, en la intoxicación aguda por amonio y en el fallo hepático agudo.

La inhibición, bloqueo o hipofuncionalidad del receptor NMDA puede conducir a síntomas psicóticos y se presume que tiene una importante participación en el mecanismo patológico de la esquizofrenia (62).

4.1.2 Receptores metabotrópicos

La familia de mGluR está constituida por ocho subtipos (mGluR 1-8) que se clasifican en tres grandes grupos atendiendo a la homología de su secuencia de aminoácidos, a los mecanismos de transducción de señales asociados y a sus propiedades farmacológicas. Algunos subtipos de mGluR pueden presentar más de una isoforma.

La activación de los receptores mGlu participa en la modulación de la excitabilidad neuronal (63), de la transmisión sináptica (64) o la plasticidad sináptica.

Tabla 4: Clasificación de los receptores metabotrópicos de glutamato.

Grupo	Subtipo	Isoforma	Mecanismo de transducción	Agonistas selectivos
I	mGlu1	a, b, c, d, e	Gq \uparrow PLC \downarrow CCDV \uparrow Ca ⁺² \uparrow L-CCDV	Quis > ABHxD-I > 3,5-DHPG > DHPmP
	mGlu5	a, b	\downarrow K ⁺	>1S, 1R-ACPD
II	mGlu2		Gi/o \downarrow AD \downarrow CCDV	LY379268=LY38979 5 > LY-354740 > L-
	mGlu3		\uparrow K ⁺	F2CCG-I > S- 4MeGlu
III	mGlu4	a, b	Gi/o \downarrow AD	L-AP4 > L-SOP L-
	mGlu6		\downarrow CCDV	CCG-I > 1S, 3S-
	mGlu1	a, b	\uparrow K ⁺	ACPD > 1S, 3R-
	mGlu8	a, b		ACPD

Gq: tipo de proteína G activadora; Gi/o: tipo de proteína G inhibidora; PLC: fosfolipasa C; CCDV: canales de calcio dependientes del voltaje; L-CCDV: canales de calcio dependiente de voltaje de tipo L; AD: adenilato ciclasa; Quis: ácido quisqualico; ABHxD-I: ácido (1S,2S,4S,5S)-2-Aminobiciclo[2.1.1]hexeno-2,5-dicarboxilico; 3-5-DHPG: 3- dihydro-fenilglicina; DHPmP: ácido (RS)-amino(3,5-dihydroxifenil)metilfosfinico; LY379268: ácido (-)-2-oxa-4-aminobiciclo- hexan-4,6-dicarboxilico; LY389795: ácido (-)-2-tio-4-aminobiciclo[3.1.0]-hexan-4,6-dicarboxilico; LY354740: ácido (+)-2-aminobiciclo[3.1.0]hexan-2,6dicarboxilico; L-F2CCG-I: 2S,1'S,2'S)-2-(2-carboxy-3,3-difluorociclopropil)glicina; S-4MeGlu: ácido S-4 metil-glutamico; L-AP4: ácido L(+)-2-Amino-4-fosfonobutirrico; L-SOP: L-serina-O-fosfato; L-CCG-I: 2S,1'S,2'S)-2-(Carboxiciclopropil)glicina; ACPD: ácido 1-aminociclopentan-1,3-dicarboxilico.

4.2 Alteraciones de la neurotransmisión glutamatérgica en encefalopatía hepática

4.2.1 Vía glutamato-óxido nítrico-GMP cíclico

Existen diversas alteraciones a nivel de la neurotransmisión glutamatérgica durante la encefalopatía hepática pero nos vamos a

centrar en las que se dan en la vía glutamato-óxido nítrico-GMPc (Glu-NO-GMPc, Figura 5). La activación del receptor NMDA produce un aumento del calcio intracelular en la neurona postsináptica. Este aumento de calcio modula la actividad de diversas enzimas y conduce a la activación de diferentes vías de señalización intracelular.

El calcio se une a la calmodulina formando un complejo calcio/calmodulina que modula la actividad de una serie de proteínas, entre ellas la óxido nítrico sintasa neuronal (nNOS) que sintetiza óxido nítrico (NO) a partir de arginina (65, 66). Una parte del NO sintetizado se transforma en nitratos y nitritos que son metabolitos estables del NO.

El NO, entre otros efectos, activa la guanilato ciclasa soluble (sGC) cuando se une a su grupo hemo. Dado que el NO es un gas, puede difundir de la célula en la que se ha formado a células vecinas y activar en ellas la sGC.

La sGC es un heterodímero constituido por una subunidad α y otra β (67), ambas necesarias para la actividad del enzima (68), que cataliza la conversión de GTP a GMP cíclico (GMPc) que actúa como segundo mensajero intracelular.

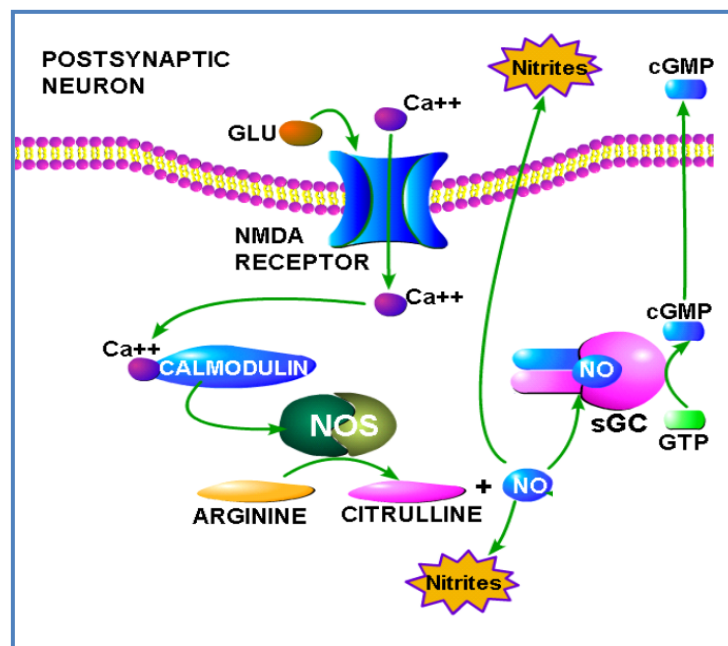


Figura 5: Esquema de la vía Glu-NO-GMPc (ver descripción en el texto).

Parte de los nitritos y del GMPc formados cuando se activa la vía Glu-NO-GMPc se liberan al medio extracelular. En condiciones adecuadas, la concentración de GMPc extracelular es una buena medida del grado de activación de la vía Glu-NO-GMPc en cerebro *in vivo*. Así mismo, la determinación de nitritos en el medio extracelular nos permite medir de forma indirecta la activación de la NOS.

El GMPc actúa como segundo mensajero modulando canales iónicos, fosfodiesterasas y proteín-quinasas dependientes de GMPc. Esta vía Glu-NO-GMPc modula importantes procesos cerebrales como la comunicación intercelular, la liberación de algunos neurotransmisores en algunas áreas cerebrales, los ritmos circadianos, la potenciación a largo plazo y algunas formas de memoria y aprendizaje.

4.2.2 Alteraciones de la vía glutamato-óxido nítrico-GMP cíclico en encefalopatía hepática

Algunos de los procesos en los que interviene esta vía están alterados en los pacientes con encefalopatía hepática.

Se ha demostrado mediante estudios de microdiálisis cerebral *in vivo* que la función de la vía Glu-NO-GMPc está disminuida en cerebelo de ratas con encefalopatía hepática crónica debida a anastomosis porta-cava (69). La administración de NMDA a través de la sonda de microdiálisis activa el receptor y la vía Glu-NO-GMPc y produce un aumento del GMPc extracelular *in vivo* (Figura 5). El aumento de GMPc inducido por NMDA es significativamente menor en el cerebelo de ratas con encefalopatía hepática que en ratas control indicando que la función de la vía está disminuida en cerebelo *in vivo* en estas ratas con encefalopatía hepática (49).

La función de esta vía también está disminuida *in vivo* en cerebelo de ratas con hiperamonemia crónica moderada sin fallo hepático (44), indicando que la hiperamonemia es la responsable de la disminución de la función de la vía y de la menor formación de GMPc en encefalopatía hepática crónica.

La alteración de la función de la vía Glu-NO-GMPc y la menor formación de GMPc es responsable de algunas de las alteraciones cognitivas en modelos animales y podría serlo en pacientes con encefalopatía hepática. Los tratamientos farmacológicos que aumentan el GMPc en el cerebro restauran la capacidad de aprendizaje de ratas con encefalopatía hepática o con hiperamonemia (70). Esto indica que la disminución de la formación de GMPc en respuesta a la activación de los receptores NMDA está implicada en las alteraciones cognitivas de la encefalopatía hepática.

Recientemente, se ha descrito que la modulación de la vía Glu-NO-cGMP por los receptores metabotrópicos del glutamato y por los receptores AMPA también está alterada en la encefalopatía hepática (54).

Nuestro grupo está estudiando los mecanismos por los que la hiperamonemia y fallo hepático alteran la función de dicha vía. Hermenegildo y cols. (44) administraron a través de la sonda de microdiálisis un agente generador de óxido nítrico (SNAP) que activa directamente la GCs. El aumento de GMPc inducido por SNAP fue también significativamente menor en cerebelo de ratas hiperamonémicas que en ratas control indicando que la menor activación de la GCs por óxido nítrico contribuye a la menor función de la vía en cerebelo *in vivo*.

La modulación de la GCs soluble por óxido nítrico está también alterada en cerebro de pacientes fallecidos con encefalopatía hepática (71). La activación de la GCs por óxido nítrico *in vitro* está disminuida en homogenados de cerebelo de pacientes comparada con la de los controles (71).

Estudios realizados por nuestro grupo muestran que la activación de la NOS está también disminuida en cerebelo *in vivo* en ratas con hiperamonemia crónica o con anastomosis porta-cava. La administración de NMDA a través de la sonda de microdiálisis activa la NOS neuronal (nNOS) produciendo un aumento de NO y de sus

metabolitos estables, los nitritos. Parte de estos nitritos se liberan al medio extracelular y se pueden recoger y medir por microdiálisis. El aumento de nitritos inducido por NMDA es significativamente menor en las ratas hiperamonémicas y en las ratas con encefalopatía hepática debida a anastomosis porta-cava que en las ratas control (72). Esto indica que la activación de la nNOS inducida por la activación del receptor NMDA está disminuida en cerebelo *in vivo* en hiperamonemia y encefalopatía hepática crónicas resultando en una menor función de la vía Glu-NO-GMPc.

Tratamientos que restauran la función de la vía Glu-NO-cGMP recuperan la capacidad de aprendizaje (ver página siguiente). Debido a todo ello podemos concluir que la disminución en la función de la vía Glu-NO-GMPc es responsable del deterioro de algunos tipos de aprendizaje en hiperamonemia crónica y encefalopatía hepática. Así pues, podemos concluir que:

- la vía Glu-NO-GMPc modula algunas formas de aprendizaje, incluyendo una tarea de discriminación condicionada en un laberinto Y.
- la función de la vía Glu-NO-GMPc está disminuida *in vivo* en el cerebelo de modelos animales de hiperamonemia o encefalopatía hepática.
- el deterioro de la función de la vía Glu-NO-GMPc y la disminución de la concentración de GMPc extracelular en cerebelo es responsable del deterioro de algunos tipos de aprendizaje en hiperamonemia y encefalopatía hepática.
- la modulación farmacológica de los niveles de GMPc puede restaurar la capacidad de aprendizaje en hiperamonemia y encefalopatía hepática.

En nuestro grupo hemos ensayado varios procedimientos para restaurar la función de la vía Glu-NO-GMPc y/o los niveles de GMPc extracelular en el cerebelo y evaluado si al restablecerlos se recupera

también la capacidad de aprendizaje. Los resultados obtenidos mostraron que:

- la inhibición de la degradación de GMPc mediante la administración de inhibidores de la fosfodiesterasa-5 (zaprinast o sildenafil) restablece la función de la vía, el nivel extracelular GMPc y la capacidad de aprendizaje en ratas con encefalopatía hepática debida a anastomosis portocava y en ratas con hiperamonemia crónica (29, 70).
- la administración directa intracerebral de GMPc restaura la capacidad de aprendizaje en ratas hiperamonémica (29).
- la neuroinflamación contribuye al deterioro de la función de la vía Glu-NO-GMPc. La administración de un antiinflamatorio (ibuprofeno) restablece la función de la vía y la capacidad de aprendizaje de las ratas con encefalopatía hepática debido a derivación portocava (73), con ligadura biliar o con hiperamonemia crónica (25).
- un aumento del tono GABAérgico en el cerebelo también contribuye al deterioro de la función de la vía. La administración crónica de un antagonista de los receptores GABA_A (bicuculina) restaura la función de la vía y la capacidad de aprendizaje en ratas con hiperamonemia crónica (74).

5. NEUROTRANSMISIÓN GABAÉRGICA. PAPEL EN LAS ALTERACIONES ASOCIADAS A LA ENCEFALOPATÍA HEPÁTICA

GABA es la abreviatura de ácido γ -aminobutírico. Es un aminoácido no esencial que actúa como el principal neurotransmisor

inhibidor del cerebro estando presente en alrededor del 30% de las células. La síntesis de GABA ocurre en las neuronas. El GABA es formado por descarboxilación irreversible de L-glutamato, catalizada por la glutamato descarboxilasa (GAD), enzima que determina la velocidad de síntesis del GABA. Existen dos isoformas de esta enzima (GAD65 y GAD67), que son codificadas por dos genes diferentes: ambas son expresadas en las neuronas GABAérgicas (75).

El GABA es almacenado en vesículas y liberado a la hendidura sináptica mediante exocitosis. Tras su liberación, es retomado por la terminal presináptica mediante un transportador e incorporado de nuevo en vesículas para su uso posterior (76). Otra parte del GABA es captado por los astrocitos para convertirlo en glutamato por la GABA-transaminasa. El glutamato es convertido en glutamina mediante la glutamina sintetasa. La glutamina generada es liberada al medio extracelular y captada por la neurona donde es hidrolizada por la glutaminasa para producir glutamato que puede ser liberado o descarboxilado para formar GABA y cerrar el ciclo GABA-glutamato-glutamina (Figura 3).

5.1 Receptores GABA

Existen tres tipos de receptores GABA: A, B y C. Los receptores GABA_B median los potenciales postsinápticos inhibitorios lentos. Están acoplados a proteínas G que median la mayoría de sus acciones fisiológicas por la modulación de la adenilato ciclasa o de canales de calcio y potasio.

Los receptores GABA_A y GABA_C son ionotrópicos y forman un canal iónico selectivo de cloro. Los receptores GABA_C median respuestas lentas y sostenidas. Farmacológicamente, los receptores GABA_C son insensibles a la bicuculina y al baclofeno, y no son modulados por muchos moduladores del receptor de GABA_A (como las benzodiazepinas y barbitúricos). La composición de subunidades exacta de estos receptores está todavía por determinar, aunque se

sabe que abundan las subunidades ρ . Su expresión en cerebro es muy amplia, con distribuciones prominentes en las neuronas de la retina, lo que sugiere que estos receptores juegan un papel importante en el procesamiento de la señal retiniana (77).

La mayoría de los efectos inhibitorios rápidos del GABA son mediados por el receptor $GABA_A$, una proteína transmembrana multimérica que consta de cinco subunidades dispuestas alrededor de un poro central. Cada subunidad está compuesta por cuatro dominios transmembrana que mantienen los extremos N- y C- terminal localizados extracelularmente (78).

El receptor se expresa en la membrana de las neuronas, generalmente a nivel postsináptico, sin embargo, algunas isoformas se pueden encontrar extrasinápticamente (79).

Cuando el GABA se une al receptor, induce cambios en su conformación que permiten el paso de aniones cloruro los cuales hiperpolarizan la membrana de la neurona postsináptica. Esto hace más difícil para los neurotransmisores excitadores despolarizar la neurona y generar un nuevo potencial de acción. El efecto neto es típicamente inhibitorio, reduciendo la actividad de la neurona.

5.1.1 Subunidades del receptor $GABA_A$

Existen diversas isoformas de las subunidades del receptor de $GABA_A$ que determinan la afinidad del agonista por el receptor, la probabilidad de apertura, la conductancia, y otras propiedades (80).

En los seres humanos podemos diferenciar:

- seis tipos de subunidades α ($GABRA1$, $GABRA2$, $GABRA3$, $GABRA4$, $GABRA5$, $GABRA6$)
- tres tipos de subunidades β ($GABRB1$, $GABRB2$, $GABRB3$)
- tres tipos de subunidades γ ($GABRG1$, $GABRG2$, $GABRG3$)
- una subunidad δ ($GABRD$)
- una subunidad ϵ ($GABRE$)
- una subunidad π ($GABRP$)
- una subunidad θ ($GABRQ$)

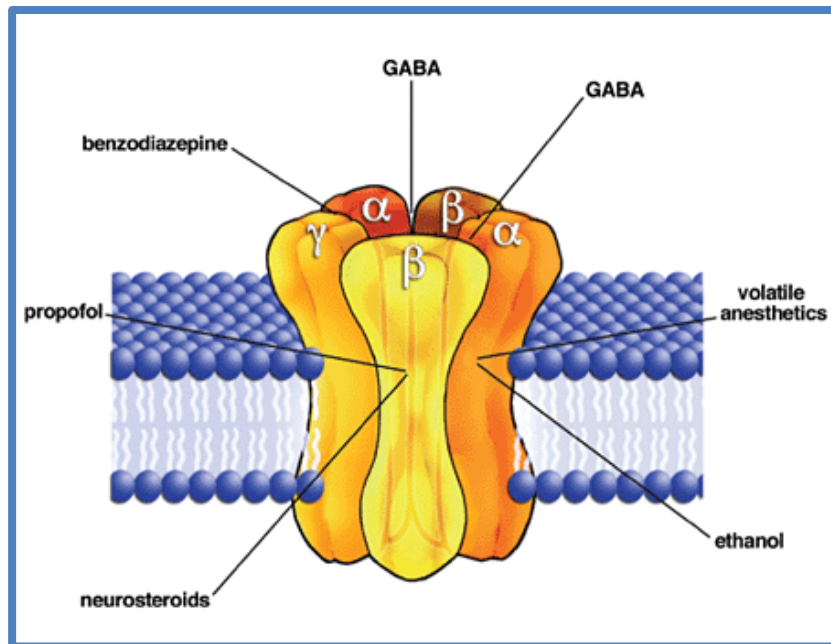


Figura 6: Esquema de un receptor GABA_A con algunos de sus sitios de unión a diversos ligandos endógenos y externos.

El receptor GABA_A es un pentámero que puede formarse por diferentes combinaciones de subunidades. El requisito mínimo para producir un canal iónico GABA_A es la inclusión de subunidades tanto α como β (81). El tipo más común en cerebro es un pentámero compuesto por dos α , dos β , y una γ ($\alpha_2\beta_2\gamma$) (81).

Al receptor se unen dos moléculas de GABA, en la interfaz entre una subunidad α y una subunidad β (82).

5.2 Neurotransmisión GABAérgica en cerebelo

El cerebelo se sitúa en la fosa craneal posterior, dorsal al tronco del encéfalo e inferior al lóbulo occipital. Presenta una porción central llamada vérmis desde donde se extienden hacia ambos lados los hemisferios cerebelosos. El cerebelo contiene cerca del 50% de todas las neuronas del encéfalo, pero sólo representa el 10% de su volumen. El cerebelo recibe cerca de 200 millones de fibras aferentes.

Se trata de una estructura del sistema nervioso presente únicamente en vertebrados que participa en el equilibrio, la orientación, la coordinación motora, la memoria y el aprendizaje.

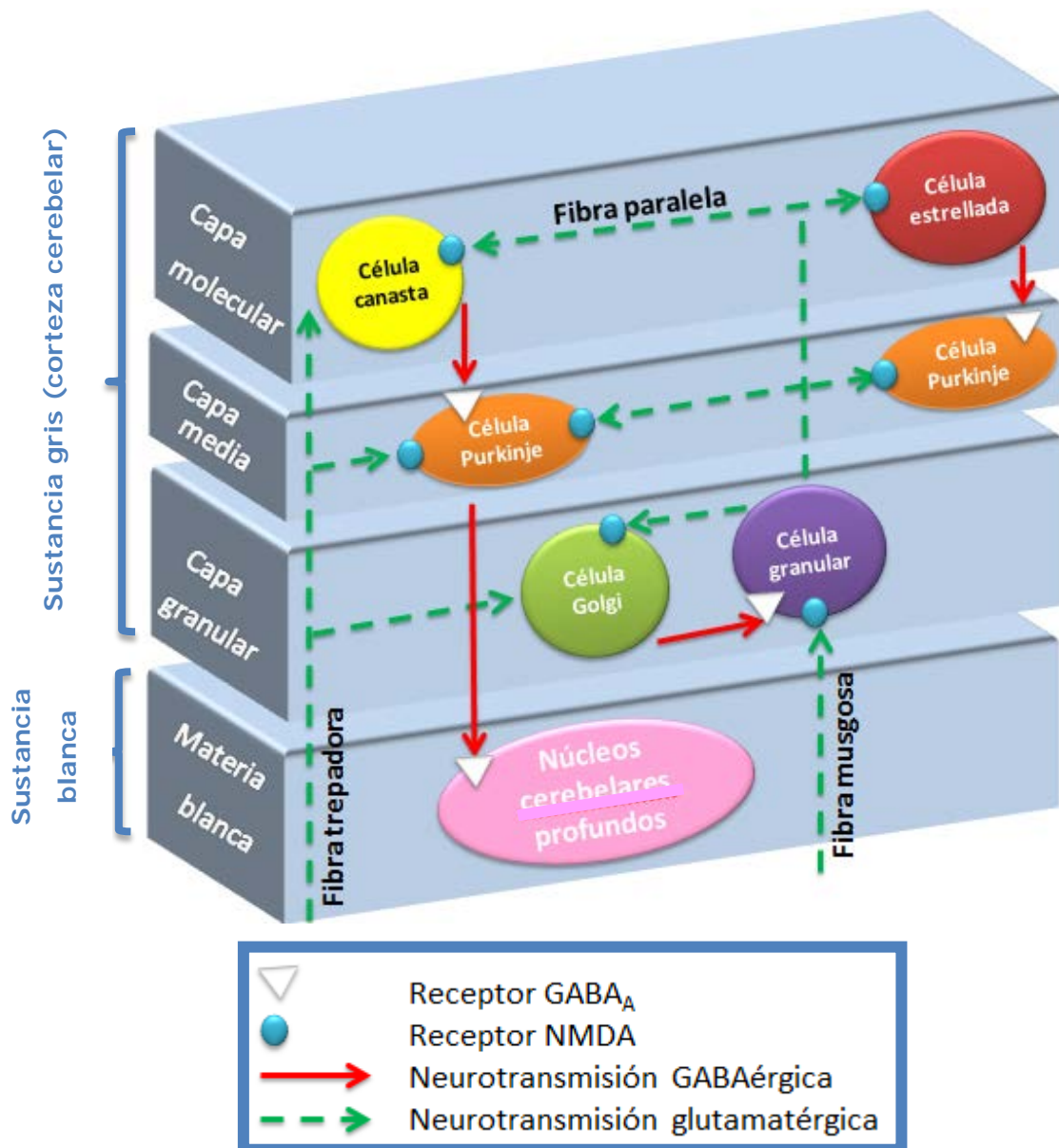


Figura 7: Esquema de la neurotransmisión en el cerebelo y los tipos de neurotransmisor empleados. Existe una gran inervación GABAérgica sobre las células de Purkinje originada desde las células de la canasta, las estrelladas y las de Golgi (83). Estos tres grupos de interneuronas reciben, a su vez, estímulos inhibitorios GABAérgicos por parte de las células de Purkinje, constituyendo un sistema de *feed-back* (84). Además de los *inputs* GABAérgicos, las células de Purkinje reciben también inervación glutamatérgica de las fibras paralelas, originada en las células granulares. Las células granulares reciben un único *input* GABAérgico a través de las interneuronas de Golgi, mientras que el glutamatérgico deriva de las fibras musgosas.

El cerebelo puede dividirse en sustancia gris y sustancia blanca. La sustancia blanca está compuesta por fibras nerviosas mielinizadas, mientras que la sustancia gris está compuesta por somas neuronales y dendritas carentes de mielina junto con células gliales, y se la relaciona más con el procesamiento de la información.

En el cerebelo la sustancia gris se dispone en la superficie, donde forma la corteza cerebelosa, mientras que la sustancia blanca se localiza en la parte interna, envolviendo por completo a los núcleos cerebelares profundos.

Tabla 5: Resumen de los neurotransmisores que reciben y liberan los diferentes tipos celulares del cerebelo.

	Recibe		Libera	
	GABA	Glutamato	GABA	Glutamato
Célula canasta		X	X	
Célula estrellada		X	X	
Célula de Purkinje		X	X	
Célula granular	X	X		X
Núcleos cerebelares	X			X

La corteza cerebelar está formada por tres capas: capa granular, capa media o de las células de Purkinje y capa molecular o plexiforme (Figura 7). La capa granular es la capa más profunda de la corteza cerebelar y limita en su zona interna con la sustancia blanca. Debe su nombre a que en ella predominan un tipo de pequeñas neuronas intrínsecas denominadas células granulares del cerebelo, cuyo principal neurotransmisor que liberan es el glutamato. En esta capa también podemos encontrar un tipo de interneuronas, denominadas neuronas de Golgi, que liberan GABA como neurotransmisor mayoritario (Tabla 5). La capa de las células de Purkinje, que libera GABA como principal neurotransmisor, está constituida por los somas de dichas células que se disponen formando una lámina monocelular. Por último la capa molecular que es donde tienen lugar la mayoría de las sinapsis. Recibe su nombre porque

contiene principalmente prolongaciones celulares y pocos somas neuronales principalmente de células estrelladas y de canasta, interneuronas que también liberan GABA como principal neurotransmisor.

La sustancia blanca del cerebelo está constituida por axones junto con astrocitos fibrosos y abundantes oligodendrocitos productores de la envoltura miélica. En el interior de la sustancia blanca podemos encontrar cuatro pares de núcleos de sustancia gris denominados núcleos cerebelares profundos: el núcleo del fastigio, el globoso, el emboliforme y el dentado. El emboliforme y el globoso están muy relacionados funcionalmente y en conjunto forman el núcleo interpuesto (Figura 8).

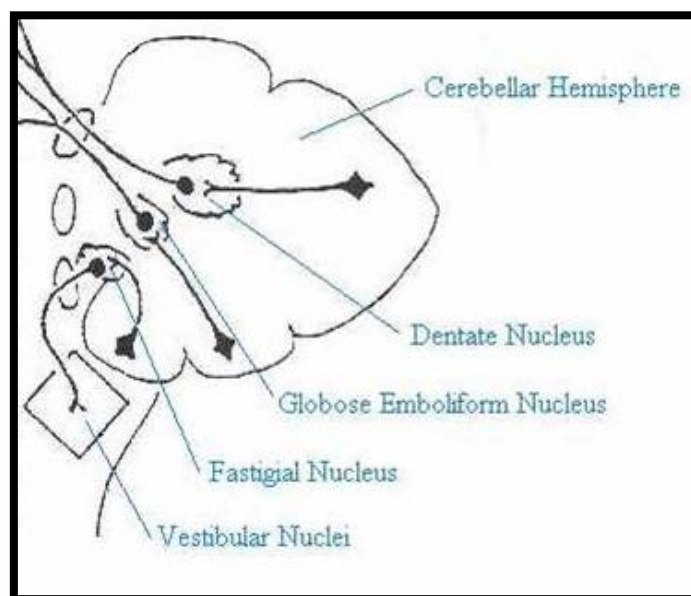


Figura 8: Esquema anatómico de los núcleos cerebelares profundos.

Los axones de la sustancia blanca son tanto fibras eferentes y aferentes como fibras intrínsecas que conectan diferentes áreas corticales entre sí (Figura 9). Las fibras aferentes de la corteza corresponden a axones de las células de Purkinje mientras que las de los núcleos profundos corresponden a axones de las neuronas de proyección de dichos núcleos. Las aferencias corresponden a fibras musgosas, trepadoras y las que provienen de los sistemas noradrenérgico y serotoninérgico. Las fibras musgosas son gruesas

fibras mielínicas que proceden de numerosas áreas del sistema nervioso como son el ganglio y núcleos vestibulares, la médula espinal, la formación reticular y los núcleos del puente (Figura 9). Entran principalmente por los pedúnculos cerebelosos medio y superior desde donde parten hacia los núcleos cerebelosos profundos, distribuyéndose a continuación por toda la corteza cerebelosa. Las fibras musgosas al llegar a la capa granular se dividen en varias ramas denominadas rosetas que hacen sinapsis con las células granulares y los axones de las células de Golgi, formando los denominados glomérulos cerebelosos. Además hacen sinapsis con el soma de las células de Golgi.

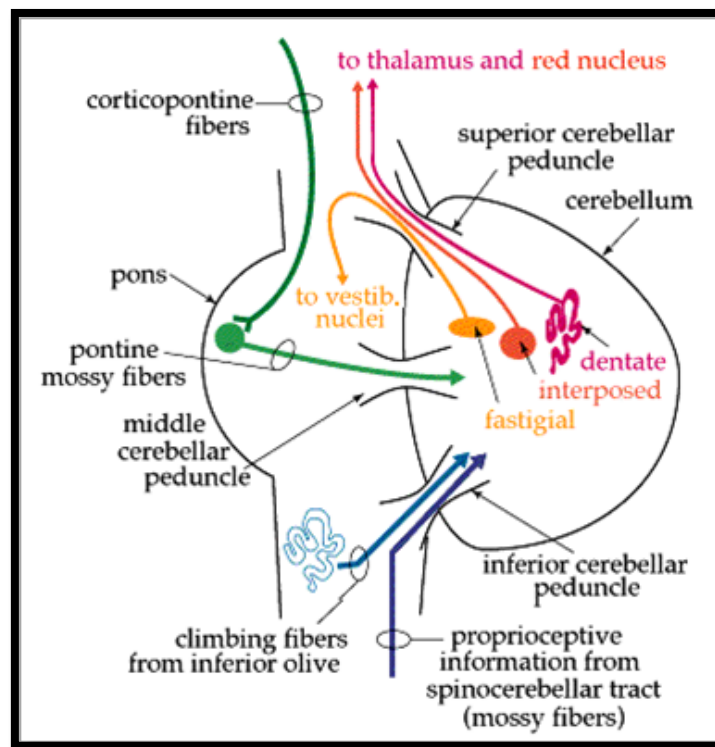


Figura 9: Esquema de las principales aferencias y eferencias del cerebelo.

Las fibras trepadoras son los axones de las neuronas de proyección del núcleo de la oliva inferior desde donde penetran en el cerebelo por el pedúnculo inferior (Figura 9). Una única neurona del núcleo olivar inferior da origen a unas diez fibras trepadoras. Al llegar al cerebelo, estas fibras se dividen hacia los núcleos profundos y luego se distribuyen por toda la corteza cerebelosa donde pierden la

mielina, atraviesan la capa granular y alcanzan la capa de células de Purkinje liberando glutamato. Cada fibra se ramifica abarcando de cinco a diez células de Purkinje.

El principal output de la corteza cerebelar es proporcionado por las células de Purkinje que reciben la información a través de las fibras trepadoras que parten de la oliva inferior, y de las fibras paralelas que surgen de las células granulares (Figura 7). Estas células granulares, a su vez, reciben entradas de las fibras musgosas que provienen de muchas partes del tronco cerebral y la médula espinal. Cada célula de Purkinje recibe la entrada de una sola fibra trepadora y de varias fibras paralelas. La activación de la fibra trepadora va a producir una disminución en la expresión de receptores GABA_A por parte de las células de Purkinje. Hay también interneuronas inhibitoras (células estrelladas y de la canasta) que influyen en los "outputs" de las células de Purkinje. Por ejemplo, Galante y cols. (85) demostraron que la activación del tipo I de receptores metabotrópicos de glutamato (ver punto 4.1.1) produce una disminución de la transmisión GABAérgica en las sinapsis entre las interneuronas y las células de Purkinje, indicando un mecanismo por el cual las sinapsis glutamatérgicas inhiben las entradas GABAérgicas a las células de Purkinje.

5.2.1 Distribución de subunidades del receptor GABA_A en cerebelo

Aunque la neurotransmisión GABAérgica está presente en todo el cerebro, destaca su importancia en el cerebelo. La composición de subunidades de los receptores GABA_A en el cerebelo difiere en función del tipo celular.

La Tabla 6 (86) muestra la distribución de las diversas subunidades del receptor GABA_A, tanto sinápticas como extrasinápticas, en el cerebelo de rata.

Tabla 6: Distribución de subunidades del receptor GABA_A detectadas por inmunohistoquímica en cerebelo de rata.

	Capa molecular	Capa media	Capa granular	Núcleos cerebelares profundos
α_1	X		X	X
α_2	X		X	X
α_3			X	
α_4			X	X
α_5	X	X	X	X
α_6			X	
δ			X	X
β_1	X	X	X	X
β_2	X		X	X
β_3			X	
γ_1		X	X	X
γ_2	X		X	X
γ_3	X	X		X

Existen diferencias en la expresión de subunidades del receptor GABA_A en función del tipo celular. La combinación de subunidades $\alpha_1\beta_2\beta_3\gamma_2$ es muy abundante en la capa molecular, predominando en las dendritas de las células de Purkinje y, algo menos, en las células estrelladas y de la canasta (87). Por otro lado, en las células granulares (Figura 10) abundan las subunidades α_1 , α_6 , β_2 , β_3 , γ_2 y δ , (84) lo que sugiere que en este tipo de células hay, al menos, dos combinaciones de subunidades diferentes (ver más adelante la incompatibilidad entre subunidades γ_2 y δ). La presencia en este tipo celular de la subunidad α_6 confiere características farmacológicas particulares, como por ejemplo, una baja sensibilidad a las benzodiazepinas (84).

$\alpha_1\text{-}\alpha_6\text{-}\beta_2\text{-}\beta_3\text{-}\gamma_2\text{-}\delta$	$\alpha_1\alpha_6\beta_2/\beta_3\gamma_2$
$\alpha_1\beta_2/\beta_3\gamma_2$	$\alpha_1\alpha_6\beta_2/\beta_3\gamma_2\delta$
$\alpha_6\beta_2/\beta_3\gamma_2$	$\alpha_6\beta_2/\beta_3\delta$

Figura 10: Posibles combinaciones de las subunidades del receptor GABA_A encontradas en células granulares de roedores, ordenadas de mayor a menor frecuencia (Wisden W, 1996).

En las neuronas presentes en los núcleos cerebelares profundos, abundan las subunidades α_1 , β_2 , y γ_2 , (Figura 11)

expresándose también, pero en menor cantidad, la subunidad α_3 (88).

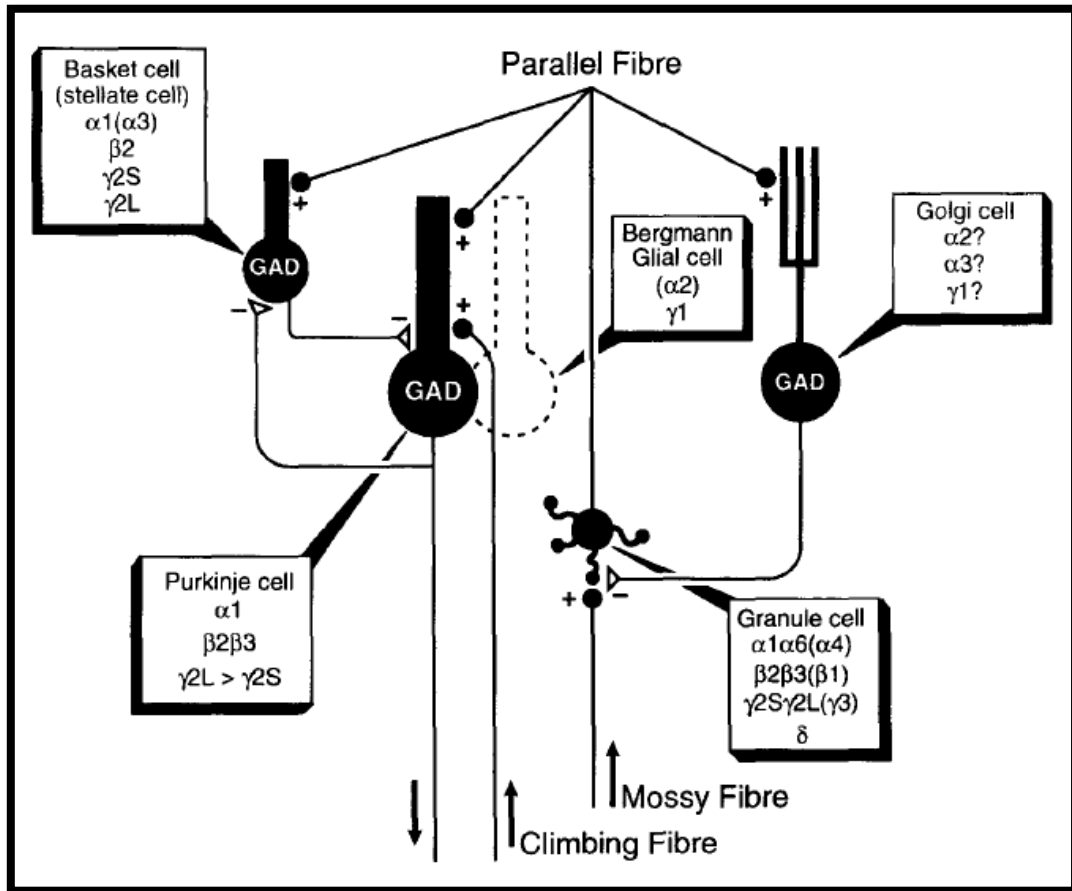


Figura 11: Resumen de las subunidades del receptor $GABA_A$ expresadas en cada tipo celular del cerebelo (84). Las células que liberan GABA están representadas con GAD (glutamato descarboxilasa) en su interior. Las terminales excitadoras están representados por círculos marcados +, mientras que las terminales inhibitorias son triángulos blancos marcados -. Las subunidades entre paréntesis están expresadas mucho más débilmente.

5.3 Alteraciones de la neurotransmisión GABAérgica en encefalopatía hepática.

En 1982 Schafer y Jones (89) propusieron que la encefalopatía hepática es consecuencia de un aumento del tono GABAérgico en cerebro. En un modelo de fallo hepático agudo por inyección de galactosamina en conejos encontraron potenciales evocados visuales similares a los inducidos por barbitúricos y benzodiazepinas, sugiriendo que la actividad neuronal en coma hepático es similar a la

inducida por activación de receptores GABA. Propusieron la hipótesis de que un aumento del tono GABAérgico sería la causa de la encefalopatía hepática. Sin embargo, otros autores creen que estos cambios no pueden ser atribuidos a la alteración de la neurotransmisión GABAérgica (90). Por otra parte, estos estudios fueron realizados en un modelo de encefalopatía hepática aguda y, por tanto, no proporcionan información sobre las posibles alteraciones en el tono GABAérgico en encefalopatía hepática crónica.

Jones y colaboradores fueron proponiendo diferentes mecanismos para explicar este posible aumento del tono GABAérgico en encefalopatía hepática:

- un aumento de la concentración de GABA en cerebro.
- un aumento de la cantidad de receptores GABA_A.
- una mayor concentración de compuestos endógenos similares a las benzodiazepinas que causen un aumento de la activación de receptores GABA_A.

El GABA extracelular no se altera en la mayoría de las regiones cerebrales en encefalopatía hepática. Existe mucha variabilidad en los resultados de los estudios sobre la cantidad de receptores de GABA (91, 92) y sobre el papel de compuestos endógenos moduladores de receptores GABA_A similares a las benzodiazepinas en la encefalopatía hepática (91, 93).

Algunos datos sugerían que podría haber alteraciones en el tono GABAérgico en encefalopatía hepática. El amonio puede potenciar directamente la activación de los receptores GABA_A por sus ligandos. En neuronas corticales, el amonio potencia las corrientes de cloruro inducidas por la activación de receptores GABA_A (94). Bajas concentraciones de amonio pueden aumentar la unión de los agonistas de los receptores GABA en cerebro de ratas (95). La hiperamonemia podría por tanto contribuir a un posible aumento del tono GABAérgico en la encefalopatía hepática. Un aumento del tono

GABAérgico significa una mayor activación de los receptores GABA_A y de los procesos asociados.

También se ha postulado un aumento de la concentración de neuroesteroides que causaría una mayor activación de los receptores GABA_A. Nuestro grupo demostró en 2009 (74) que la hiperamonemia crónica moderada aumenta el tono GABAérgico en cerebelo *in vivo* y lo disminuye en la corteza cerebelar. A este aumento del tono GABAérgico en cerebelo podrían contribuir un aumento de la concentración de GABA extracelular y de las concentraciones de THDOC (tetrahydrodeoxicorticosterona), pregnenolona y pregnanolona en cerebelo de ratas hiperamonémicas.

5.3.1 Modulación de la vía glutamato-óxido nítrico-GMP cíclico por el receptor GABA_A

Un proceso modulado por los receptores GABA es la función de la vía Glu-NO-GMPc. La activación de los receptores GABA_A reduce la función de esta vía en cerebelo (96) y en la corteza cerebral (97). Así pues, un aumento del tono GABAérgico daría lugar a reducción de la función de esta vía.

La función de esta vía y de los niveles de GMPc extracelular están reducidos en el cerebelo de ratas hiperamonémicas (44), lo que podría deberse a un aumento en el tono GABAérgico. Si esto es así, el bloqueo de los receptores GABA_A debería eliminar los efectos del aumento del tono GABAérgico y, por tanto, aumentar de la función de la vía y del GMPc extracelular.

Nuestro grupo demostró que el tono GABAérgico *in vivo* está aumentado en cerebelo y disminuido en corteza de ratas con hiperamonemia crónica (74). La administración de bicuculina por la sonda de microdiálisis reduce el tono GABAérgico en cerebelo, restaura la función de la vía glu-NO-cGMP y normaliza los niveles extracelulares de GMPc. La administración crónica intraperitoneal de bicuculina también restaura la función de la vía y la capacidad de aprendizaje en ratas hiperamonémica, apoyando la idea de que el

aumento del tono GABAérgico en el cerebelo contribuye al deterioro de la vía Glu-NO-cGMP y de la función cognitiva en hiperamonemia y encefalopatía hepática (74).

5.4 Tono GABAérgico y coordinación motora

La función de la neurotransmisión GABAérgica en el comportamiento y funciones neurológicas en general y en el aprendizaje en particular, aún está lejos de ser bien conocida. Parece claro que existe una relación entre los niveles de GABA y el tono GABAérgico en cerebelo y la coordinación motora, aunque los mecanismos implicados no se conocen en detalle.

Grimm y cols. (98) aumentaron la concentración de GABA en cerebro mediante la inyección de dos fármacos (ácido amino-oxiacético y di-n-propilacetato) que previenen su degradación. Observaron que el aumento de los niveles de GABA se asociaba con un deterioro en la ejecución de tareas aprendidas que implicaban coordinación motora, especialmente en aquéllas donde el equilibrio y la coordinación de las extremidades traseras eran necesarios.

Por otro lado, Saed y cols. (99) demostraron que los receptores GABA_A juegan un papel esencial en la ataxia cerebelar inducida por etanol. Observaron también que la administración de muscimol (agonista GABA_A) produce un aumento dosis-dependiente de la ataxia que puede evitarse por la administración previa de bicuculina (antagonista GABA_A).

Hanchar HJ y cols. (100) comprobaron que el deterioro en la coordinación motora tras la ingesta de alcohol se debe al aumento de la inhibición tónica por un subtipo de receptor GABA_A extrasináptico ($\alpha 6\beta 3\delta$) expresado únicamente en las células granulares del cerebelo.

En nuestro grupo también se ha demostrado una correlación entre los niveles de GABA extracelular y la coordinación motora. Se expusieron ratas gestantes a diferentes contaminantes y, posteriormente, se evaluó la coordinación motora de las crías. El

grupo que recibió PCB52 manifestó una mayor incoordinación motora que el resto de grupos. Se comprobó que este grupo tenía una mayor concentración de GABA extracelular en cerebelo y que existe una correlación inversamente proporcional entre los niveles extracelulares de GABA y la coordinación motora en estas ratas (101).

Los resultados de estos estudios indican que un aumento del tono GABAérgico en cerebelo reduce la coordinación motora.

6. RECEPTORES SIGMA

Los receptores sigma se descubrieron por Martin y cols. en 1976 (102) y se clasificaron inicialmente como un subtipo de receptores opioides. Más tarde, la disponibilidad de ligandos nuevos y más selectivos, permitió comprobar que los receptores sigma son una familia de receptores independientes con una especificidad bastante baja, de modo que fármacos de diversas familias químicas pueden unirse a ellos (103). Estos receptores presentan amplia distribución anatómica y variedad de efectos conductuales y fisiológicos vinculados a su activación o alteración (104).

La función de los receptores sigma es poco conocida (104). El papel exacto de los receptores sigma es difícil de establecer ya que muchos agonistas sigma también se unen a otras dianas tales como el receptor κ -opioide o el receptor NMDA.

Los efectos fisiológicos de la activación de los receptores sigma incluyen hipertensión, taquicardia, taquipnea, efectos antitusivos, y midriasis (103). Los agonistas selectivos del receptor sigma producen efectos antidepresivos en ratón (105) y pueden inducir efectos alucinógenos (106).

Existen dos tipos de receptores sigma: σ_1 y σ_2 , aunque del subtipo σ_2 no existe mucha información. Los σ_1 abundan en el sistema nervioso central, el hígado, el riñón, el corazón, el tracto digestivo, la médula adrenal y el bazo (107).

La función más destacada de los receptores sigma es la modulación de canales iónicos tales como canales de calcio, potasio, sodio, cloro,... así como del receptor NMDA y de receptores de inositol trifosfato (108). El resultado de la activación del receptor sigma es inhibir a la mayoría de canales regulados por voltaje y potenciar aquéllos dependientes de ligando (108).

Los ligandos sigma-1 regulan la activación del receptor NMDA (109) y pueden interactuar también con receptores metabotrópicos de glutamato (110). No obstante, no está claro si la regulación ejercida por los ligandos sigma se debe a su interacción directa con los receptores sigma-1 o a una modulación por interacción directa con los receptores NMDA (111).

7. NEUROESTEROIDES

Los esteroides sintetizados en el cerebro y sistema nervioso, reciben el nombre de neuroesteroides y ejercen una amplia variedad de funciones. Además de los neuroesteroides, en el SNC también existen esteroides que no se sintetizan en el SNC, sino que provienen de tejidos periféricos como las glándulas adrenales, los testículos o la placenta. Este tipo de esteroides, sintetizados en tejidos periféricos pero con función reguladora en el SNC, reciben el nombre de esteroides neuroactivos. En general, tanto los neuroesteroides como los esteroides neuroactivos, no median sus acciones a través de los clásicos receptores nucleares de hormonas esteroides, sino a través de receptores ionotrópicos.

El concepto de que los esteroides podrían ser sintetizados *de novo* en el cerebro deriva de observaciones realizadas en la década de 1980 por Baulieu y cols. (112). Encontraron que algunos esteroides como la pregnenolona, la dehidroepiandrosterona (DHEA) y sus ésteres de sulfato (sulfato de pregnenolona y DHEAS respectivamente) se encuentran en concentraciones más altas en el

sistema nervioso (cerebro y nervios periféricos) que en el plasma. Esta concentración de esteroides se mantuvo en el sistema nervioso mucho después gonadectomía o adrenalectomía (113, 114). Estos resultados sugirieron que los esteroides o bien podían ser sintetizados *de novo* en el SNC, o bien se podían acumular allí.

Para comprobar si los esteroides se sintetizaban en realidad en el cerebro o si sólo se acumulaban específicamente en sistema nervioso, se investigó si las enzimas involucradas en la esteroidogénesis se encontraban en el SNC. Los resultados establecieron de manera inequívoca que dichas enzimas se encuentran en el tejido nervioso, donde además se encontraron enzimas adicionales para esta función.

7.1 Síntesis de neuroesteroides

Los neuroesteroides se sintetizan a partir del colesterol por una serie de enzimas que actúan acopladamente para sintetizar uno o varios neuroesteroides. La síntesis de neuroesteroides en cada tejido depende del nivel de expresión y actividad de estas enzimas y/o de la competencia entre ellas por los sustratos (115).

En las glándulas suprarrenales y las gónadas, la síntesis de andrógenos, estrógenos, glucocorticoides y mineralocorticoides sigue el esquema presentado en la Figura 12. En las glándulas suprarrenales, la expresión de la enzima denominada P450c11 β permite la síntesis de glucocorticoides, mientras que la expresión de P450c11AS permite la síntesis de mineralocorticoides.

Por otra parte, en el ser humano se expresa en la glándula suprarrenal la P450c17 que es una enzima clave en la esteroidogénesis ya que su expresión y actividad enzimática dicta que tipo de esteroides se sintetizan: la falta de su expresión en la zona glomerular permite la conversión de progesterona a 11-desoxicorticosterona, que junto a la expresión de P450c11AS, conduce finalmente a la síntesis de mineralocorticoides. La expresión

de P450c17 con actividad 17 α -hidroxilasa permite la hidroxilación de 17 α pregnenolona, que junto a la acción de la P450c21 y la P450c11 β , conduce a la síntesis de glucocorticoides (cortisol) en la zona fasciculada. La expresión de la P450c17 con actividad 17 α -hidroxilasa y 17,20-liasa permite la conversión de los esteroides C21 a C19 y, por tanto, la síntesis de los andrógenos (Figura 12).

En el cerebro, este proceso es más complejo. No sólo porque las enzimas esteroidogénicas se expresan en distintos tipos celulares (neuronas, glía), sino que además su distribución en el cerebro es heterogénea. Por ejemplo, algunas enzimas pueden ser activas sólo en los cuerpos celulares, mientras que otras son activas en las fibras que se extienden desde los cuerpos celulares (115).

El primer paso en la síntesis de neuroesteroides (Figura 12), es la conversión del colesterol a pregnenolona. La etapa limitante en la esteroidogénesis es el transporte del colesterol a la membrana mitocondrial interna donde se encuentra el primer enzima esteroidogénico, el citocromo P450 "*side chine cleavage*" (P450scc), que transforma el colesterol en pregnenolona. Hay dos proteínas que median la traslocación del colesterol citoplasmático a la membrana mitocondrial interna:

- la proteína de la regulación aguda de la esteroidogénesis (StAR)
- el receptor mitocondrial de benzodiazepinas, antiguo PTBR, actualmente denominado proteína traslocadora o TSPO).

El TSPO forma un poro a través del cual transita el colesterol. Los moduladores de este transportador pueden modificar la neuroesteroidogénesis favoreciendo o bloqueando la apertura de este canal (116). Por ejemplo, el ligando endógeno de este receptor DBI y ligandos exógenos como 4'-clorodiazepam o FGIN-1-27, estimulan la síntesis mitocondrial de pregnenolona (117).

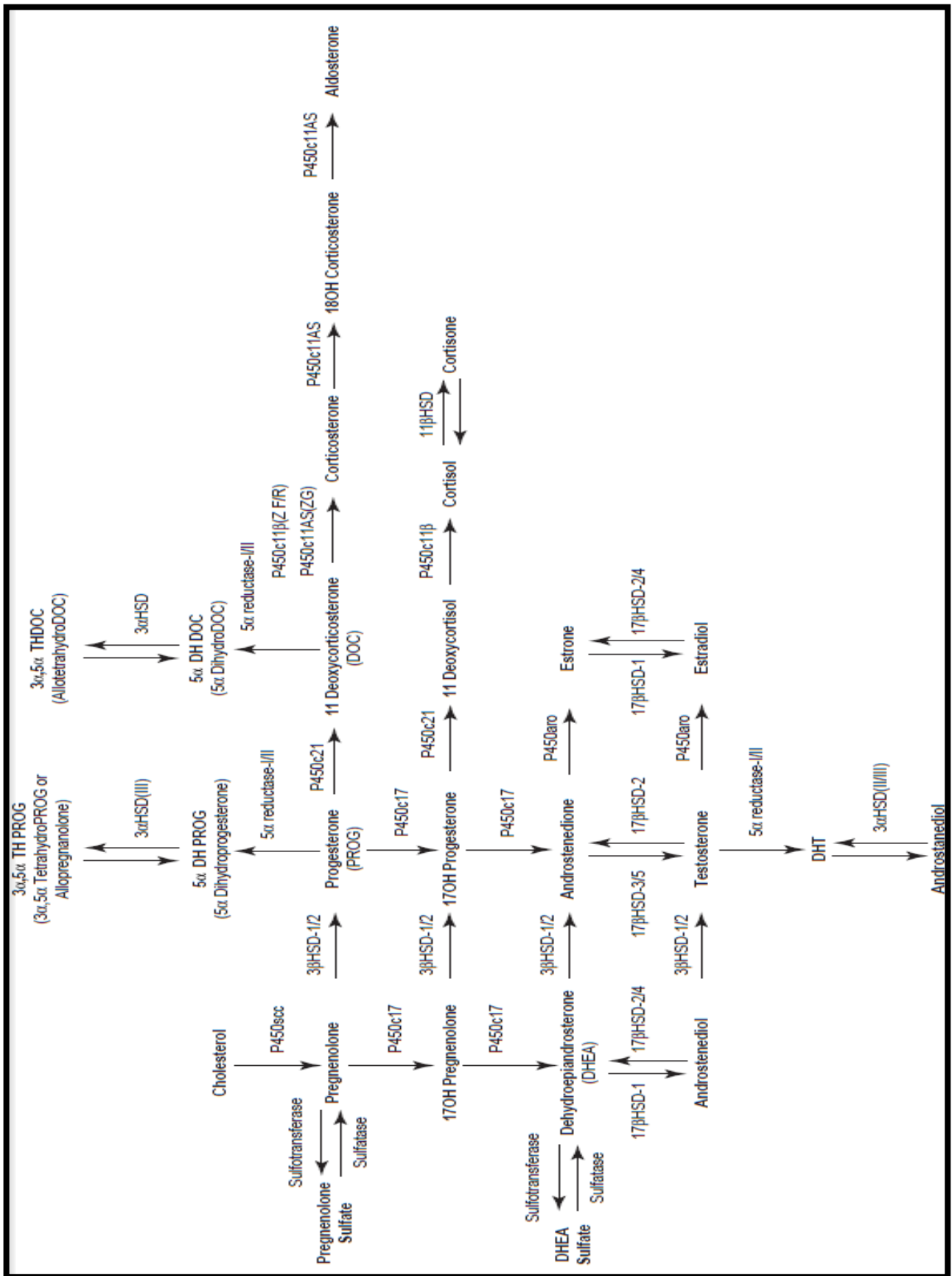


Figura 12: Esquema simplificado de la esteroidogénesis.

La proteína StAR parece interactuar con el receptor TSPO para facilitar el transporte de colesterol a través de la membrana mitocondrial. Se ha propuesto que esta proteína capta el colesterol de la membrana mitocondrial externa y lo transfiere al TSPO, que formaría el canal de colesterol y lo dirigiría a la membrana mitocondrial interna para que pudiera ser utilizado por la P450_{scc}. Éste es el paso más limitante y está altamente controlado.

La P450_{scc} se encarga de la escisión de la cadena lateral del colesterol en tres reacciones químicas sucesivas: 20 α -hidroxilación, 22-hidroxilación y escisión del enlace C20-C22, que conducen finalmente a la pregnenolona (Figura 12).

Una vez que se sintetiza pregnenolona, ésta puede ser convertida por distintas enzimas en diferentes tipos de neuroesteroides. La pregnenolona puede ser hidroxilada en C17 por la P450_{c17} dando 17-hidroxipregnenolona la cual dará lugar al DHEA por la acción de la P450_{c17}, o bien puede ser convertida a progesterona por 3 β HSD (Figura 12).

La progesterona es sustrato de la 5 α -reductasa que produce derivados reducidos que serán a su vez sustratos de la 3 α -hidroxiesteroideshidrogenasa (3 α -HSD). Los roedores tienen una sola 3 α -HSD que puede mediar en todas estas reacciones, mientras que los seres humanos tenemos varias isoformas que manifiestan especificidad por el sustrato (118). Por lo tanto, la expresión de una u otra de estas enzimas y sus actividades, determinarán que esteroides neuroactivos/neuroesteroides se sintetizan en un tejido o área cerebral determinados.

La mayoría de las enzimas neuroesteroidogénicas se han encontrado en corteza, hipocampo, bulbo olfatorio, ganglios basales, hipotálamo, tálamo y cerebelo. También se expresan algunas de las enzimas, aunque a menor concentración, en el tectum, bulbo raquídeo, pituitaria y médula espinal, así como en diversas regiones del sistema nervioso periférico (119). Algunas de las enzimas

implicadas en la neuroesteroidogénesis se expresan en astrocitos y oligodendrocitos, otras en las neuronas y otras en ambas (120).

Estos enzimas son capaces de sintetizar esteroides *de novo* a partir del colesterol y también de metabolizar esteroides periféricos que alcanzan el sistema nervioso a través del torrente sanguíneo. Las principales células esteroideogénicas en el sistema nervioso son las neuronas y las células gliales: las células de Schwann (sistema nervioso periférico) y los oligodendrocitos y astrocitos (SNC) (120). Se ha demostrado que las células de Purkinje son una de las mayores productoras de esteroides *de novo* en el cerebro (121).

7.2 Función fisiológica de los neuroesteroides

Los niveles de neuroesteroides en el cerebro humano varían con la edad. En el cerebelo humano el neuroesteroide mayoritario es la pregnenolona (125 ± 20 nmol/kg), que es el precursor de todos al derivar directamente del colesterol. Le siguen el DHEAS (69 ± 6 nmol/kg), el DHEA (30 ± 10 nmol/kg), la progesterona (25 ± 7 nmol/kg), el sulfato de pregnenolona (8 ± 1 nmol/kg), y la alopregnanolona ($1,4 \pm 0,8$ nmol/kg). Aunque la concentración de neuroesteroides varía en función del área cerebral, en general se mantiene el orden de abundancia de los mismos descrito para cerebelo (122).

Una de las primeras observaciones de la acción neuronal de los neuroesteroides fue la descripción de las notables propiedades anestésicas de la progesterona (123). Los mecanismos por los que la progesterona y sus derivados actúan en el SNC incluyen tanto las acciones genómicas mediadas por los receptores nucleares de los esteroides, como acciones no genómicas, mediadas por receptores de neurotransmisores como por ejemplo el GABA (124).

Los receptores intracelulares de hormonas esteroideas tienen una localización intranuclear, ya que son proteínas que pueden unirse al ADN. Los esteroides libres son internalizados al citoplasma donde

interaccionan con su correspondiente receptor. Este complejo receptor/esteroide se trasloca al núcleo donde actúa como un factor de transcripción activando o reprimiendo la transcripción de determinados genes mediante su unión al ADN.

Además de este mecanismo conocido desde hace mucho tiempo, se sabe que los neuroesteroides pueden unirse a receptores de membrana como el NMDA o el GABA_A. No hay ninguna evidencia de que el DHEA o el DHEAS se unan a receptores de esteroides nucleares pero sí se ha demostrado que modulan la actividad de los receptores GABA, NMDA, y sigma (95) (96).

7.2.1 Modulación del receptor NMDA por neuroesteroides

Algunos neuroesteroides como el sulfato de pregnenolona, el DHEA y el DHEAS modulan la actividad del receptor NMDA (124). La alopregnanolona sulfato, pero no la alopregnanolona, actúa como un modulador negativo del receptor NMDA (125), mientras que el DHEA, la pregnenolona, y sus ésteres de sulfato se consideran moduladores alostéricos positivos.

Esta modulación del receptor NMDA se produce modulando la frecuencia o la duración de apertura del canal de calcio (126).

A diferencia de las interacciones con los receptores GABA_A (ver punto siguiente), la interacción directa de los neuroesteroides con el receptor NMDA no está bien documentada.

7.2.2 Modulación del receptor GABA_A por neuroesteroides

La alopregnanolona (5 α , 3 α -tetrahydroprogesterone) es un potente modulador de los receptores GABA (127). Los derivados 5 α de la progesterona, como alopregnanolona, DHEA y pregnenolona, se unen a los receptores GABA_A en un sitio diferente al de unión de las benzodiazepinas y los barbitúricos, y son moduladores alostéricos del

receptor GABA_A capaces de inducir corrientes de cloruro en diferentes modelos tanto *in vitro* como *in vivo* (124).

Tabla 7: Efectos de algunos neuroesteroides sobre diversos receptores .

Neuroesteroide	Receptor	Tipo de modulación	Neuroesteroide	Receptor	Tipo de modulación
Alopregnanolona	GABA _A	Positiva	DHEAS	GABA _A	Negativa
				NMDA	Positiva
Pregnanolona	GABA _A	Positiva	DHEA	GABA _A	Negativa
				NMDA	Positiva
Dioxicorticosterona	GABA _A	Positiva	Estradiol	NMDA	Negativa
				Kainato	Positiva
Sulfato de pregnenolona	GABA _A	Negativa	Progesterona	GABA _A	Positiva
	NMDA	Positiva		Kainato	Positiva
	AMPA	Negativa		Glicina	Negativa
	Kainato	Negativa			
	Glicina	Negativa			

Los neuroesteroides pueden actuar como moduladores positivos o negativos de los receptores. En la Tabla 7 (128) podemos ver algunos ejemplos.

Por estudios *in vitro* con receptores recombinantes se sabe que la presencia de subunidades α y γ en los receptores GABA_A afecta la modulación ejercida por neuroesteroides, determinando su acción como moduladores positivos o negativos. Por ejemplo, la pregnanolona aumenta la activación de la mayoría de los receptores GABA, pero reduce la activación de los que contienen subunidades $\alpha 4$ (129).

7.3 Implicación de los neuroesteroides en el aprendizaje y la memoria.

Los neuroesteroides modulan procesos de aprendizaje y memoria (130-132). La pregnenolona, el DHEA, el DHEAS y el sulfato de pregnenolona no solamente son capaces de suprimir los déficits de memoria sino que también son capaces de mejorar de la ejecución de la memoria en ratas jóvenes sin deterioro cognitivo (133). Incluso los glucocorticoides desempeñan un importante papel en la facilitación de la memoria asociada a las vivencias emocionales y estresantes (130, 131, 134).

El sulfato de pregnenolona previene los déficits de memoria inducidos por antagonistas competitivos del receptor NMDA en el laberinto en Y y en las tareas de evitación activa y pasiva (135) (136). El sulfato de pregnenolona también revierte el deterioro inducido por la dizolcipina (MK-801), antagonista no competitivo del receptor NMDA, en la tarea de evitación pasiva (137).

La administración intrahipocampal de sulfato de pregnenolona revierte la disfunción de la memoria en el test de Morris y en el test del laberinto en Y en ratas viejas con deterioro cognitivo (138, 139).

De forma general, los neuroesteroides que actúan como moduladores negativos del receptor GABA_A parecen mejorar la memoria (140), mientras que aquéllos que actúan como moduladores positivos pueden producir deterioro cognitivo (141). Por ejemplo, el sulfato de pregnenolona inyectado en el núcleo basal magnocelular mejora la memoria espacial en ratas mientras que la alopregnanolona produce un deterioro en la misma (142).

Algunos de estos efectos facilitadores o disruptores de la memoria por parte de los neuroesteroides moduladores negativos o positivos del receptor GABA_A se deben, probablemente, a la acción moduladora que las neuronas GABAérgicas ejercen sobre el sistema colinérgico (143). Experimentos de microdiálisis cerebral muestran que la inyección intracerebroventricular de sulfato de pregnenolona aumenta la liberación de acetilcolina en las principales zonas de proyección del sistema colinérgico central (neocórtex e hipocampo) pero no en las interneuronas colinérgicas del estriado (144). El aumento de liberación de acetilcolina cortical inducido por la infusión de sulfato de pregnenolona en el neocórtex se correlaciona con la mejora en la memoria espacial (144). Este efecto se atribuye a la disminución por el sulfato de pregnenolona de la inhibición GABAérgica en el neocórtex. De forma opuesta, la administración intracerebroventricular de alopregnanolona disminuye de la liberación de acetilcolina en el córtex (145).

Tabla 8: Efectos de algunos neuroesteroides sobre la memoria y el aprendizaje de varios tests.

Neuroesteroide	Efecto	Test	Tipo de memoria	Tipo de aprendizaje	Referencia
Pregnenolona sulfato		Evitación pasiva	Procedimental	Asociativo (cond. clásico)	(136)
		Evitación activa	Procedimental	Asociativo	(135)
		Go/no go visual discrimination task	Procedimental	Asociativo	(146)
		Caja de Skinner	Procedimental	Asociativo	(135)
		Lab. acuático de Morris	Referencia	Asociativo	(139)
		Holeboard	Referencia	Asociativo	(147)
		Discriminación ambiente nuevo/familiar	Episódica	No asociativo	(148)
		Alternancia espontánea	Trabajo	No asociativo	(149)
		Reconocimiento diferencial	Trabajo	Asociativo	(150)
DHEAS		Evitación pasiva	Procedimental	Asociativo (cond. clásico)	(149)
		Miedo condicionado	Procedimental	Asociativo (cond. clásico)	(151)
		Evitación activa	Procedimental	Asociativo	(152)
		Lab. acuático de Morris	Referencia	Asociativo	(153)
		Alternancia espontánea	Trabajo	No asociativo	(149)
		Reconocimiento diferencial	Trabajo	Asociativo	(150)
Pregnenolona		Evitación activa	Procedimental	Asociativo	(152)
		Evitación pasiva	Procedimental	Asociativo	(149)
		Reconocimiento diferencial	Trabajo	Asociativo	(150)
		Alternancia espontánea	Trabajo	No asociativo	(149)
DHEA		Evitación activa	Procedimental	Asociativo	(152)
		Evitación pasiva	Procedimental	Asociativo	(154)
		Lab. acuático de Morris	Referencia	Asociativo	(149)
		Reconocimiento diferencial	Trabajo	Asociativo	(153)
		Alternancia espontánea	Trabajo	No asociativo	(155)
Alopregnanolona		Evitación pasiva	Procedimental	Asociativo (cond. clásico)	(149)
		Lab. acuático de Morris	Referencia	Asociativo	(156)
		Discriminación ambiente nuevo/familiar	Episódica	No asociativo	(157)
Pregnanolona		Reconocimiento diferencial	Trabajo	Asociativo	(142)
		Caja de Skinner	Procedimental	Asociativo	(158)

Adaptado de Martin y cols. (128). Las flechas oscuras se refieren a los efectos en la ejecución de la memoria (↑ mejora en la ejecución de la memoria; ↓ disminución en la ejecución de la memoria) mientras que las claras reflejan a si revierte la amnesia inducida experimentalmente (↑ revierte la amnesia; ↓ no revierte la amnesia).

Se ha estudiado si los neuroesteroides actúan sobre la adquisición, la retención o la recuperación de la información. Parece ser que de forma general, los neuroesteroides facilitan los procesos de retención (142, 152). En estudios de memoria espacial no se observan mejoras en el proceso de adquisición por la administración de 5 ng de sulfato de pregnenolona en el neocórtex (142). En general, los neuroesteroides no son eficaces cuando se administran antes de la fase de adquisición, excepto en estudios sobre la prevención o reversión del deterioro cognitivo inducido por determinados agentes farmacológicos (136).

En cambio, se ha sugerido que los neuroesteroides moduladores positivos del receptor GABA_A podrían afectar más los procesos de aprendizaje que los de memoria. La administración de alopregnanolona provoca una disminución del aprendizaje espacial en el test acuático de Morris (157) y en otras tareas de reconocimiento espacial (142) cuando se inyecta antes de la sesión de adquisición, mientras que inyecciones postadquisición no inducen ningún efecto (Tabla 8).

7.4 Posible papel de los neuroesteroides en la modulación de la función de la vía glutamato-óxido nítrico-GMP cíclico.

Los neuroesteroides pueden modular la vía Glu-NO-GMPc a través de la modulación de diversos receptores como el NMDA, los sigma o los GABA_A (159, 160).

Algunos neuroesteroides (alopregnanolona, THDOC, pregnanolona) potencian la activación de los receptores GABA_A,

mientras que otros (DHEA, DHEA sulfato, sulfato de pregnenolona) la reducen (161-163).

Otros neuroesteroides también pueden modular la función de los receptores NMDA. Por ejemplo, el DHEA y el DHEA sulfato son moduladores positivos de los receptores NMDA (124, 164).

Por lo tanto, es muy probable que distintos neuroesteroides puedan modular de modo diferente la función de la vía Glu-NO-GMPc en cerebro a través de la modulación de receptores GABA_A y / o de receptores NMDA.

7.5 Alteraciones de las concentraciones neuroesteroides en hiperamonemia y encefalopatía hepática

Tanto la pregnenolona como la alopregnanolona aumentan en cerebro de pacientes fallecidos en coma hepático (165) y en ratones con fallo hepático agudo inducido por tioacetamida o inyectados con amonio (166).

Además, la adición de amonio al medio de cultivo de astrocitos aumenta la pregnenolona (166), sugiriendo que la hiperamonemia es responsable del aumento de neuroesteroides en la encefalopatía hepática.

En pacientes fallecidos por coma hepático así como en modelos animales con encefalopatía hepática tipo A o B, aumenta el contenido de TSPO. Además, se ha comprobado por estudios de PET en pacientes con encefalopatía hepática mínima, que el incremento de TSPO está correlacionado con la severidad del deterioro cognitivo (167). Este incremento de TSPO podría conducir a una mayor síntesis de neuroesteroides.

Es importante tener en cuenta que la hiperamonemia puede aumentar los niveles de neuroesteroides que potencian la activación de receptores GABA_A produciendo una inhibición de la vía Glu-NO-

GMP, pero también los de neuroesteroides que pueden aumentar la activación de esta vía.

II. OBJETIVOS

II. Objetivos

En el cerebelo de ratas hiperamonémicas existe un aumento del tono GABAérgico que está implicado en el deterioro de la función de la vía Glu-NO-GMPc y de las capacidades de aprendizaje y memoria moduladas por esta vía. Al aumento del tono GABAérgico contribuyen:

- un aumento de la concentración extracelular de GABA en cerebelo.
- un aumento de la cantidad de algunas subunidades de receptores GABA_A.
- un aumento de la concentración de neuroesteroides que modulan la activación de receptores GABA_A.

Los neuroesteroides pueden modular diversos receptores incluyendo el receptor GABA_A, el NMDA y los receptores sigma.

Esta tesis parte de las hipótesis de que:

- algunos neuroesteroides modulan, a concentraciones fisiológicas, la función de la vía Glu-NO-GMPc a través de su acción sobre receptores GABA_A, NMDA o sigma.
- la hiperamonemia crónica puede alterar la modulación por neuroesteroides de los receptores mencionados y de la vía Glu-NO-GMPc.
- algunos neuroesteroides que modulan la vía Glu-NO-GMPc pueden tener utilidad terapéutica para restaurar la función de la vía y la capacidad de aprendizaje modulada por la misma.

Teniendo en cuenta estas hipótesis, los objetivos concretos de esta tesis son:

1. Analizar si distintos neuroesteroides regulan *in vivo* la función de la vía Glu-NO-GMPc en cerebelo de ratas control.
2. Analizar a través de qué receptores llevan a cabo la modulación de esta vía.

3. Evaluar si la hiperamonemia crónica altera la modulación por diferentes neuroesteroides de la función de la vía Glu-NO-GMPc en cerebelo y a través de qué receptores.

4. Evaluar si alguno de los neuroesteroides estudiados podría normalizar la función de la vía Glu-NO-GMPc y tener utilidad terapéutica para restaurar en ratas con hiperamonemia crónica la capacidad de aprendizaje y memoria modulados por esta vía.

5. Evaluar si este neuroesteroide restaura las alteraciones en la actividad y coordinación motoras en ratas con hiperamonemia crónica.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

1. ANIMALES

Se utilizaron ratas albinas macho de la cepa Wistar (*Rattus norvegicus*) suministradas por Charles River. Los animales se estabularon en jaulas en un ambiente controlado: ciclo de 12 horas de luz (8h-20h) y 12 h de oscuridad (20h-8h), $23 \pm 1^\circ\text{C}$ de temperatura y una humedad del $55 \pm 5\%$.

Todos los procedimientos con animales fueron supervisados y aprobados por el Comité de Ética y Bienestar Animal de nuestra institución (Centro de Investigación Príncipe Felipe) siguiendo la legislación española "Protección de los Animales Utilizados para Experimentos y Otros Propósitos Científicos" y de acuerdo con las normas de la Unión Europea.

1.1 Modelo de hiperamonemia crónica moderada sin fallo hepático.

Como modelo de hiperamonemia crónica moderada sin fallo hepático se utilizó la administración a las ratas de una dieta rica en amonio (30% de acetato amónico p/p) durante cinco semanas como describen Felipe y cols. (37) y Azorín y cols. (36). Esta dieta produce un estado de hiperamonemia sostenida en el que los niveles de amonio en sangre ($\approx 430 \mu\text{M}$) son unas tres veces más altos que en las ratas control ($\approx 150 \mu\text{M}$). En cerebro, hígado y músculo los aumentos de los niveles de amonio son del 41, 37 y 50%, respectivamente. Los niveles de urea en sangre ($\approx 16 \text{ mM}$) y la eliminación de urea ($25 \text{ mmol}/24 \text{ h}$) en orina son aproximadamente el doble de los valores correspondientes a animales control. Las ratas control se alimentaron con pienso comercial (Harlan 2014 Mantenimiento rata/ratón).

Ambos grupos tuvieron libre acceso a agua y comida, excepto durante los tests que precisaban de una restricción de la ingesta como la tarea de discriminación condicionada en el laberinto en Y.

2. ANÁLISIS DE LA FUNCIÓN DE LA VÍA GLUTAMATO-ÓXIDO NÍTRICO-GMP CÍCLICO POR MICRODIÁLISIS EN CEREBELO *IN VIVO*

2.1 Implantación de la guía de microdiálisis en el cerebelo

Se anestesiaron las ratas con isoflurano (5% en oxígeno 100% para inducir la anestesia y 2% para mantenerla). Se colocó la cabeza del animal en un sistema de estereotaxia para implantar en el cerebelo la guía de microdiálisis (MD-2251, Omega-ring Intracerebral Guide Cannula and Stylet, 6/pkg. BASi). Se escogió el cerebelo porque se ha demostrado que existe una correlación entre los niveles de GMPc extracelular en cerebelo y la capacidad de aprendizaje del laberinto en Y (29, 168). Tras la anestesia se realizó una incisión sagital y se dejó el cráneo al descubierto y con la ayuda de una espátula, suavemente, se raspó para quitar el tejido conectivo que recubre el cráneo. Con esto se intentó facilitar la posterior adhesión del cemento dental al cráneo para la sujeción de la guía de microdiálisis.

Se realizaron dos pequeñas perforaciones para insertar dos tornillos de sujeción al cráneo. A continuación se marcaron en la superficie del cráneo las coordenadas de introducción de la guía en el cerebelo: -10,2 mm posterior, 1,6 mm a la derecha y 0,8 mm bajo la duramadre (169). Se perforó el cráneo, realizando un agujero de 1 mm de diámetro que permitió el acceso vertical de la guía. La guía se sujetó al cráneo mediante los tornillos y cemento dental. Después se suturó la piel y se separaron las ratas en jaulas individuales. Tras 48 horas para que las ratas se recuperen de la anestesia y la cirugía, se realizó la microdiálisis cerebral.

2.2 Experimento de microdiálisis *in vivo* en cerebelo

La microdiálisis cerebral es una técnica muy empleada para el estudio de los cambios fisiológicos, farmacológicos y patológicos de una amplia gama de sustancias de baja masa molecular en el fluido extracelular del cerebro (170). La microdiálisis permite la recuperación de sustancias endógenas, por ejemplo neurotransmisores o GMPc, y la infusión de sustancias exógenas, como agonistas de diversos receptores, a través de la sonda de microdiálisis (170). Esta técnica se puede utilizar en animales despiertos que se mueven libremente de modo que permite estudiar la relación entre los cambios en el comportamiento (por ejemplo, actividad motora) y los niveles de neurotransmisores u otras moléculas (GMPc, aminoácidos, etc.) del medio extracelular en diversas áreas del cerebro.

El objetivo de la microdiálisis cerebral es tomar muestras del fluido extracelular y analizar en él la concentración de los compuestos de interés y cómo cambia con el tiempo o con los tratamientos.

Para llevar a cabo el experimento de microdiálisis, se retiró el estilete de la guía y se colocó la sonda (MD-2200, Brain Microdialysis Probes) que posee una membrana semipermeable de 2 mm que permite el intercambio de sustancias de masa molecular inferior a 30 kDa. La sonda se introduce en la guía de forma cuidadosa y con el animal despierto. Se perfundió continuamente a través de la sonda líquido cefalorraquídeo artificial a un flujo de 3 μ L/minuto mediante una bomba de microperfusión (BAS, Analytical Systems Inc., USA). La composición del líquido cefalorraquídeo artificial es (en mM) cloruro sódico 145, cloruro potásico 3 y cloruro cálcico 2,26 tamponado a pH 7,4 con tampón fosfato 2 mM (44). El líquido cefalorraquídeo artificial se filtró con filtros Millipore de 0,45 μ m de diámetro de poro. El porcentaje de recuperación de las sondas para algunos de los tratamientos administrados es, por ejemplo, 13% para

sulfato de pregnenolona y 9% alopregnanolona-acetato, lo que indica que las concentraciones a las que actúan sobre los receptores oscilan entre el 9-15 nM que es el rango fisiológico.

La Figura 13 muestra un esquema del funcionamiento de la sonda de microdialísis. El dializado recogido durante la primera hora y media tras la inserción de la sonda se desechó porque estudios previos realizados en el laboratorio han demostrado que este es el tiempo necesario para que los niveles de GMPc se estabilicen. Transcurrido ese tiempo se recogieron muestras cada 30 minutos (90 μ L de dializado en cada muestra) separando 30 μ L para la determinación de neurotransmisores y aminoácidos por HPLC, y 60 μ L a los que se añaden 5 μ L EDTA 40 mM para la determinación de GMPc. Las muestras se conservaron en nitrógeno líquido durante el experimento para luego ser almacenadas a -80°C hasta el momento en que se empleen.

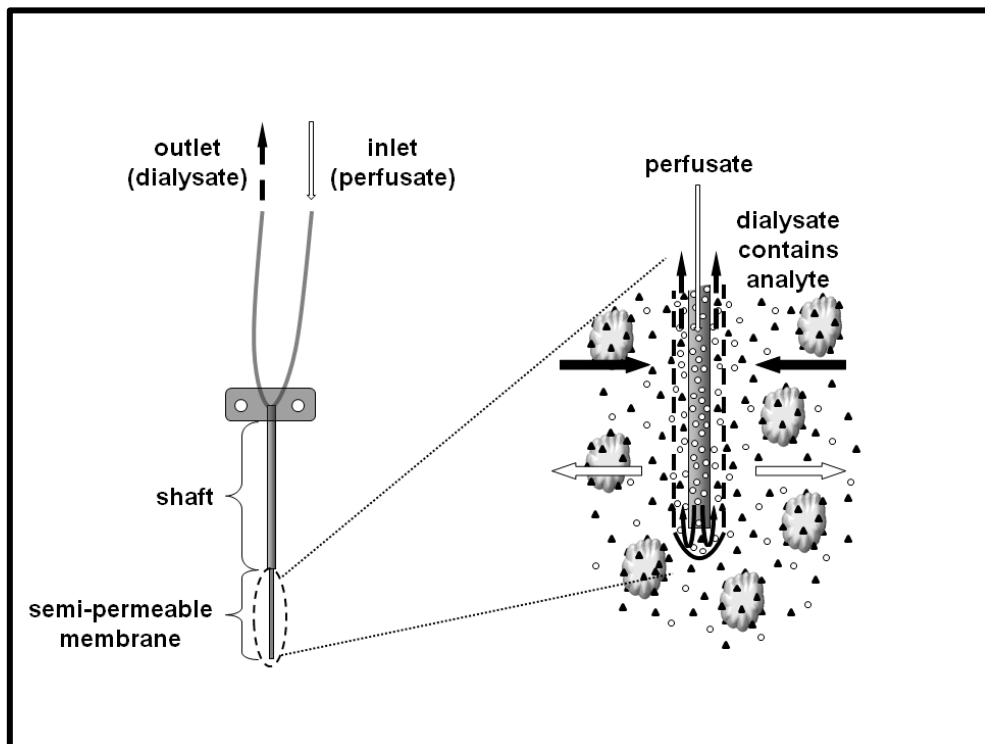


Figura 13: Esquema del funcionamiento de una sonda de microdialísis cerebral.

Una vez recogidas las muestras basales se administraron a través de la misma sonda los neuroesteroides, moléculas testadas o vehículo durante dos horas (cuatro fracciones) y a continuación, se administró NMDA 0,5 mM en líquido cefalorraquídeo artificial durante 30 minutos. La administración de NMDA 0,5 mM a través de la sonda activa el receptor NMDA y la vía glutamato-óxido nítrico-GMPc y conduce a un aumento de la concentración de GMPc extracelular. En estas condiciones, el aumento de GMPc extracelular es una buena medida de la función de la vía Glutamato-NO-GMPc en cerebelo *in vivo* en ratas despiertas en libre movimiento (44).

Tras los 30 minutos de NMDA, se volvió a perfundir líquido cefalorraquídeo artificial durante al menos 90 minutos.

Los compuestos utilizados en los experimentos de microdiálisis fueron:

- neuroesteroides (Sigma-Aldrich):
 - THDOC: 3 α ,21-dihidroxi-5 α -pregnan-20-one
 - Pregnanolona: 5 β -pregnan-3 α -ol-20-one
 - Pregnenolona: 5-pregnen-3 β -ol-20-one
 - Sulfato de pregnenolona: 5-pregnen-3 β -ol-20-one sulfate.
 - DHEAS: dehidroisoandrosterona 3-sulfato sodium salt.
 - Alopregnanolona-acetato: 5 α -pregnan-3 β -ol-20-one 3 β -acetato.
- DTG (1,3-di-(2-tolyl)guanidine) un agonista de los receptores sigma, Tocris.

En el caso de querer evaluar únicamente la función de la vía Glu-NO-GMPc el protocolo se reduce a, tras el tiempo de estabilización, administrar durante dos horas y media (cinco fracciones) líquido cefalorraquídeo artificial a continuación, durante media hora NMDA 0,5 mM para activar la vía, y durante al menos una hora y media más (tres fracciones), líquido cefalorraquídeo artificial.

3. DETERMINACIÓN DE CITRULINA, GLUTAMATO, GABA Y GMPc EN LAS MUESTRAS DE MICRODIÁLISIS

3.1 Determinación de citrulina, glutamato y GABA

La concentración de citrulina, glutamato y GABA en las muestras de microdiálisis se analizó utilizando un sistema de cromatografía líquida de alta presión (HPLC) acoplado a un detector de fluorescencia (Waters 474, filtro de excitación 340 nm y filtro de emisión 460 nm). Los aminoácidos en las muestras se derivatizan con OPA (orto-ftaldehído). Los aminoácidos reaccionan con el OPA en presencia de un reductor fuerte, en condiciones alcalinas (pH 9-11), dando un compuesto fluorescente. La separación de los derivados en fase reversa seguida de la detección de la fluorescencia constituye un método de análisis rápido, sensible y selectivo para todos los aminoácidos con aminas primarias. Los péptidos son menos reactivos y los grupos amínicos secundarios no reaccionan con OPA. Se emplearon 15 µL de microdializado, se derivatizaron con la solución de OPA y se inyectaron en el HPLC al cabo de 2 minutos. Para la separación de los aminoácidos se utilizó una columna de fase reversa C18, con una longitud de 250 mm y un diámetro de 4.6 mm y con partículas de 5 µm de diámetro (ODS 2, Waters Spherisorb) mantenida a temperatura constante de 20°C.

La cromatografía se realizó con un gradiente de dos soluciones (A y B) cuyo flujo fue de 1 ml/min. La solución A era una mezcla 95/5 (vol/vol) de tampón acetato sódico 50 mM (pH 5.67) y metanol y alcohol isopropílico (12,5 ml por litro de fase). La solución B era una mezcla 70/30 (vol/vol) metanol/agua. Las concentraciones se calcularon utilizando el programa Millennium 32 de Waters.

3.2 Determinación de GMPc

El GMPc se midió utilizando un kit de enzima inmunoensayo (Amersham Biotrak de GE Healthcare). Se emplearon 50 μ l de las muestras de dializado y la cantidad de GMPc se calculó según la curva estándar generada en el mismo ensayo.

4. ADMINISTRACIÓN CRÓNICA INTRACEREBRAL DE SULFATO DE PREGNENOLONA A LAS RATAS

Para la administración intracerebral continua de sulfato de pregnenolona se utilizaron mini bombas osmóticas. Tras tres semanas de administración de la dieta con 30% de amonio, se llevó a cabo una cirugía para implantar dichas bombas. Se utilizaron minibombas osmóticas con cánula para infusión cerebral ("ALZET". Brain infusion KIT II 3-5 mm. Mini-Osmotic pumps model 2004. ALZA Corporation, Palo Alto, CA, USA).

El día previo a la cirugía, se activaron las bombas rellenándolas completamente con vehículo (suero salino con DMSO al 10%) o con sulfato de pregnenolona (5-pregnen-3 β -ol-20-ona sulfato, de Sigma-Aldrich) a una concentración 0,667 mg/mL. Cada mini bomba osmótica tiene una capacidad de 250 μ L y libera 0,25 μ l/hora durante 28 días.

En el estudio se utilizaron cuatro grupos de ratas:

- Ratas control a las que se implantaron mini bombas osmóticas con vehículo.
- Ratas control a las que se implantaron mini bombas osmóticas con sulfato de pregnenolona.
- Ratas hiperamonémicas a las que se implantaron mini bombas osmóticas con vehículo.
- Ratas hiperamonémicas a las que se implantaron mini bombas osmóticas con sulfato de pregnenolona.

Se llevaron a cabo dos experimentos contando el primero con ocho ratas por grupo y el segundo, con seis ratas por grupo.

Las ratas se anestesiaron con isoflurano al 5% en oxígeno 100% para inducir la anestesia y al 2% para mantenerla. Se colocó la cabeza del animal en un sistema de estereotaxia (Kopft instruments) para implantar la cánula en el ventrículo.

Se realizó una incisión sagital de unos 2,5 cm dejando la superficie del cráneo al descubierto y con ayuda de una espátula, suavemente, se raspó para quitar el tejido conectivo que recubre el cráneo y facilitar la posterior adhesión del cemento dental que se emplea para sujetar la cánula. A continuación se preparó un bolsillo subcutáneo en el área escapular de la espalda del animal, donde se colocó la mini bomba osmótica conectada vía catéter a la cánula a implantar intraventricularmente en cerebro. Este bolsillo se preparó utilizando una pinza hemostática para hacer un pequeño túnel subcutáneo desde la incisión a nivel del cuero cabelludo hasta el área media y se fue abriendo y cerrando la pinza para dar forma al bolsillo. El bolsillo es lo suficientemente grande como para que quepa la mini bomba y tenga cierto margen de movimiento sin deslizarse demasiado (Figura 14).

La cánula se implantó en el ventrículo cerebral realizando un pequeño agujero en las siguientes coordenadas: 0,9 mm anterior, 1,3 mm a la derecha del bregma y 4,5 mm por debajo de la duramadre (Paxinos y Watson, 2007). La cánula se sujetó a la superficie del cráneo con un tornillo y cemento dental, y se suturó la piel. La mini bomba osmótica se insertó en el bolsillo subcutáneo, sin que el catéter estuviera muy tirante, para que el animal tenga movilidad sin peligro de que el catéter se desenganche de la cánula.

Se dejaron transcurrir al menos 48 horas para que los animales se recuperasen de la operación antes de realizar cualquier test cognitivo.

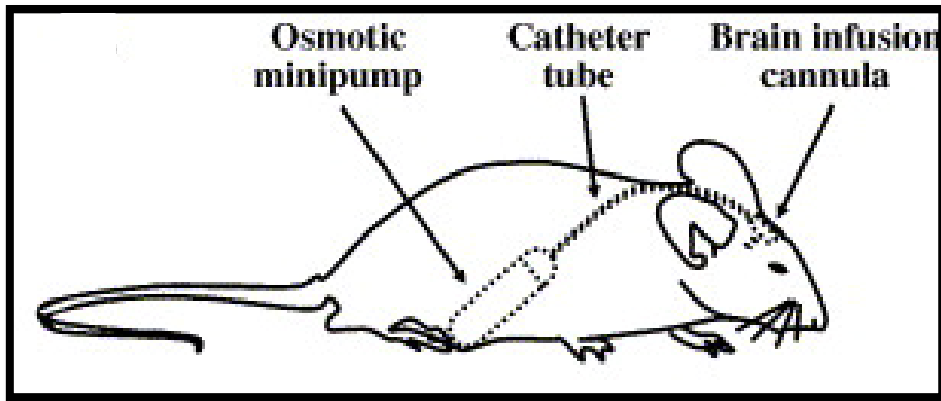


Figura 14: Esquema de colocación de la mini bomba osmótica subcutánea y el catéter intracerebroventricular.

Las ratas se sacrificaron a los 27 días desde la implantación de las bombitas osmóticas.

La funcionalidad de las bombas se verificó pesándolas antes de colocarlas y después del sacrificio. También se verificó el lugar donde se colocó la cánula mediante determinación histológica. Para ello, se seleccionaron dos animales por grupo y se cortaron los cerebros con un micrótopo en cortes de 30 μm a nivel de los ventrículos laterales y se conservaron en una solución protectora (30% etilenglicol / 30% glicerol en 0,1 M de NaKPO_4) a -20°C hasta el análisis histoquímico. Los cortes se tiñeron con violeta de cresilo para verificar la posición en uno de los ventrículos laterales de la cánula de la mini bomba. Este mismo procedimiento se realizó en el cerebelo para corroborar que la guía de microdiálisis estuviera colocada correctamente.

5. APRENDIZAJE DE UNA TAREA DE DISCRIMINACIÓN CONDICIONADA. TEST DEL LABERINTO EN Y

Este test (171) se realiza en un laberinto de madera de tres brazos idénticos en forma y longitud (60 cm de largo, 11,5 cm de ancho y 25 cm de altura) colocados en forma de Y. Uno de los brazos se elige como salida y los otros dos son los brazos de elección.

Se dispone de dos laberintos exactamente iguales cambiando únicamente el color, uno es blanco y el otro negro. El refuerzo

(comida en forma de "pellets") se coloca al final del brazo derecho en el caso del laberinto blanco, o en el izquierdo en el caso del negro. En cada ensayo del test, se coloca a la rata en el brazo de salida y se registra su elección de brazo (izquierdo o derecho), tras lo cual encontrará premio o no según haya acertado la asociación entre color y el brazo en el que se encuentra la comida.

La realización de este test requiere un período de familiarización del animal con el laberinto o pre-test así como una restricción de la comida durante el tiempo que dura el test y el pre-test para que el refuerzo en forma de comida tenga el efecto esperado. El procedimiento del pre-test es el siguiente:

- día 1: se introducen las ratas en parejas en el laberinto blanco durante diez minutos con la comida esparcida por todo el laberinto.
- día 2: se colocan las ratas individualmente durante diez minutos en el laberinto negro para que lo exploren con la comida esparcida por todo el laberinto.
- día 3: las ratas se colocan en el laberinto blanco individualmente durante cinco minutos situando la comida en un montón en los extremos distales de los dos brazos de elección.
- día 4: se hace lo mismo que el tercer día pero con el laberinto negro y la comida situada dentro de los recipientes que la portarán durante el test.

A partir del día siguiente, cada animal es sometido diariamente a diez ensayos en los cuales se cambia el color del laberinto de forma aleatoria. En cada ensayo, el tiempo máximo de permanencia en el laberinto es de tres minutos. El resultado del ensayo puede ser "Acierto" si va hasta el final del brazo correcto y coge la comida, "Error" si camina hasta el final del brazo donde no está la comida o "Fuera de tiempo" si el animal permanece en el brazo de salida hasta consumir los tres minutos.

Se considera que la tarea ha sido aprendida cuando la rata acierta los diez ensayos seguidos de un mismo día.

Si a los veinticinco días de la realización del test la rata no ha aprendido, ya no se hacen más tests considerando que el animal no es capaz de aprender la tarea.

6. ANÁLISIS DE LA FUNCIÓN MOTORA

6.1 Coordinación motora: Beam-walking

Este test mide coordinación motora fina y equilibrio. Consiste en hacer pasar a la rata por un listón de madera de un metro de longitud situado aproximadamente a un metro del suelo, hasta alcanzar al final del recorrido una caja cerrada y oscura, que proporciona un ambiente agradable para los roedores. El diámetro del listón de madera empleado depende del peso del animal, en esta tesis hemos empleado listones de veinte milímetros de diámetro. Para evitar que los animales se lesionen si se caen, colocamos debajo del listón una almohada de goma-espuma.

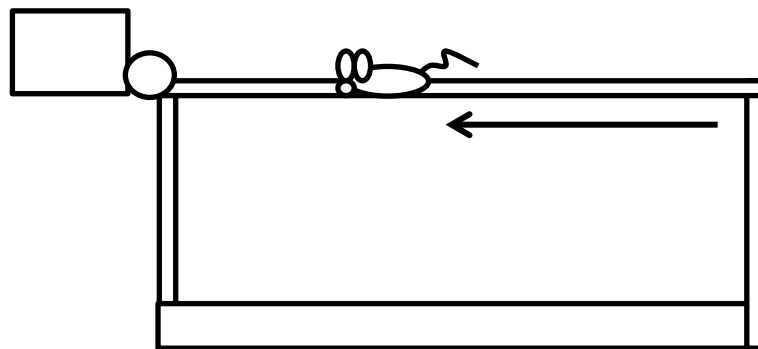


Figura 15: Esquema del ensayo del beam-walking.

Antes de efectuar el test es necesario familiarizar al animal con el listón. Para ello, el experimentador ayuda a las ratas individualmente a cruzar por el mismo hasta un máximo de cinco veces. Una vez acostumbradas, se ponen de nuevo al inicio del listón

y se mide el número de resbalones. Se considera que a mayor número de resbalones, menor es su coordinación motora.

6.2 Actividad motora

El análisis de la actividad motora espontánea se realiza utilizando un actímetro (MED Associates). Los animales se dejan durante 60 minutos en jaulas (43×43×30.5cm) provistas de células de rayos infrarrojos que detectan el movimiento del animal. El equipo dispone de dos filas de células y detectores que se encuentran a 1 y 6 cm sobre el suelo de la jaula. Los datos se recogen automáticamente por el programa informático "Activity Monitor" (MED System) para su posterior análisis. Cuando el animal interrumpe tres detectores infrarrojos consecutivamente el programa registra un movimiento ambulatorio. Un movimiento vertical o "rearing" se registra cuando la rata interrumpe la célula infrarroja situada a 6 cm del suelo. Durante la medida de la actividad motora/exploratoria los animales no tenían acceso al agua ni a la comida para facilitar la exploración del ambiente.

Se determinó el número de movimientos ambulatorios, el número de movimientos verticales ("rearing"), la distancia recorrida y la velocidad media en 60 minutos.

7. DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE AMONIO EN SANGRE

La medida del amonio se llevó a cabo utilizando el test Ammonia test kit II de Arkray. Se emplearon 20 µl de sangre fresca que se disponen sobre la tira reactiva y, tras una espera de 3 minutos, se obtuvo la medida del amonio al introducir la tira en el aparato (PocketChem BA, Arkray).

8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados se expresan como media \pm SEM (error estándar de las medias) del número de animales indicados en cada caso. Se realiza un análisis ANOVA de una vía seguido de test de Dunnett o comparaciones utilizando el test de Student según el caso. Los análisis estadísticos se realizaron con el programa Prism 4 (GraphPad Software, Inc.).

IV. RESULTADOS

1. MODULACIÓN DE LA FUNCIÓN DE LA VÍA GLU-NO-GMPc EN CEREBELO DE RATAS CONTROL POR DISTINTOS NEUROESTEROIDES

1.1 Efectos sobre el GMPc extracelular

1.1.1 THDOC

El THDOC no afectó los niveles basales de GMPc extracelular en el cerebelo de ratas de control ($0,65 \pm 0,08$ nM), pero inhibió la activación de la vía Glu-NO-GMPc por NMDA.

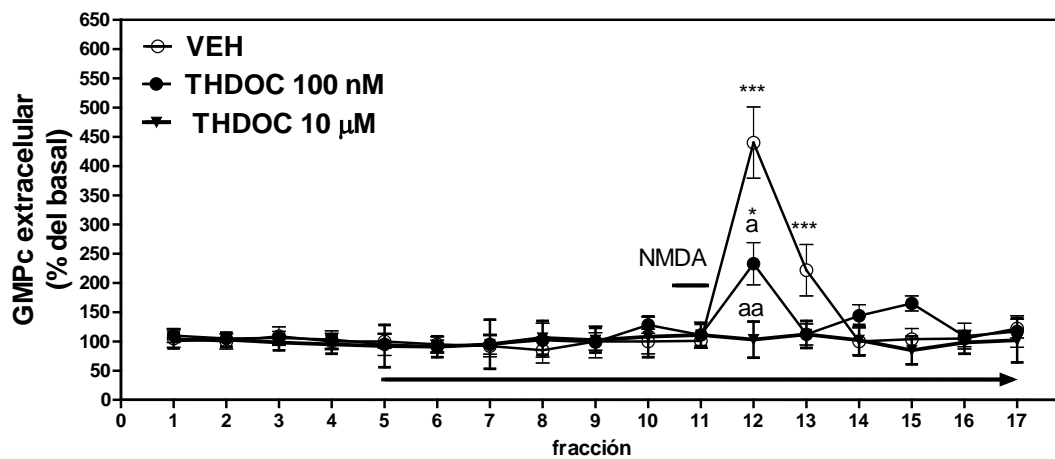


Figura 16: Efectos del THDOC sobre los niveles basales de GMPc extracelular y sobre el aumento de GMPc inducido por NMDA en ratas control. Las sondas de microdialisis se insertaron en el cerebelo, se perfundió a $3 \mu\text{l}/\text{min}$ y se tomaron muestras cada 30 minutos. Después de tomar cuatro muestras para determinar los niveles basales de GMPc, se comenzó a perfundir THDOC (100 nM o $10 \mu\text{M}$) o vehículo (VEH). Durante el periodo de 30 min indicado por la barra horizontal, se administró NMDA ($0,5 \text{ mM}$) para activar la vía Glu-NO-GMPc. Los valores se dan como porcentaje del basal (media de las cuatro primeras fracciones) y son la media \pm SEM de siete ratas por grupo. Los valores significativamente diferentes de la concentración basal de GMPc se indican mediante asteriscos. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$. Los valores significativamente diferentes del vehículo se indican con "a". a $p < 0,05$, aa $p < 0,01$.

En las ratas control la administración de NMDA a través de la sonda de microdiálisis activó la vía y aumentó ($p < 0,001$) el GMPc extracelular a $440 \pm 61\%$ de los niveles basales. La administración de 100 nM THDOC redujo ($p < 0,05$) el aumento de GMPc inducido por NMDA a $233 \pm 36\%$ del basal. La inhibición de la vía fue completa cuando se empleó THDOC 10 μM . El GMPc se mantuvo al $103 \pm 3\%$ del basal tras la administración de NMDA (Figura 16).

1.1.2 Pregnanolona

La pregnanolona 100 nM no afectó los niveles basales de GMPc extracelular y redujo ligeramente (de forma no significativa) el aumento de GMPc inducido por NMDA.

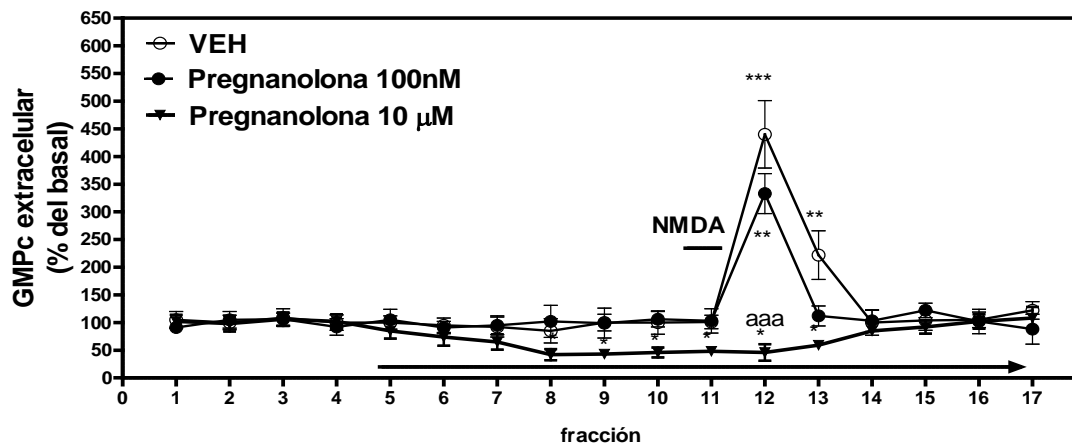


Figura 17: Efectos de pregnanolona sobre los niveles basales de GMPc extracelular y sobre el aumento de GMPc inducido por NMDA en ratas control. Los experimentos se realizaron como en la **Figura 16**. Después de tomar cuatro muestras para determinar los niveles basales de GMPc, se comenzó a administrar pregnanolona (100 nM o 10 μM) o vehículo (VEH). En el periodo de 30 minutos indicado por la barra horizontal, se perfundió NMDA (0,5 mM) para activar la vía Glu-NO-GMPc. Los valores se dan como porcentaje del basal y son la media \pm SEM de siete ratas por grupo. Los valores significativamente diferentes de la concentración basal de GMPc se indican mediante asteriscos, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Los valores significativamente diferentes del vehículo se indican con "a", aaa $p < 0,001$.

La pregnanolona a una concentración 10 μM disminuyó significativamente ($p < 0,05$) los niveles de GMPc extracelular, que se mantuvieron en 42-46% del basal entre las fracciones 8 y 13.

Además, la pregnanolona 10 μ M también abolió completamente el aumento de GMPc inducido por NMDA (Figura 16).

1.1.3 Alopregnanolona-acetato

La alopregnanolona-acetato 100 nM aumentó rápidamente los niveles basales de GMPc ($195 \pm 33\%$, $p < 0,01$) y previno completamente el aumento de GMPc inducido por NMDA (Figura 18).

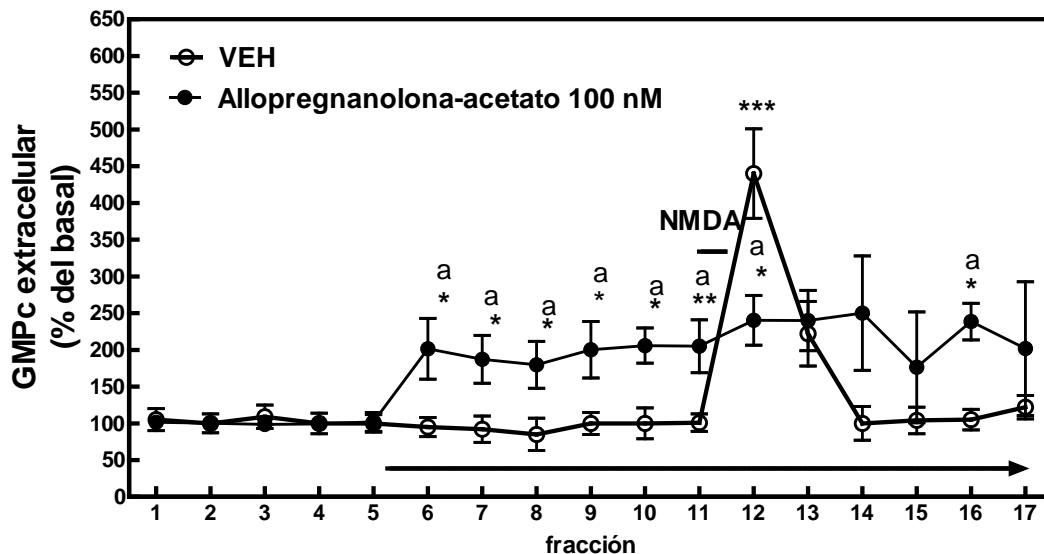


Figura 18: Efectos de alopregnanolona-acetato sobre los niveles basales de GMPc extracelular y sobre el aumento de GMPc inducido por NMDA en ratas control. Los experimentos se realizaron como en la Figura 16. Después de tomar cuatro muestras para determinar los niveles basales de GMPc, se comenzó a administrar alopregnanolona (100 nM) o vehículo (VEH). En el periodo de 30 min indicado por la barra horizontal, se perfundió NMDA (0,5 mM) para activar la vía Glu-NO-GMPc. Los valores se dan como porcentaje del basal y son la media \pm SEM de siete ratas por grupo. Los valores significativamente diferentes de la concentración basal de GMPc se indican mediante asteriscos, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Los valores significativamente diferentes del vehículo se indican con "a", $a p < 0,005$.

1.1.4 Pregnenolona

La administración de pregnenolona a 100 nM o 10 μ M no afectó los niveles extracelulares de GMPc basales ni el aumento de GMPc tras la activación de la vía Glu-NO-GMPc por la administración de NMDA (Figura 19).

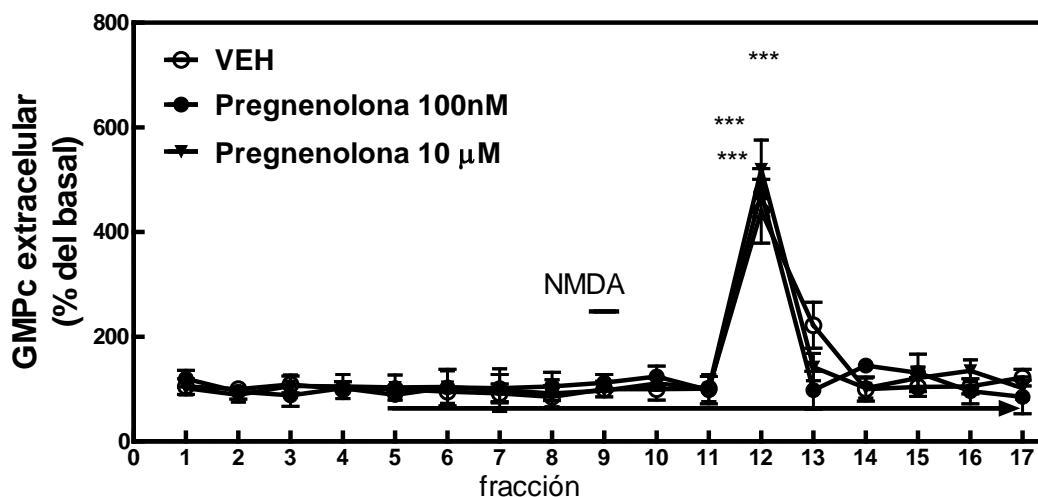


Figura 19: Efectos de la pregnenolona sobre los niveles basales de GMPc extracelular y sobre el aumento de GMPc inducido por NMDA en ratas control. Los experimentos se realizaron como en la Figura 16. Después de tomar cuatro muestras para determinar los niveles basales de GMPc, se comenzó a administrar pregnenolona (100 nM o 10 μM) o vehículo (VEH). En el periodo de 30 minutos indicado por la barra horizontal, se perfundió NMDA (0,5 mM) para activar la vía Glu-NO-GMPc. Los valores se dan como porcentaje del basal y son la media ± SEM de siete ratas por grupo. Los valores significativamente diferentes de la concentración basal de GMPc se indican mediante asteriscos, *** p<0,001.

1.1.5 Sulfato de pregnenolona

El sulfato de pregnenolona 100 nM indujo un aumento de los niveles basales de GMPc extracelular ($141 \pm 16\%$, $p < 0,05$, Figura 20A) y no afectó significativamente el aumento de GMPc inducido por NMDA 0,5 mM.

Dado que el NMDA 0,5 mM ya induce la activación casi máxima de la vía Glu-NO-GMPc, se realizaron experimentos adicionales en los que se administró NMDA 0,2 mM para evaluar si el sulfato de pregnenolona potencia la respuesta a NMDA. El NMDA 0,2 mM aumentó sólo ligeramente los niveles extracelulares de GMPc ($159 \pm 10\%$, $p < 0,05$) pero cuando se administró tras el sulfato pregnenolona 100 nM, el aumento de GMPc extracelular alcanzó el $268 \pm 38\%$ ($p < 0,01$) del basal. Esto indica que el sulfato de pregnenolona

potencia el aumento de GMPc inducido por la activación de los receptores NMDA (Figura 20B).

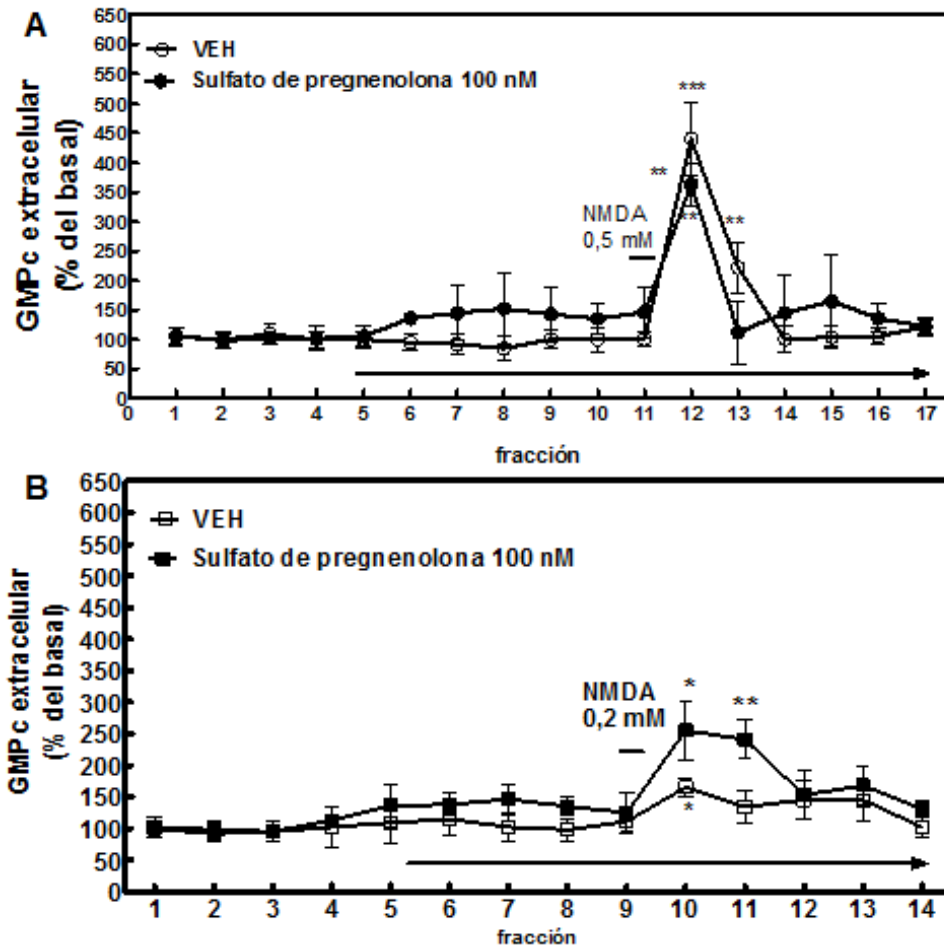


Figura 20: Efectos del sulfato de pregnenolona sobre los niveles basales de GMPc extracelular y sobre el aumento de GMPc inducido por NMDA 0,5 mM (A) y NMDA 0,2 mM (B) en ratas control. Los experimentos se realizaron como en la Figura 16. Después de tomar cuatro muestras para determinar los niveles basales de GMPc, se comenzó a administrar sulfato de pregnenolona (100 nM) o vehículo (VEH). En el periodo de 30 minutos indicado por la barra horizontal, se perfundió NMDA (0,5 ó 0,2 mM respectivamente) para activar la vía Glu-NO-GMPc. Los valores se dan como porcentaje del basal y son la media \pm SEM de siete ratas por grupo. Los valores significativamente diferentes de la concentración basal de GMPc se indican mediante asteriscos; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

1.1.6 DHEAS

La administración de DHEAS 100 nM aumentó ($130 \pm 6\%$, $p < 0,05$) ligeramente los niveles basales de GMPc extracelular e inhibió totalmente el aumento de GMPc extracelular inducido por NMDA, que se mantuvo a $124 \pm 12\%$ del basal (Figura 21).

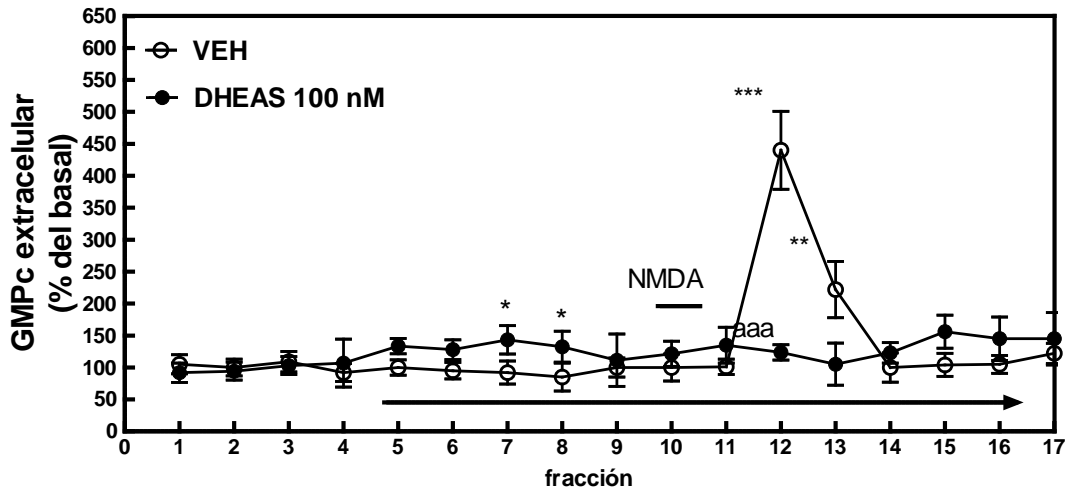


Figura 21: Efectos del DHEAS sobre los niveles basales de GMPc extracelular y sobre el aumento de GMPc inducido por NMDA en ratas control. Los experimentos se realizaron como en la Figura 16. Después de tomar cuatro muestras para determinar los niveles basales de GMPc, se comenzó a administrar DHEAS (100 nM) o vehículo (VEH). En el periodo de 30 minutos indicado por la barra horizontal, se perfundió NMDA (0,5 mM) para activar la vía Glu-NO-GMPc. Los valores se dan como porcentaje del basal y son la media \pm SEM de siete ratas por grupo. Los valores significativamente diferentes de la concentración basal de GMPc se indican mediante asteriscos, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Los valores significativamente diferentes del vehículo se indican con "a", aaa $p < 0,001$.

1.1.7 DTG, agonista de receptores sigma

La administración de DTG 1 μ M produjo un ligero aumento ($153 \pm 9\%$, $p < 0,001$) de los niveles basales de GMPc extracelular y redujo fuertemente ($p < 0,01$) el aumento de GMPc inducido por NMDA (Figura 22). Este efecto es similar al inducido por el DHEAS.

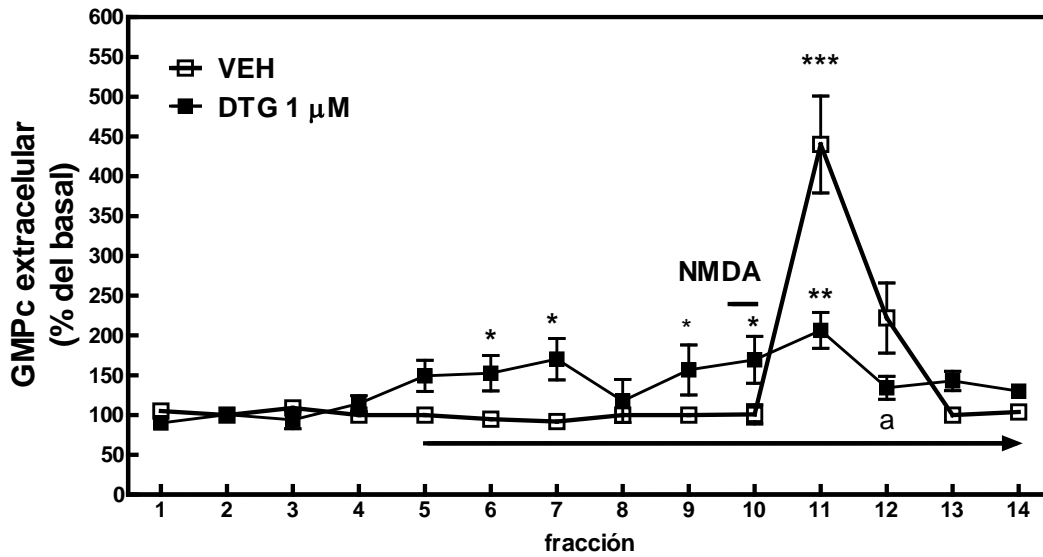


Figura 22: Efectos del DTG sobre los niveles basales de GMPc extracelular y sobre el aumento de GMPc inducido por NMDA. Los experimentos se realizaron como en la Figura 16. Después de tomar cuatro muestras para determinar los niveles basales de GMPc, se comenzó a administrar DTG (100 nM). En el periodo de 30 minutos indicado por la barra horizontal, se perfundió NMDA (0,5 mM) para activar la vía Glu-NO-GMPc. Los valores se dan como porcentaje del basal y son la media \pm SEM de siete ratas por grupo. Los valores significativamente diferentes de la concentración basal de GMPc se indican mediante asteriscos, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Los valores significativamente diferentes del vehículo se indican con "a", $a p < 0,05$.

1.2 Niveles de citrulina

La citrulina se produce, entre otros mecanismos, por la actividad de la óxido nítrico sintasa que transforma la L-arginina en óxido nítrico y citrulina. Por lo tanto, la medida de la concentración de citrulina extracelular podría servir como un indicador de la activación de la óxido nítrico sintasa, uno de los pasos de la vía Glu-NO-GMPc.

La concentración de citrulina se determinó en una alícuota de las mismas muestras empleadas para medir el GMPc en los experimentos presentados en el apartado anterior (Figura 16 a la Figura 22).

Tabla 9: Efectos de los neuroesteroides sobre los niveles de citrulina en ratas controles.

Neuroesteroide		Efecto sobre	
Nombre	Concentración	Citrulina basal (% del control)	Aumento de citrulina tras la adición de NMDA (% del basal)
NMDA 0.5mM			
Vehículo		100±13	291±37*
THDOC	100 nM	91±18	200±28*
	10 µM	106±19	95±8#
Pregnanolona	100 nM	102±18	254±17*
	10 µM	74±12*	119±29a
Pregnenolona	100 nM	91±9	208±24**
	10 µM	112±14	198±26*
Sulfato de pregnenolona	100 nM	180±31*	231±34*
	10 µM	175±27*	265±34*
DHEAS	100 nM	155±19*	135±20a
Alopregnanolona-acetato	100 nM	161±19*	151±13*a
NMDA 0.2mM			
Vehículo		100±16	176±18*
Sulfato de pregnenolona	100 nM	160±10*	229±32*

Los valores basales son la media ± SEM de las cinco fracciones tomadas tras la adición del neuroesteroide, antes de la adición de NMDA. Los valores tras la adición de NMDA son la media ± SEM de las dos fracciones siguientes a la administración del mismo. Los valores significativamente diferentes del basal se indican con asterisco, y los diferentes de las ratas control sin adición del neuroesteroide, con una "a".

Los efectos de los neuroesteroides sobre la concentración extracelular de citrulina fueron esencialmente idénticos a los efectos sobre el GMPc extracelular. Los niveles basales de citrulina extracelular en cerebelo de ratas de control fueron 210 ± 70 µM. Los niveles basales de citrulina no se alteraron por THDOC o pregnenolona, se redujeron ligeramente con pregnanolona (74 ±

12%, $p < 0,05$) y aumentaron con sulfato de pregnenolona ($180 \pm 31\%$, $p < 0,05$), DHEAS ($155 \pm 19\%$, $p < 0,05$) y alopregnanolona-acetato ($161 \pm 19\%$, $p < 0,05$) (Tabla 9).

Los efectos de los neuroesteroides sobre el aumento de citrulina extracelular inducido por NMDA también fueron similares a los observados para el GMPc. El sulfato de pregnenolona y la pregnenolona no afectaron significativamente al aumento de citrulina tras la adición de NMDA. El THDOC, la pregnanolona, la alopregnanolona y el DHEAS abolieron casi completamente el aumento de citrulina extracelular inducido por el NMDA (Tabla 9).

2. EFECTOS DE LA HIPERAMONEMIA SOBRE LA MODULACIÓN DE LA FUNCIÓN DE LA VÍA GLU-NO-GMPc EN CEREBELO POR DISTINTOS NEUROESTEROIDES

Los niveles basales de GMPc extracelular fueron significativamente menores ($p < 0,05$) en cerebelo de ratas hiperamonémicas ($0,40 \pm 0,006$ nM) que en ratas control ($0,65 \pm 0,08$ nM). La administración de NMDA a través de la sonda de microdiálisis activó la vía Glu-NO-GMPc y aumentó el GMPc extracelular. Este aumento fue menor ($p < 0,05$) en las ratas hiperamonémicas ($270 \pm 32\%$ del basal) que en las ratas control ($450 \pm 52\%$ del basal).

La administración de NMDA también aumentó la citrulina extracelular, reflejando la activación de la NOS, en las ratas control ($291 \pm 37\%$ del basal) y en las hiperamonémicas ($189 \pm 14\%$ del basal). El aumento de la citrulina inducido por NMDA también fue menor ($p < 0,05$) en las ratas hiperamonémicas que en las ratas de control.

2.1 Efectos sobre el GMPc extracelular

2.1.1 THDOC

En las ratas hiperamonémicas el THDOC se comportó como en las ratas control, no afectó los niveles basales de GMPc y redujo completamente la activación de la vía por NMDA. La adición de NMDA no indujo ningún aumento de GMPc, que se mantuvo a $90 \pm 13\%$ del basal (Figura 23).

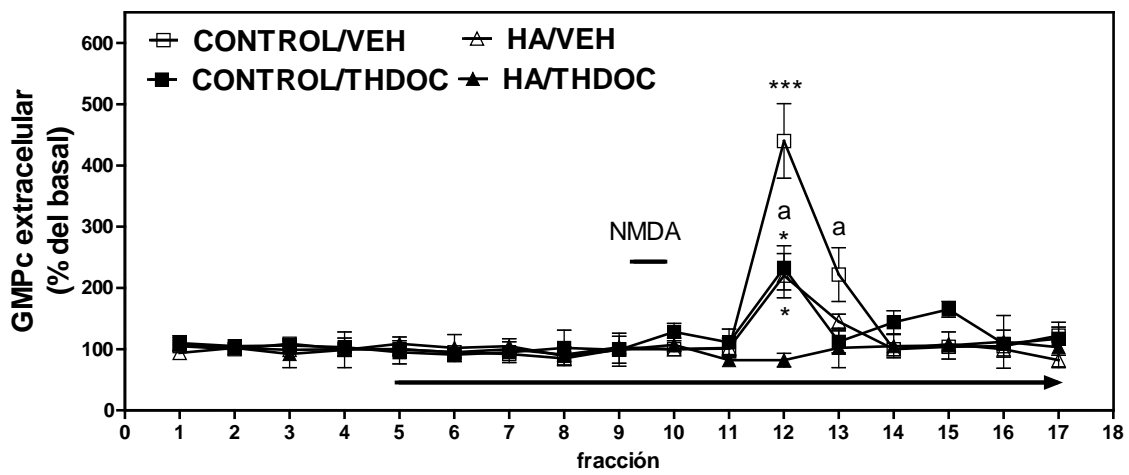


Figura 23: La hiperamonemia no afecta los efectos del THDOC sobre los niveles basales de GMPc extracelular y sobre el aumento de GMPc inducido por NMDA. Los experimentos se realizaron en ratas control e hiperamonémicas (HA) como en la Figura 16. Después de tomar cuatro muestras para determinar los niveles basales de GMPc, se comenzó a administrar THDOC (100 nM) o vehículo (VEH). En el periodo de 30 minutos indicado por la barra horizontal, se perfundió NMDA (0,5 mM) para activar la vía Glu-NO-GMPc. Los valores se dan como porcentaje del basal y son la media \pm SEM de siete ratas por grupo. Los valores significativamente diferentes de las ratas vehículo se indican mediante "a", a $p < 0,05$. Los valores significativamente diferentes del basal se indican con asteriscos, * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$.

2.1.2 Pregnanolona

La hiperamonemia altera los efectos de la pregnanolona, que induce efectos diferentes en ratas hiperamonémicas que en ratas control. No afectó los niveles basales de GMPc en las ratas control y los aumentó ($140 \pm 5\%$ del basal, $p < 0,05$) en las hiperamonémicas. La pregnanolona reduce la activación de la vía tanto en las ratas

control ($255 \pm 38\%$ del basal) como en hiperamonémicas ($139 \pm 9\%$ del basal) (Figura 24).

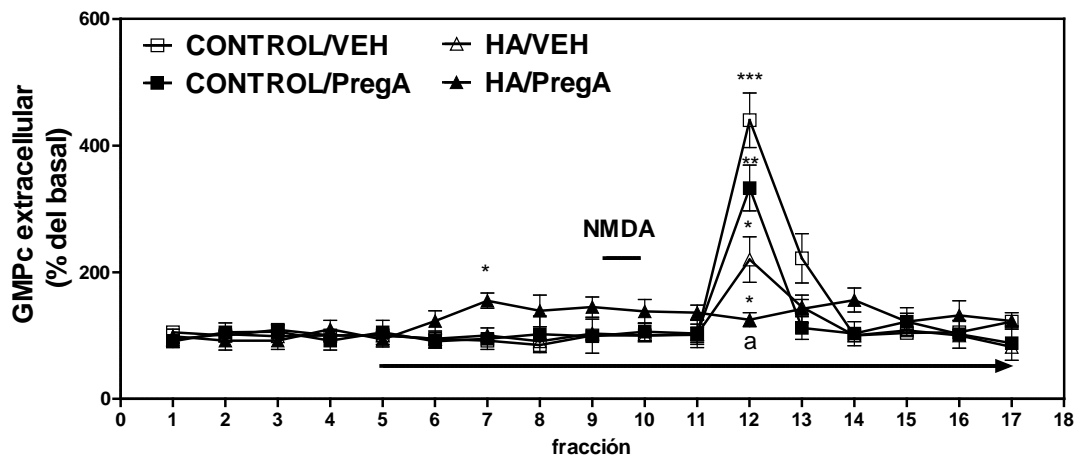


Figura 24: La hiperamonemia afecta los efectos de la pregnanolona (PregA) sobre los niveles basales de GMPc extracelular pero no sobre el aumento de GMPc inducido por NMDA. Los experimentos se realizaron como en Figura 16. Después de tomar cuatro muestras para determinar los niveles basales de GMPc, se comenzó a administrar pregnanolona (100 nM) o vehículo (VEH). En el periodo de 30 minutos indicado por la barra horizontal, se perfundió NMDA (0,5 mM) para activar la vía Glu-NO-GMPc. Los valores se dan como porcentaje del basal y son la media \pm SEM de siete ratas por grupo. Los valores significativamente diferentes de las ratas vehículo se indican mediante "a", a $p < 0,05$. Los valores significativamente diferentes del basal se indican con asteriscos, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

2.1.3 Alopregnanolona-acetato

La hiperamonemia potenció el aumento de los niveles basales de GMPc inducido por alopregnanolona-acetato alcanzando un $322 \pm 39\%$ del basal ($p < 0,001$), significativamente mayor que en las ratas control ($195 \pm 33\%$ del basal, $p < 0,01$). La administración de NMDA en presencia de alopregnanolona, no aumentó el GMPc extracelular ni en las ratas control ni en las hiperamonémicas (Figura 25).

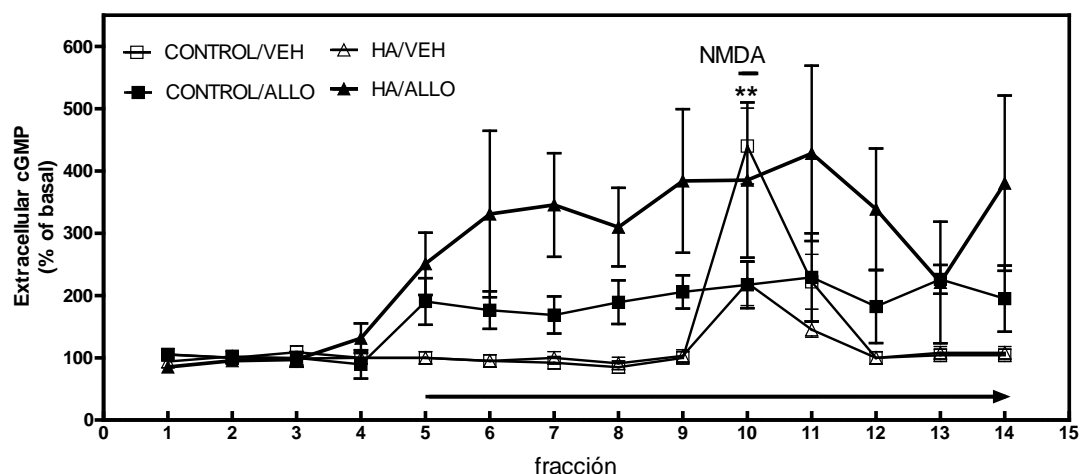


Figura 25: La hiperamonemia potencia los efectos de alopregnanolona-acetato (ALLO) sobre los niveles basales de GMPc extracelular. Los experimentos se realizaron como en la Figura 16. Después de tomar cuatro muestras para determinar los niveles basales de GMPc, se comenzó a administrar alopregnanolona (100 nM) o vehículo (VEH). En el periodo de 30 minutos indicado por la barra horizontal, se perfundió NMDA (0,5 mM) para activar la vía Glu-NO-GMPc. Los valores se dan como porcentaje del basal y son la media \pm SEM de siete ratas por grupo. Los valores significativamente diferentes del basal se indican mediante asteriscos, ** $p < 0,01$.

2.1.4 Pregnenolona

La hiperamonemia altera la modulación de la vía Glu-NO-GMPc por pregnenolona. La hiperamonemia no altera el efecto de la pregnenolona sobre los niveles basales de GMPc. La pregnenolona, que no afectó la activación de la vía por NMDA en ratas control, suprimió completamente la activación de la vía tras la administración NMDA, sin inducir ningún aumento en GMPc extracelular en las ratas hiperamonémicas (Figura 26).

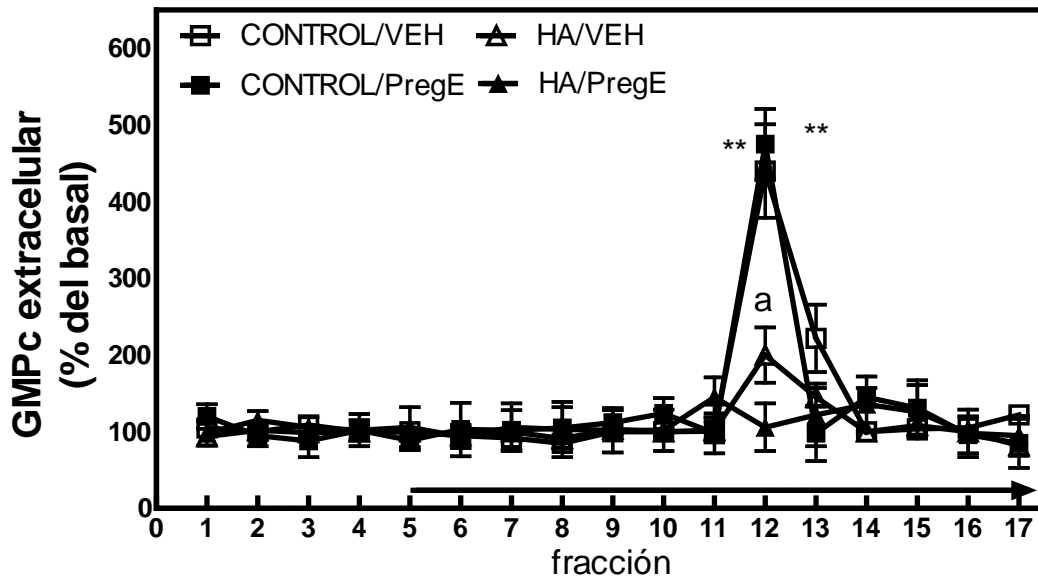


Figura 26: La hiperamonemia no altera los efectos de la pregnenolona (PregE) sobre los niveles basales de GMPc extracelular pero suprime el aumento de GMPc inducido por NMDA. Los experimentos se realizaron como en la Figura 16. Después de tomar cuatro muestras para determinar los niveles basales de GMPc, se comenzó a administrar pregnenolona (100 nM) o vehículo (VEH). En el periodo de 30 minutos indicado por la barra horizontal, se perfundió NMDA (0,5 mM) para activar la vía Glu-NO-GMPc. Los valores se dan como porcentaje del basal y son la media \pm SEM de siete ratas por grupo. Los valores significativamente diferentes de las ratas vehículo se indican mediante "a", a $p < 0,05$. Los valores significativamente diferentes del basal se indican con asteriscos, ** $p < 0,01$.

2.1.5 Sulfato de pregnenolona

La hiperamonemia altera la modulación de la vía Glu-NO-GMPc por sulfato de pregnenolona. El sulfato de pregnenolona, que en ratas control aumentó el GMPc basal extracelular, no los alteró ($104 \pm 12\%$ del basal) en ratas hiperamonémicas. El sulfato de pregnenolona restauró completamente la función de la vía Glu-NO-GMPc en hiperamonemia. La administración de NMDA aumentó el GMPc extracelular a niveles similares a los de las ratas control/vehículo ($398 \pm 35\%$ del basal) (Figura 27).

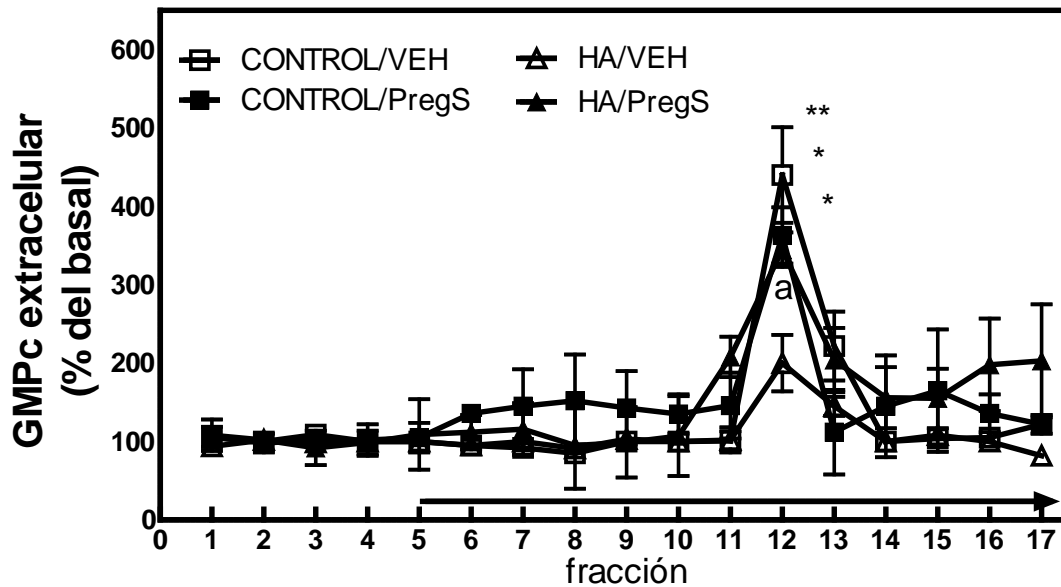


Figura 27: La hiperamonemia afecta los efectos del sulfato de pregnenolona (PregS) sobre los niveles basales de GMPc extracelular y sobre el aumento de GMPc inducido por NMDA. Los experimentos se realizaron como en la Figura 16. Después de tomar cuatro muestras para determinar los niveles basales de GMPc, se comenzó a administrar sulfato de pregnenolona (100 nM) o vehículo (VEH). En el periodo de 30 minutos indicado por la barra horizontal, se perfundió NMDA (0,5 mM) para activar la vía Glu-NO-GMPc. Los valores se dan como porcentaje del basal y son la media \pm SEM de siete ratas por grupo. Los valores significativamente diferentes de las ratas vehículo se indican mediante "a", a $p < 0,05$. Los valores significativamente diferentes del basal se indican con asteriscos, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

2.1.6 DHEAS

La hiperamonemia crónica previene el aumento inducido por DHEAS en los niveles basales de GMPc extracelular ($113 \pm 11\%$) que sí se produce en ratas control ($151 \pm 25\%$ $p < 0,05$). Además, el DHEAS suprimió completamente la activación de la vía por NMDA en ambos grupos (Figura 28).

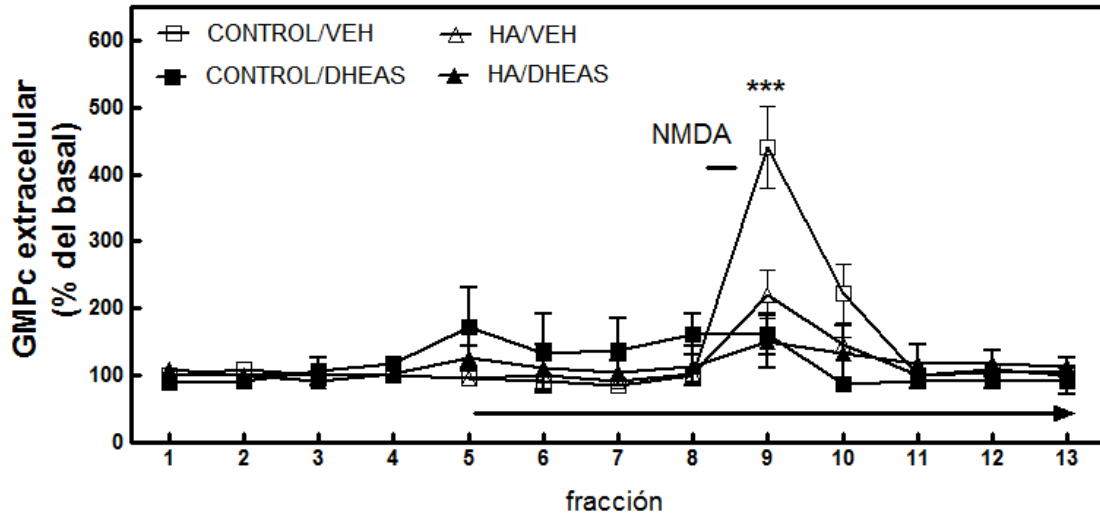


Figura 28: La hiperamonemia afecta los efectos del DHEAS sobre los niveles basales de GMPc extracelular y sobre el aumento de GMPc inducido por NMDA. Los experimentos se realizaron como en la Figura 16. Después de tomar cuatro muestras para determinar los niveles basales de GMPc, se comenzó a administrar DHEAS (100 nM) o vehículo (VEH). En el periodo de 30 minutos indicado por la barra horizontal, se perfundió NMDA (0,5 mM) para activar la vía Glu-NO-GMPc. Los valores se dan como porcentaje del basal y son la media \pm SEM de siete ratas por grupo. Los valores significativamente diferentes del basal se indican con asteriscos, *** $p < 0,001$.

2.1.7 DTG, agonista de los receptores sigma

La hiperamonemia no alteró el comportamiento del DTG sobre la vía del Glu-NO-GMPc, produciéndose los mismos efectos observados en las ratas control (Figura 29). La administración de DTG 1 μ M produjo un aumento ($160 \pm 10\%$, $p < 0,001$) de los niveles basales de GMPc extracelular y redujo fuertemente ($p < 0,01$) la respuesta inducida por NMDA. Este efecto sobre el aumento de GMPc inducido por NMDA es similar al inducido por el DHEAS.

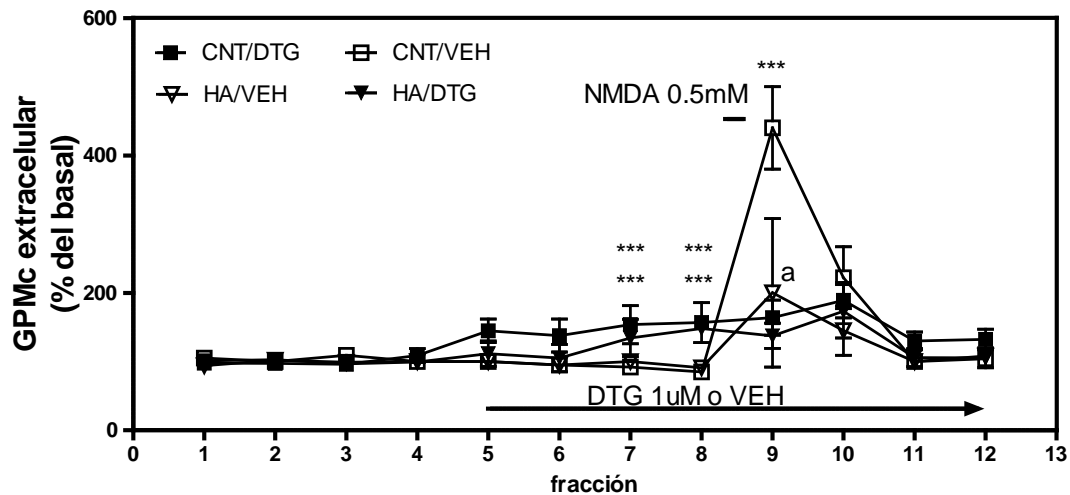


Figura 29: La hiperamonemia no afecta los efectos del DTG sobre los niveles basales de GPMc extracelular ni sobre el aumento de GPMc inducido por NMDA. Los experimentos se realizaron como en la Figura 16. Después de tomar cuatro muestras para determinar los niveles basales de GPMc, se comenzó a administrar DTG (1 μ M) o vehículo (VEH). En el periodo de 30 minutos indicado por la barra horizontal, se perfundió NMDA (0,5 mM) para activar la vía Glu-NO-GMPc. Los valores significativamente diferentes de las ratas vehículo se indican mediante "a", a $p < 0,05$. Los valores significativamente diferentes del basal se indican con asteriscos, *** $p < 0,001$.

2.2 Niveles de citrulina

La hiperamonemia no modificó los efectos sobre los niveles basales de citrulina extracelular (Tabla 10) de THDOC ($91 \pm 18\%$ y $92 \pm 8\%$, control e hiperamonémica respectivamente), pregnanolona ($102 \pm 16\%$ y $111 \pm 14\%$, control e hiperamonémica respectivamente), pregnenolona ($91 \pm 9\%$ y $88 \pm 11\%$ control e hiperamonémica respectivamente) o DHEAS ($106 \pm 13\%$ y $107 \pm 16\%$ control e hiperamonémica respectivamente). La alopregnanolona-acetato aumentó de citrulina basal en las ratas hiperamonémicas ($155 \pm 16\%$, $p < 0,05$) del mismo modo que en las ratas control ($161 \pm 19\%$, $p < 0,05$). El sulfato de pregnenolona no produjo ningún efecto en los niveles basales de citrulina en las ratas hiperamonémicas ($114 \pm 10\%$), mientras que en los controles causa un incremento ($180 \pm 31\%$, $p < 0,05$).

La hiperamonemia crónica abolió los aumentos de citrulina inducido por NMDA en los animales perfundidos con THDOC, alopregnanolona-acetato, pregnanolona, pregnenolona y DHEAS. El sulfato de pregnenolona, alteró la respuesta al NMDA (Tabla 10).

Tabla 10: Efectos de los neuroesteroides sobre los niveles de citrulina en ratas controles e hiperamonémicas.

		Citrulina basal (%del control)	Incremento de citrulina tras la inducción por NMDA (% del basal)
Vehículo	Control	100±13	291±37**
	Hiperamonemia	100±14	189±14 ^a
THDOC 100 nM	Control	91±18	200±28*
	Hiperamonemia	92±8	125±21
Alopregnanolona-acetato 100 nM	Control	161±19*	151±13*
	Hiperamonemia	151±16*	103±15a
Pregnanolona 100 nM	Control	102±16	254±17**
	Hiperamonemia	111±14	108±26 a
Pregnenolona 100 nM	Control	91±9	208±24*
	Hiperamonemia	88±11	126±8 a
Pregnenolona sulphate 100 nM	Control	180±31*	231±34**
	Hiperamonemia	114±10a	204±26**
DHEAS 100 nM	Control	106±13	174±51
	Hiperamonemia	107±164	116±21

Los valores basales corresponden a la media ± SEM de las cinco fracciones en las que se administra en neuroesteroide. Los valores tras la adición de NMDA se refieren a la media ± SEM de las dos fracciones siguientes a la administración del mismo. Las diferencias respecto al basal se expresan con asterisco; * p<0,05; ** p<0,01. Las diferencias respecto al control se expresan con una "a"; a p<0,05.

3. EFECTOS DEL TRATAMIENTO CRÓNICO INTRACEREBRAL CON SULFATO DE PREGNENOLONA SOBRE LA FUNCIÓN COGNITIVA Y MOTORA EN RATAS HIPERAMONÉMICAS. MECANISMOS IMPLICADOS.

Tras el análisis de los resultados de los experimentos de microdiálisis se observó que la administración aguda de sulfato de pregnenolona restaura la función de la vía Glu-NO-GMPc en las ratas hiperamonémicas y, de acuerdo con los estudios anteriores del grupo, esto debería recuperar la capacidad de aprendizaje de una tarea de discriminación condicionada en un laberinto en Y (29). Por esta razón, analizamos los efectos de la administración crónica de sulfato de

pregnenolona sobre la función de dicha vía en cerebelo *in vivo* y sobre la capacidad de aprendizaje de la tarea en el laberinto en Y y sobre la coordinación motora.

3.1 El sulfato de pregnenolona no afecta los niveles de amonio en sangre

Para comprobar que el tratamiento crónico con sulfato de pregnenolona no afectaba los niveles de amonio en sangre, se midió éste a los diez días de iniciar el tratamiento.

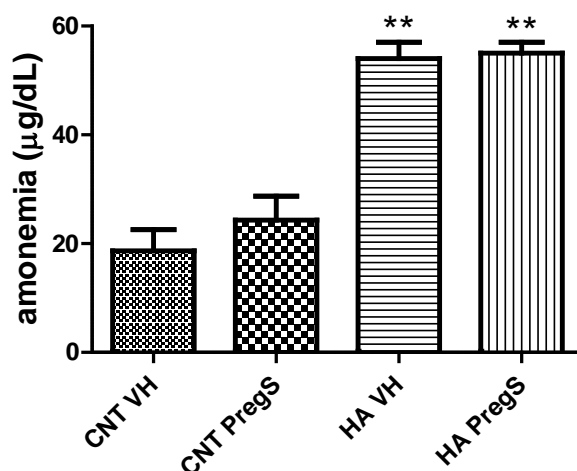


Figura 30: El tratamiento crónico con sulfato de pregnenolona no afecta los niveles de amonio. Se determinaron los niveles de amonio en sangre de ratas controles (CNT) e hiperamonémicas (HA) tratadas con vehículo (VH) o tratamiento con sulfato de pregnenolona (PregS). Los valores se expresan como media \pm SEM de la medida de amonio en sangre de 4 ratas por grupo. Las diferencias respecto al control vehículo (CNT VH) se expresan con asteriscos; ** $p < 0,01$.

Las ratas hiperamonémicas vehículo ($54 \pm 3 \mu\text{g/dL}$) o tratadas con sulfato de pregnenolona ($55 \pm 2 \mu\text{g/dL}$) presentaron niveles superiores de amonio en sangre que las ratas control ($19 \pm 4 \mu\text{g/dL}$ y $24 \pm 4 \mu\text{g/dL}$, control vehículo y tratadas con sulfato de pregnenolona respectivamente).

El tratamiento crónico con sulfato de pregnenolona no afecta los niveles de amonio en las ratas control ni hiperamonémicas.

3.2 Efecto del tratamiento crónico con sulfato de pregnenolona sobre la concentración extracelular de glutamato y GABA en cerebelo

En la Tabla 11 se muestran las concentraciones extracelulares de glutamato y GABA en cerebelo.

Tabla 11: Niveles basales extracelulares de glutamato y GABA en ratas controles (CNT) e hiperamonémicas (HA) tratadas con vehículo (VH) o con sulfato de pregnenolona (PregS).

	Glutamato (μM)	GABA (nM)
Control Vehículo	0,23 \pm 0,03	18,1 \pm 4,6
Control PregS	0,26 \pm 0,05	12,2 \pm 2,9
HA Vehículo	0,29 \pm 0,06	44,8 \pm 13,3*
HA PregS	0,23 \pm 0,04	21,8 \pm 3,6a

Los valores se expresan como media \pm SEM de las fracciones basales de un total de seis ratas por grupo. Las diferencias respecto al control vehículo (CNT VH) se expresan con asteriscos; * $p < 0,05$.

La hiperamonemia crónica aumentó en los niveles basales de GABA ($p < 0,005$) sin afectar a los de glutamato. La administración crónica de sulfato de pregnenolona restauró ($p < 0,005$) los niveles normales de GABA en las ratas hiperamonémicas sin producir ningún cambio en las ratas control (Figura 31).

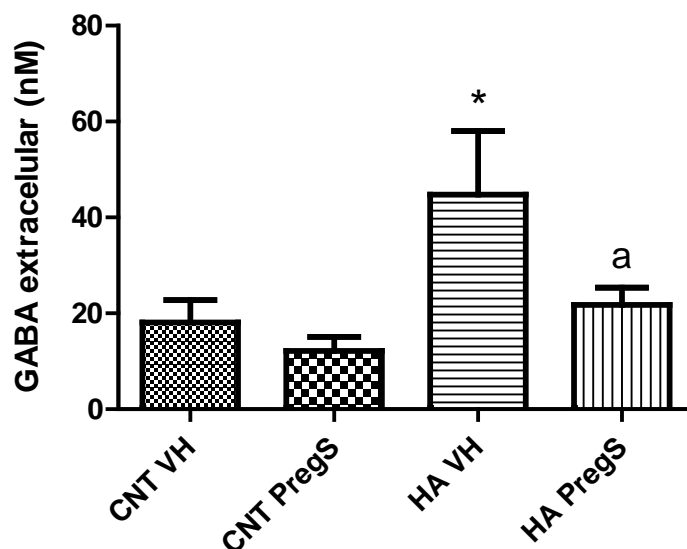


Figura 31: El tratamiento crónico con sulfato de pregnenolona normaliza los niveles basales extracelulares GABA en ratas hiperamonémicas (HA). Las sondas de microdiálisis se insertaron en el cerebelo, se perfundió a 3 μ l/min y se tomaron muestras cada 30 minutos. Los valores son la media \pm SEM de las cinco primeras muestras de seis ratas por grupo. Los valores significativamente diferentes de la concentración de los aminoácidos en las ratas control vehículo se indican mediante asteriscos, * $p < 0,05$. Los valores significativamente diferentes de las hiperamonémicas vehículo se indican con "a", a $p < 0,05$.

3.3 El tratamiento crónico con sulfato de pregnenolona restaura la coordinación motora en ratas hiperamonémicas

Para evaluar la coordinación motora realizamos el test del beam-walking cuando las ratas llevaban entre 17 y 21 días de tratamiento con sulfato de pregnenolona.

La coordinación motora de las ratas hiperamonémicas ($1,04 \pm 0,21$ resbalones) fue peor ($p < 0,05$) que la de las ratas control ($0,50 \pm 0,15$ resbalones). El tratamiento con sulfato de pregnenolona restauró la coordinación motora en las ratas hiperamonémicas ($0,46 \pm 0,12$ resbalones) sin afectar a las control ($0,64 \pm 0,17$ resbalones).

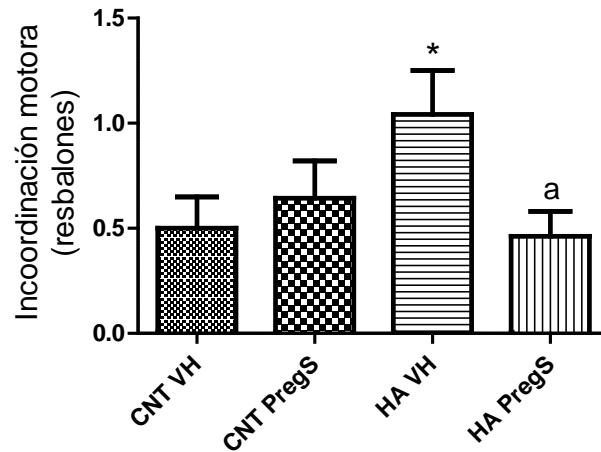


Figura 32: El tratamiento crónico con sulfato de pregnenolona restaura la coordinación motora en ratas hiperamonémicas. Los valores se presentan como media \pm SEM del número de resbalones al atravesar el listón de madera de trece ratas por grupo. Las diferencias respecto al control vehículo (CNT VH) se expresan con asteriscos, * $p < 0,05$. Las diferencias respecto a las hiperamonémicas vehículo (HA VH) se expresan con "a"; $a p < 0,05$.

Dado que el tono GABAérgico en cerebelo tiene un papel importante en la coordinación motora, se analizó la correlación entre los niveles basales de GABA extracelular y los resultados del test del beam-walking. Como se muestra en la Figura 33, existe una correlación significativa ($p < 0,001$; $r = 0,8801$) entre los niveles de GABA extracelular y la incoordinación motora.

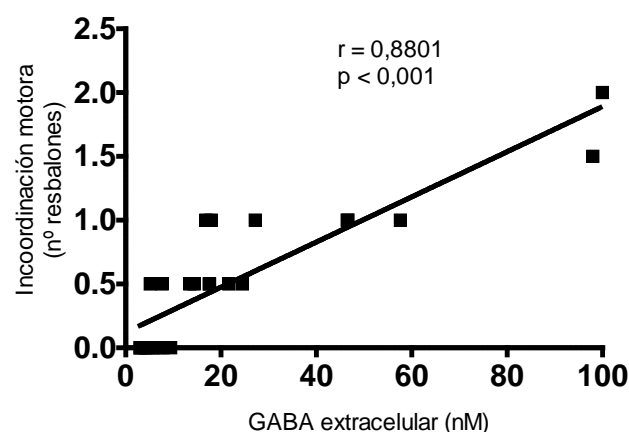


Figura 33: Existe una correlación significativa entre los niveles de GABA extracelular y la incoordinación motora. Cada punto representa los niveles de GABA extracelular y el número de resbalones de cada rata individual.

3.4 Efectos del tratamiento crónico con sulfato de pregnenolona sobre la actividad motora

Los ensayos para evaluar la actividad motora se llevaron a cabo tras una semana de iniciar el tratamiento con sulfato de pregnenolona y tras tres semanas.

Como podemos ver en las Figura 34 y Figura 35, no existen diferencias en la actividad motora en 60 minutos entre las ratas control vehículo e hiperamonémicas vehículo. El tratamiento durante una semana con sulfato de pregnenolona disminuye ($p < 0,05$) la velocidad media de las ratas control e hiperamonémicas (Figura 34C) así como la distancia recorrida ($p < 0,05$) por las ratas control (Figura 35D). El sulfato de pregnenolona no afecta los movimientos ambulatorios ni los verticales.

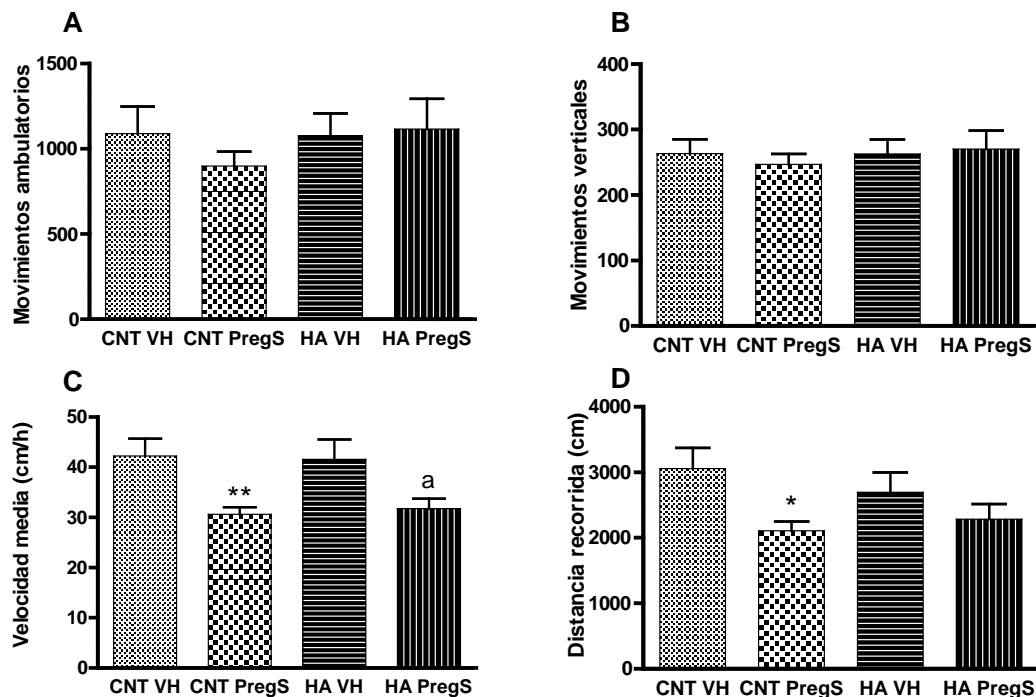


Figura 34: Efectos del tratamiento con sulfato de pregnenolona (PregS) durante una semana sobre la actividad motora en una hora. Los valores son la media \pm SEM de catorce ratas por grupo. Las diferencias respecto al control vehículo (CNT VH) se expresan con asteriscos, * $p < 0,05$. Las diferencias respecto a las hiperamonémicas vehículo (HA VH) se expresan con una "a", a $p < 0,05$.

A las tres semanas de tratamiento con sulfato de pregnenolona desaparece la disminución de velocidad inducida por el sulfato de pregnenolona a una semana, llegando a aumentarla significativamente en las ratas hiperamonémicas respecto a las ratas control vehículo (Figura 35C).

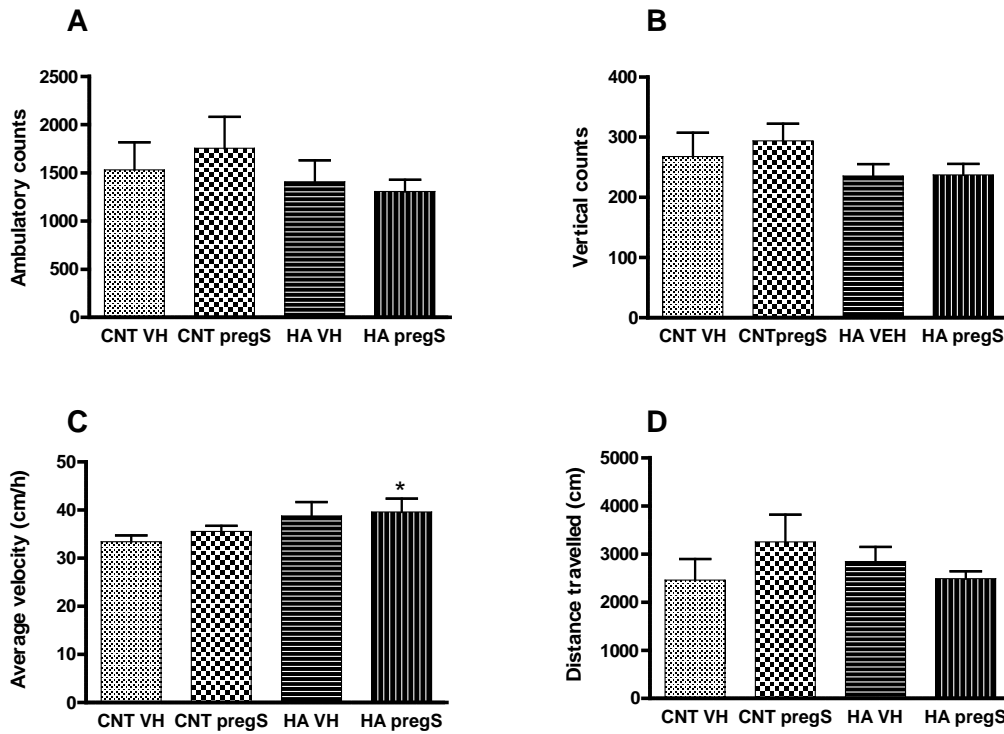


Figura 35: Efectos del tratamiento con sulfato de pregnenolona (PregS) durante tres semanas sobre la actividad motora de 1 hora. Los valores son la media \pm SEM de nueve ratas por grupo. Las diferencias respecto al control vehículo (CNT VH) se expresan con asteriscos, * $p < 0,05$.

3.5 El sulfato de pregnenolona aumenta los niveles basales de GMPc y recupera la función de la vía Glu-NO-GMPc en ratas hiperamonémicas

Las ratas hiperamonémicas vehículo presentaron niveles basales de GMPc más bajos ($0,42 \pm 0,06$ nM, $p < 0,001$) que las control vehículo ($0,83 \pm 0,08$ nM). El tratamiento crónico con sulfato de pregnenolona aumentó de los niveles basales de GMPc tanto en las ratas control ($1,34 \pm 0,24$ nM) como en las hiperamonémicas ($2,11$

$\pm 0,25$ nM). El aumento fue mucho mayor en las ratas hiperamonémicas (502%) que en las control (161%).

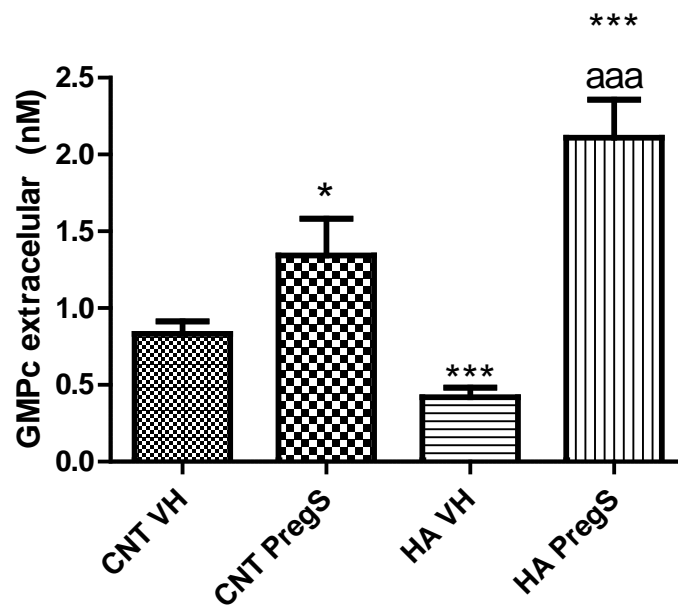


Figura 36: El tratamiento crónico con sulfato de pregnenolona (PregS) aumenta los niveles basales de GMPc de ratas controles (CNT) e hiperamonémicas (HA). Los valores se expresan como media \pm SEM de las fracciones basales de un total de 6 ratas por grupo. Las diferencias respecto al control vehículo (CNT VH) se expresan con asteriscos; * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$. Las diferencias respecto a las hiperamonémicas vehículo (HA VH) se expresan con "a"; aaa $p < ,001$.

La administración de NMDA a través de la sonda de microdiálisis activó la vía y aumentó ($p < 0,001$) el GMPc extracelular en todos los grupos experimentales ($282 \pm 44\%$, $261 \pm 40\%$ y 235 ± 64 ; control vehículo, control con sulfato de pregnenolona e hiperamonémicas con sulfato de pregnenolona respectivamente) excepto en las hiperamonémicas vehículo ($123 \pm 12\%$). El tratamiento con sulfato de pregnenolona en ratas hiperamonémicas recuperó ($p < 0,001$) totalmente la función de la vía Glu-NO-GMPc (Figura 37).

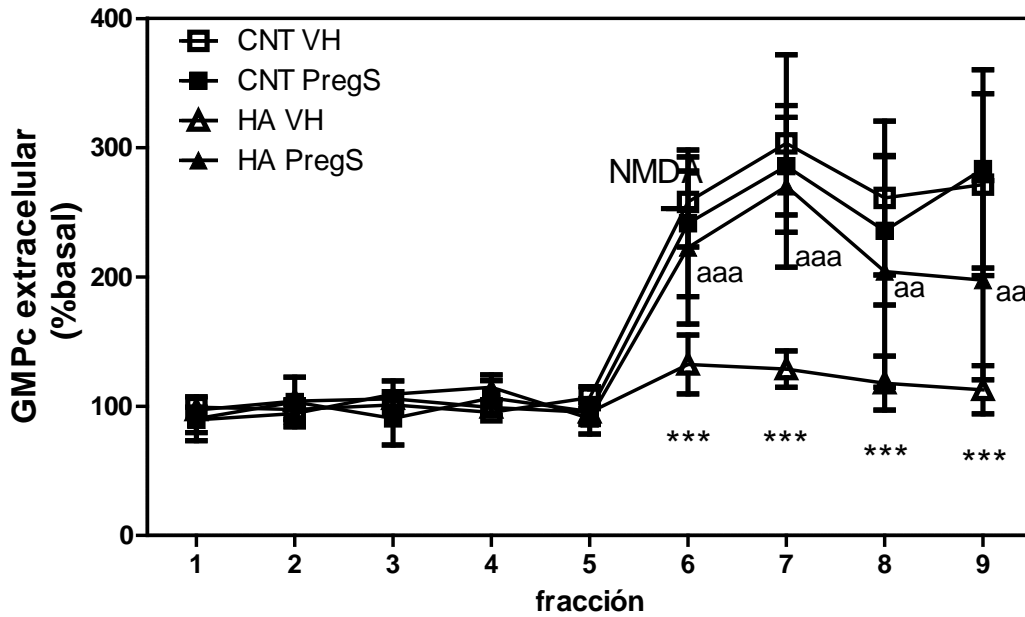


Figura 37: El tratamiento crónico con sulfato de pregnenolona (PregS) restaura la función de la vía Glu-NO-GMPc en ratas hiperamonémicas. Las sondas de microdiálisis se insertaron en el cerebelo, se perfundió a 3 μ l/min y se tomaron muestras cada 30 minutos. Después de tomar cinco muestras para determinar los niveles basales de GMPc, se administró durante el periodo de 30 min indicado por la barra horizontal NMDA (0,5 mM) para activar la vía Glu-NO-GMPc. Los valores se dan como porcentaje del basal (media de las cinco primeras fracciones) y son la media \pm SEM de seis ratas por grupo. Los valores significativamente diferentes de las ratas control se indican mediante asteriscos, *** $p < 0,001$. Los valores significativamente diferentes del vehículo se indican con "a", aaa $p < 0,001$

3.6 El tratamiento crónico con sulfato de pregnenolona restaura la capacidad de aprendizaje de una tarea de discriminación condicionada en ratas hiperamonémicas.

Las ratas hiperamonémicas vehículo necesitaron un mayor número de ensayos (69 ± 7 ensayos, $p < 0,05$) para aprender la tarea que las ratas control vehículo (48 ± 4 ensayos). La administración crónica de sulfato de pregnenolona restauró la capacidad de aprendizaje de las ratas hiperamonémicas (50 ± 6 ensayos) sin afectar a los controles (53 ± 4 ensayos) (Figura 38).

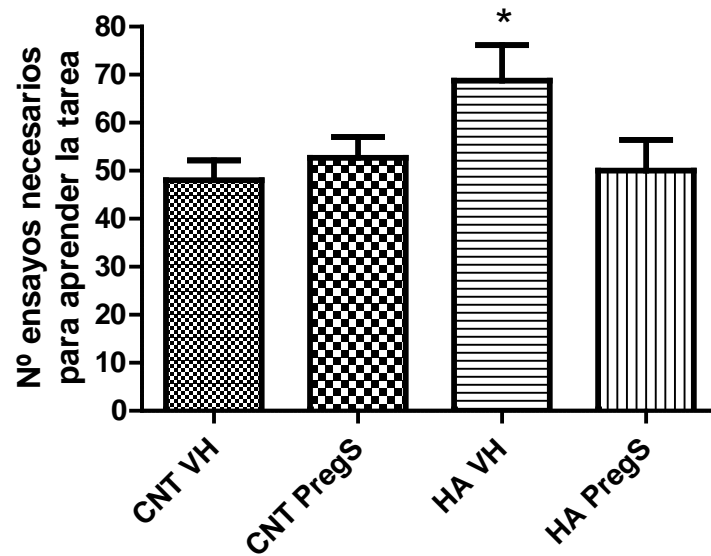


Figura 38: El tratamiento crónico con sulfato de pregnenolona (PregS) restaura la capacidad de aprendizaje de una tarea de discriminación condicionada en ratas hiperamonémicas. Los valores son la media \pm SEM del número de ensayos necesarios para completar el aprendizaje del test de 10 ratas por grupo. Las diferencias respecto al control vehículo (CNT VH) se expresan con asteriscos, * $p < 0,05$.

V. DISCUSIÓN

1. MODULACIÓN DE LA VÍA GLU-NO-GMPc POR DISTINTOS NEUROESTEROIDES EN RATAS CONTROL.

La mayoría de los neuroesteroides (THDOC, alopregnanolona-acetato, sulfato de pregnenolona, DHEAS) alteran la función de la vía Glu-NO-GMPc cuando se administran a una concentración 100 nM a través de la sonda de microdiálisis.

El transporte de neuroesteroides a través de las membranas de las sondas es limitado. Las recuperaciones de sulfato de pregnenolona y alopregnanolona-acetato través de la sonda de microdiálisis son del 13% y 9% respectivamente, lo que indica que la concentración real a la que los neuroesteroides actúan sobre los receptores NMDA o GABA en nuestros experimentos sería de alrededor de 9-15 nM, que se encuentra en el rango fisiológico (74).

La ruta de acceso de los neuroesteroides a los receptores GABA es compleja. Se ha descrito que sólo los neuroesteroides que quedan retenidos en las membranas pueden modular al receptor (172). Esto sugiere que sólo los neuroesteroides incorporados a las membranas y su difusión lateral, pero no los niveles tisulares o extracelulares, serían relevantes en la modulación de los receptores GABA_A.

La respuesta a la administración neuroesteroides es muy rápida apoyando que los neuroesteroides, a concentraciones fisiológicas, pueden modular rápidamente la función de la vía Glu-NO-GMPc, los niveles de GMPc y, por tanto, las funciones cerebrales moduladas por esta vía, como algunos tipos de memoria y aprendizaje, incluyendo la tarea de discriminación condicionada en el laberinto en Y estudiada en esta tesis.

Tabla 12: Resumen de los efectos de los neuroesteroides sobre los niveles de GMPc y citrulina. Posibles mecanismos implicados.

Neuroesteroide		Efecto sobre						
Nombre	C	GMPc basal	Aumento de GMPc inducido por NMDA	Citrulina basal	Aumento de citrulina inducido por NMDA	De acuerdo con la literatura		Posible mecanismo deducido de los resultados de esta tesis
						Función sobre el receptor GABA _A	Función sobre el receptor NMDA	
THDOC	100 nM	Sin efecto	↓ ~50%	Sin efecto	↓ ~30%	↑	Sin efecto	Agonista del receptor GABA _A
	10 μM	Sin efecto	↓100%	Sin efecto	↓ 100%	↑		
Pregnanolona	100 nM	Sin efecto	↓ ~20%, NS	Sin efecto	↓ ~20%, NS	↑		Agonista del receptor GABA _A
	10 μM	↓ ~60%	↓ 100%	↓ ~26%	↓ 100%	↑		
Pregnenolona	100 nM	Sin efecto	Sin efecto	Sin efecto	Sin efecto	Sin efecto o ↓		Sin efecto
	10 μM	Sin efecto	Sin efecto	Sin efecto	Sin efecto	Sin efecto o ↓		
Sulfato de pregnenolona	100 nM	↑ ~40%	↑ ~69%	↑ ~80%	↑ ~43%	↓	↑	Agonista del receptor NMDA
	10 μM	↑ ~60%	—	↑ ~80%	—	↓	↑	
DHEAS	100 nM	↑ ~30%	↓ 100%	↑ ~50%	↓ 80%	↓	↑	Agonista del receptor sigma → antagonista del receptor NMDA
Alopregnanolona-acetato	100 nM	↑ ~100%	↓100%	↑ ~60%	↓ 100%	↑	—	Antagonista del receptor NMDA

C: Concentración NS: No significativo

↓= Disminución ↑=Aumento

Cada neuroesteroide afecta la concentración basal de GMPc extracelular de modo diferente. La pregnanolona, a altas concentraciones pero no a bajas, redujo los niveles extracelulares de GMPc. En contraste, la alopregnanolona-acetato, el sulfato de pregnenolona y el DHEAS aumentaron el GMPc extracelular. El THDOC y la pregnenolona no afectaron la concentración basal de GMPc extracelular (Tabla 12).

Los efectos de diferentes neuroesteroides sobre el aumento de GMPc extracelular inducido por NMDA son también diversos. El sulfato de pregnenolona aumentó la liberación de GMPc tras la activación de la vía Glu-NO-GMPc por NMDA. El THDOC, la pregnanolona, la alopregnanolona-acetato y el DHEAS abolieron casi completamente el aumento de GMPc extracelular inducido por NMDA, mientras que la pregnenolona no lo afectó de manera significativa.

Los efectos de los neuroesteroides sobre el GMPc extracelular, tanto basal como tras la activación de la vía Glu-NO-GMPc por NMDA, pueden explicarse por sus acciones sobre los receptores sigma, GABA o NMDA. Los posibles mecanismos de acción de los neuroesteroides que se deducen de esta tesis se resumen en la Tabla 12 y en la Figura 39.

La pregnanolona potencia la activación de los receptores GABA_A, comportándose como un agonista de estos receptores. Esto está de acuerdo con los efectos descritos en la literatura en otros sistemas experimentales (161, 163). Los efectos de la pregnanolona son similares a los del muscimol, agonista típico de los receptores GABA_A, que también reduce el GMPc basal y el aumento inducido por NMDA en cerebelo cuando se administra a través de la sonda de microdiálisis a concentraciones altas (10 µM), pero no a bajas (2 µM) (74). La potencia de la pregnanolona para reducir el GMPc extracelular es similar a la del muscimol.

La modulación de la vía Glu-NO-GMPc por el receptor GABA_A ha sido estudiada por Fedele y cols. (96). Demostraron que la

administración de muscimol en cerebelo a través de la sonda de microdiálisis previene el aumento de GMPc inducido por NMDA. Este efecto inhibitor del muscimol se previene por la administración previa de bicuculina (antagonista de los receptores GABA_A) confirmando que está mediado por la activación del receptor GABA_A.

Nuestro grupo también demostró que la administración de bicuculina a través de la sonda de microdiálisis en ratas hiperamonémicas restaura la función de la vía Glu-NO-GMPc al contrarrestar el aumento del tono GABAérgico en cerebelo inducido por la hiperamonemia crónica (74).

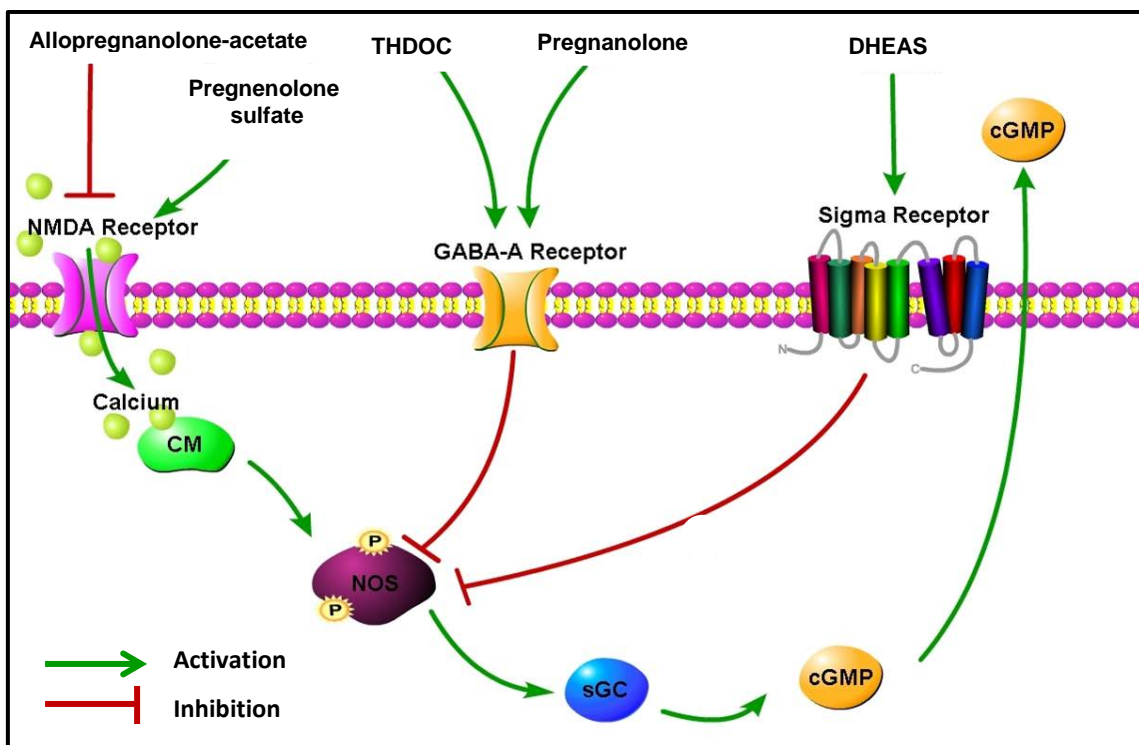


Figura 39: Efectos de los diferentes neuroesteroides sobre los receptores NMDA, sigma y GABA_A y sobre la vía Glu-NO-GMPc en ratas control.

El THDOC también potencia la activación de los receptores GABA_A, comportándose como un agonista de estos receptores (173). Sin embargo, la potencia de THDOC es inferior a la de la pregnanolona y el muscimol. El THDOC no reduce el GMPc extracelular basal pero reduce drásticamente su aumento tras la activación de la vía por NMDA. Estos efectos son idénticos a los

inducidos por muscimol 2 μ M en ratas hiperamonémicas (74), lo que sugiere que el THDOC actúa como un agonista del receptor GABA_A.

Los efectos de THDOC y de pregnanolona sobre la activación de la NOS inducida por NMDA (reflejada en el aumento de la citrulina extracelular) son similares a los observados en la liberación de GMPc al medio extracelular inducida por NMDA. Esto sugiere que la inhibición de la vía Glu-NO-GMPc por THDOC o pregnanolona es debida a una reducción de la activación de la NOS en respuesta a la activación del receptor NMDA (174).

La pregnenolona no afecta la concentración de GMPc basal ni el aumento de GMPc extracelular inducido por NMDA. Esto sugiere que, en las condiciones utilizadas, la pregnenolona no afecta la función del receptor GABA_A en el cerebelo. Esto está de acuerdo con algunos autores que indican que la pregnenolona está desprovista de actividad GABAérgica (175). Sin embargo, otros autores basándose en mediciones indirectas, postulan que actúa como un antagonista de los receptores GABA_A (176). En este ensayo clínico realizado en humanos se concluyó que la administración crónica de pregnenolona antagoniza ciertos efectos agudos de las benzodiazepinas (reduce significativamente la sedación sin afectar los efectos amnésicos o la ansiedad) comportándose como antagonista o agonista inverso de los receptores GABA_A.

El sulfato de pregnenolona potencia la respuesta a la activación de los receptores NMDA. Wu y cols. demostraron que este neuroesteroide modula positivamente el receptor NMDA en neuronas de médula espinal (177). Esto explicaría el aumento de GMPc extracelular inducido por el sulfato de pregnenolona. Al potenciar la activación de los receptores NMDA por el glutamato extracelular endógeno, aumentaría la función de la vía Glu-NO-GMPc y los niveles de GMPc en condiciones basales.

El sulfato de pregnenolona también potencia el aumento de GMPc inducido por NMDA 0,2 mM, pero no por NMDA 0,5 mM, lo cual

refuerza la idea de que actúa aumentando la activación los receptores NMDA. En los experimentos realizados en ratas control en nuestro grupo, la administración de NMDA 0,5 mM induce la máxima activación posible de la vía Glu-NO-GMPc (44). Esto explica la falta de efecto del sulfato de pregnenolona sobre el aumento de GMPc inducido por NMDA 0,5 mM que, al ser máximo, ya no puede ser potenciado por el sulfato de pregnenolona.

La alopregnanolona-acetato aumenta los niveles basales de GMPc extracelular y suprime completamente el aumento inducido por NMDA. Estos efectos son idénticos a los inducidos por MK-801, un antagonista de los receptores NMDA, que también aumenta los niveles basales de GMPc y previene el aumento de GMPc inducido por NMDA (53). Esto sugiere que, en las condiciones utilizadas, el aumento de GMPc basal y la disminución de la respuesta inducida por NMDA son consecuencia del bloqueo de los receptores NMDA por alopregnanolona-acetato, la cual actuaría como un antagonista de los mismos en el cerebelo *in vivo*. Parece poco probable que los efectos de alopregnanolona-acetato puedan estar mediados por un efecto sobre los receptores GABA_A. La potenciación de la activación de receptores GABA_A por muscimol conduce a una reducción de GMPc basal (74). Una reducción similar del GMPc basal a la obtenida por el muscimol (o al menos ningún efecto, pero no un aumento) sería lo que se esperaría si la alopregnanolona-acetato actuara potenciando la activación de los receptores GABA_A. El bloqueo de los receptores GABA_A con bicuculina aumenta el GMPc basal, pero no previene el aumento de GMPc inducido por NMDA (74). Por lo tanto, incluso una hipotética reducción de la activación de receptores GABA_A no explicaría los efectos de alopregnanolona-acetato. Aunque los datos actuales no son suficientes para concluir que la alopregnanolona-acetato sea un antagonista directo de los receptores NMDA, parece que en el cerebelo *in vivo* ejerce este efecto directamente o indirectamente.

En la mayoría de las áreas del cerebro, el DHEAS aumenta la respuesta a la activación de los receptores NMDA (178, 179). Se ha propuesto que este aumento está mediado por la activación de receptores sigma. Por ejemplo, Maurice y cols. (1997) mostraron que la administración de DHEAS atenúa el deterioro del aprendizaje en ratones tratados con dizocilpina (antagonista no competitivo del receptor NMDA) en cerebelo y que este efecto está mediado por los receptores sigma₁ (178).

Aunque en otras áreas cerebrales la activación de receptores sigma potencia la activación del receptor NMDA (178, 179), en el cerebelo la activación de estos receptores sigma reduce la activación de los receptores de NMDA. Rao y cols. demostraron que la administración parenteral de opipramol (potente ligando del receptor sigma) a ratones previene el aumento de GMPc inducido por la administración local de D-serina (co-agonista del receptor NMDA) (180).

Estos datos indican que la activación del receptor NMDA se modula negativamente por agonistas de receptores sigma en cerebelo. Esto explicaría los efectos del DHEAS observados en esta tesis. Los efectos del DHEAS en el cerebelo son similares a los del MK-801 (antagonista de los receptores NMDA) y la alopregnanolona-acetato: aumento de los niveles basales de GMPc y abolición completa de la respuesta inducida por NMDA.

El DHEAS actuaría como un agonista del receptor sigma conduciendo a una disminución de la activación de los receptores NMDA en cerebelo. Esto se confirma en los experimentos realizados con DTG, un agonista de los receptores sigma que afecta la función de la vía Glu-NO-GMPc del mismo modo que el DHEAS, como se muestra en la Figura 22.

Los resultados presentados muestran que diferentes neuroesteroides pueden modular rápidamente y a concentraciones fisiológicas la función de la vía Glu-NO-GMPc, la actividad de la NOS y

la concentración extracelular de GMPc en el cerebelo, aunque cada neuroesteroide lo hace por mecanismos diferentes, actuando sobre diferentes receptores y produciendo efectos distintos.

Todos los neuroesteroides se sintetizan a partir del colesterol por las vías descritas en la Introducción (Figura 12). Pequeños cambios en la regulación de algún paso de la síntesis pueden alterar los niveles cerebrales de algunos neuroesteroides. Los resultados indican que cambios en el patrón de neuroesteroides se traducirían en cambios rápidos en la modulación de la neurotransmisión inhibitoria (receptores GABA_A) y excitatoria (receptores NMDA), modificando la función de vías de transducción de señales asociadas a dichos receptores, incluida la vía Glu-NO-GMPc. Esto permite que los neuroesteroides puedan modular rápidamente el equilibrio entre la neurotransmisión excitatoria e inhibitoria.

El hecho de que diferentes neuroesteroides puedan modular de distintas formas la función de la vía Glu-NO-GMPc y los niveles de GMPc extracelular sugiere que estos neuroesteroides también pueden modular los procesos cerebrales regulados por esta vía, como por ejemplo, ciertos tipos de aprendizaje y de memoria (130, 131).

El metabolismo y los niveles de neuroesteroides en cerebro se alteran en diversas situaciones patológicas como en las enfermedades de Alzheimer (181) o de Parkinson (182) y, como se resume en el apartado siguiente, en encefalopatía hepática e hiperamonemia (183) (74). Los déficits neurocognitivos en la esquizofrenia se han asociado con alteraciones en los niveles sanguíneos de neuroesteroides (184).

Las alteraciones en los niveles de neuroesteroides, y/o en sus efectos sobre la neurotransmisión y la vía Glu-NO—GMPc pueden contribuir al deterioro cognitivo y motor en estas situaciones patológicas, incluyendo la hiperamonemia y la encefalopatía hepática crónicas, y posiblemente en otras.

Entender la modulación de la vía Glu-NO-GMPc por neuroesteroides nos ha permitido diseñar y ensayar un tratamiento

para restaurar la función de la vía y la función cognitiva en ratas con hiperamonemia crónica, como se discute más adelante. Aproximaciones terapéuticas similares podrían ser útiles en encefalopatía hepática y, posiblemente, en otras situaciones patológicas.

2. EFECTOS DE LA HIPERAMONEMIA SOBRE LA MODULACIÓN POR NEUROESTEROIDES DE LA FUNCIÓN DE LA VÍA GLU-NO-GMPC

La hiperamonemia es un contribuyente esencial en la patogénesis de las alteraciones neurológicas en pacientes con cirrosis y encefalopatía hepática. Ahboucha y cols. analizaron el contenido de algunos neuroesteroides en cerebros de pacientes fallecidos por coma hepático. Los niveles de alopregnanolona en cerebro de estos pacientes estaban aumentados respecto a los controles y a los cirróticos sin encefalopatía hepática. La concentración de la pregnenolona también estaba aumentada, mientras que los niveles de THDOC estaban por debajo de los niveles de detección en todos los grupos (165). El aumento de los niveles de neuroesteroides puede contribuir a las alteraciones en la neurotransmisión y en la función cognitiva.

Nuestro grupo ha comprobado que la hiperamonemia crónica *per se* altera los niveles de neuroesteroides en distintas áreas cerebrales en rata (74).

Las alteraciones en los niveles de neuroesteroides son diferentes en distintas áreas cerebrales. Como podemos ver en la Tabla 13, en ratas con hiperamonemia crónica hay un aumento en la alopregnanolona-acetato y el THDOC en la corteza cerebral, mientras que la pregnenolona o la progesterona no se alteran. En cerebelo en cambio, el THDOC y la pregnenolona aumentan en las ratas hiperamonémicas, mientras que la alopregnanolona-acetato o la

progesterona no se modifican (74). El neuroesteroide más afectado en hiperamonemia es la pregnanolona, cuya concentración se duplica en cerebelo y aumenta cinco veces en corteza (74).

Tabla 13: Niveles de neuroesteroides en cerebelo y corteza de ratas control e hiperamonémicas.

	Cerebelo		Corteza	
	Ratas control (pmol/g)	Ratas hiperamonémicas (pmol/g)	Ratas control (pmol/g)	Ratas hiperamonémicas (pmol/g)
THDOC	9±1	16±2**	12±1	19±2**
Pregnenolona	5,2±1,0	7,6±0,9*	4,4±0,9	3,9±1,0
Alopregnanolona-acetato	1,6±0,5	1,8±0,4	2,3±0,5	4,6±1,2*
Pregnanolona	3,0±0,6	6,4±0,6*	1,8±0,4	9,0±0,9**
Progesterona	16±3	18±1	12±3	10±2

Los valores son la media ± SEM de 11 ratas por grupo. Las diferencias respecto a las ratas control se expresan con asteriscos; * p< 0,05; **p<0,01. Tomado de (74).

Dado que tanto THDOC como pregnanolona reducen la función de la vía Glu-NO-GMPc, estos aumentos en THDOC y pregnanolona en ratas hiperamonémicas contribuirían al aumento del tono GABAérgico y a la reducción de la función de la vía Glu-NO-GMPc en el cerebelo y, en consecuencia, de la capacidad de aprendizaje de la tarea de discriminación condicionada de laberinto Y, que se modula por esta vía (29).

Los resultados de esta tesis muestran que la hiperamonemia, a concentraciones de amonio similares a las encontradas en pacientes con cirrosis hepática, además de modificar los niveles de neuroesteroides, también altera cualitativa y/o cuantitativamente la modulación de la vía Glu-NO-GMPc por algunos neuroesteroides en el cerebelo (174).

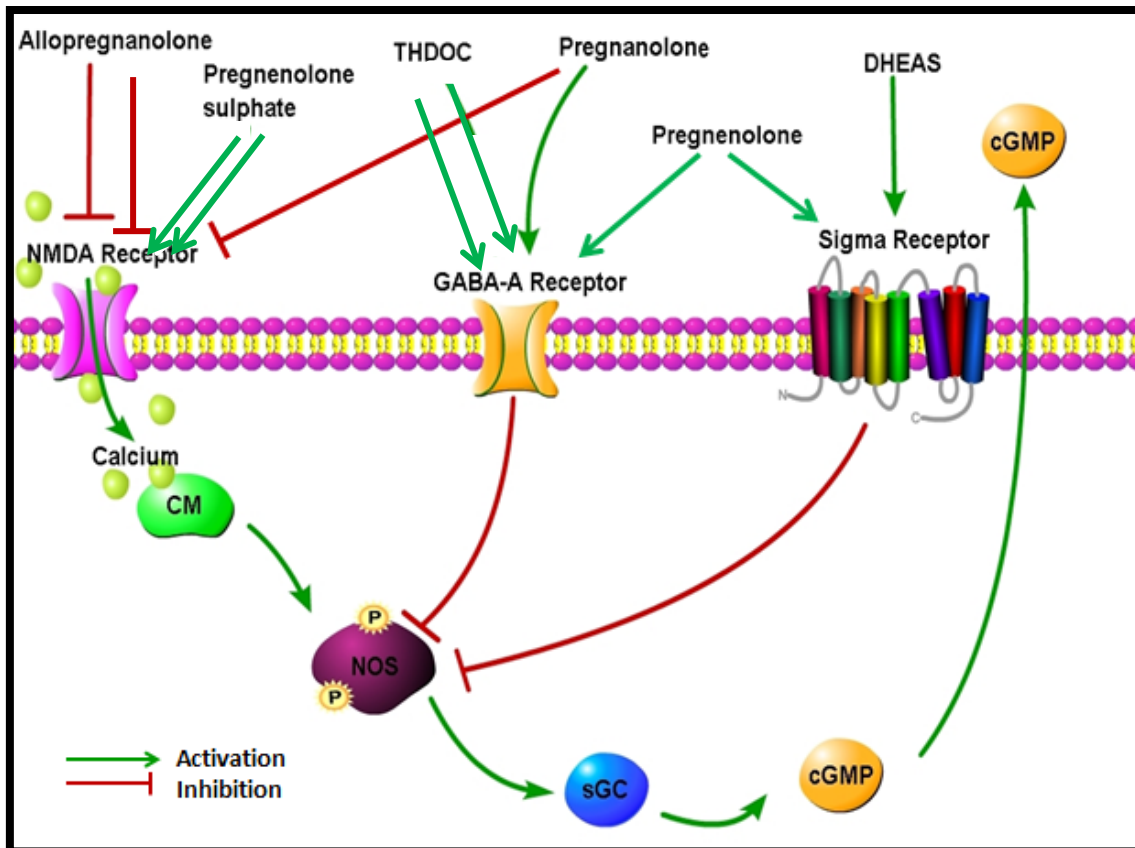


Figura 40: Efectos de la hiperamonemia crónica sobre la modulación por diferentes neuroesteroides de los receptores NMDA, sigma y GABA_A y de la vía Glu-NO-GMPc en cerebelo.

En la Figura 40 se resumen los efectos de la hiperamonemia crónica sobre la modulación por los diversos neuroesteroides estudiados en esta tesis de los receptores sigma, NMDA y GABA_A en cerebelo.

La hiperamonemia crónica potencia el efecto inhibitorio del THDOC sobre la función de la vía Glu-NO-GMPc. Esto podría ser debido al aumento del tono GABAérgico en el cerebelo de las ratas hiperamonémicas (74), que aumentaría la sensibilidad de los receptores GABA_A y, subsecuentemente, de la vía Glu-NO-GMPc a los agonistas de estos receptores. Este efecto es similar al inducido por el muscimol (agonista de los receptores GABA_A). La administración de muscimol 10 μM disminuye el aumento de GMPc inducido por NMDA en ratas control e hiperamonémicas. Sin embargo, el muscimol 2 μM sólo produce este efecto en las ratas hiperamonémicas, lo que indica

que la hiperamonemia aumenta el tono GABAérgico y la sensibilidad a agonistas del receptor GABA_A en cerebelo (74). Los resultados obtenidos con la administración de THDOC corroboran el aumento del tono GABAérgico en cerebelo de las ratas hiperamonémicas.

La pregnenolona no afecta el aumento de GMPc inducido por NMDA en las ratas control, pero lo reduce significativamente en ratas hiperamonémicas indicando una reducción la función de la vía Glu-NO-GMPc. Estos resultados sugieren que la pregnenolona a concentraciones fisiológicas no afectaría la modulación de los receptores GABA_A o NMDA en condiciones normales. Sin embargo, podría comportarse como un agonista débil del receptor GABA_A, que sólo se reflejaría en aumento de las respuestas a la activación de este receptor en condiciones en las que el tono GABAérgico se encuentre previamente aumentado, como ocurre en la hiperamonemia crónica.

Otra posible explicación se basaría en la propuesta de algunos autores que sugieren que la pregnenolona está desprovista de actividad GABAérgica (175) pero puede actuar como agonista de receptores sigma (185, 186), aunque menos eficientemente que otros neuroesteroides como la progesterona o DHEAS. La pregnenolona 100 nM podría activar los receptores sigma en ratas hiperamonémicas pero no en ratas control, debido a una mayor sensibilidad o activación tónica de los receptores sigma en hiperamonemia. Como se mencionó anteriormente, la activación de los receptores sigma en cerebelo reduce los efectos de la activación de los receptores NMDA. Esta podría ser una explicación alternativa de los efectos de la pregnenolona en ratas con hiperamonemia.

La pregnanolona actúa como agonista de los receptores GABA_A en ratas control (161, 163), pero como un antagonista de los receptores NMDA en ratas con hiperamonemia (174). En ratas hiperamonémicas la pregnanolona aumenta el GMPc basal e inhibe completamente la función de la vía Glu-NO-GMPc. Los antagonistas del receptor NMDA también aumentan el GMPc basal (53), mientras

que los agonistas de los receptores GABA_A no lo hacen (74). En condiciones normales la pregnanolona es más potente como agonista de los receptores GABA_A que como antagonista de los receptores NMDA (187). Los resultados de esta tesis demuestran que, en condiciones de hiperamonemia, la pregnanolona actúa principalmente como un antagonista de los receptores NMDA. Esto explica el aumento de GMPc basal, similar al inducido por el MK-801, antagonista del receptor NMDA (53) que no se produce en las ratas control y la abolición completa del aumento de citrulina y de GMPc inducido por NMDA. Una posible explicación de porqué la pregnanolona actúa como un antagonista de los receptores NMDA en hiperamonemia, pero no en ratas control, sería el aumento tónico de la activación de los receptores NMDA en hiperamonemia (53), lo que haría que los receptores NMDA fueran más sensibles a la inhibición por pregnanolona.

La hiperamonemia potencia los efectos de la alopregnanolona-acetato. Esto es lo esperable si actúa como antagonista del receptor NMDA. Al estar aumentada la activación tónica del receptor NMDA en hiperamonemia (53), su bloqueo por antagonistas conduce a un mayor aumento del GMPc extracelular que en las ratas control. Esto mismo ocurre con el MK-801 que aumenta el GMPc extracelular mucho más en ratas hiperamonémicas que en controles. El mecanismo responsable de este aumento ha sido descrito por El-Mlili y cols. (2008): la hiperamonemia reduce la actividad basal de la óxido nítrico sintasa neuronal (NOSn) y su activación tras la activación del receptor NMDA. La reducción de la actividad basal de la NOS se debe al aumento de la fosforilación de la serina 847 (Ser847), que reduce la actividad basal de la NOSn en aproximadamente un 40%. La administración de MK-801, un antagonista del receptor NMDA, disminuye la actividad de la calcio calmodulín quinasa II (CaMKII), reduciendo la fosforilación de la Ser847 y restaura la activación de la NOSn.

La hiperamonemia no altera el efecto del DHEAS sobre la función de la vía Glu-NO-GMPc. El DHEAS aumenta los niveles basales de GMPc extracelular e inhibe completamente el aumento de GMPc inducido por NMDA tanto en ratas control como en hiperamonémicas. El DHEAS actúa como agonista de los receptores sigma (178). Esto ocurriría tanto en ratas control como en hiperamonémicas.

El sulfato de pregnenolona potencia la respuesta a la activación de los receptores NMDA (188) lo que explicaría el aumento de GMPc extracelular inducido por el sulfato de pregnenolona en condiciones basales en las ratas control. En ratas hiperamonémicas el sulfato de pregnenolona restaura completamente la activación de la NOS y la función de la vía Glu-NO-cGMP. Esta mejora en la función de la vía Glu-NO-GMPc está de acuerdo con los efectos descritos por Reddy y cols. (189). Comprobaron que la administración de sulfato de pregnenolona mejoraba la ejecución de una tarea de evitación pasiva en ratones que habían sido tratados previamente con dizocilpina (antagonista del receptor NMDA). La administración previa de un inhibidor de la NOS previene la mejoría inducida por el sulfato de pregnenolona. Esto indica que la menor formación de NO está implicada en el deterioro de los procesos de aprendizaje y la memoria inducidos por la dizocilpina y que la recuperación de la formación de NO en respuesta a la activación del receptor NMDA está implicada en los efectos beneficiosos y antiamnésicos del sulfato de pregnenolona.

El aumento de los niveles de amonio alcanzados en el modelo de hiperamonemia crónica en rata utilizado en esta tesis es del mismo orden que en pacientes con cirrosis hepática (36). Por tanto, los efectos de la hiperamonemia sobre la modulación de los receptores GABA_A, NMDA y sigma por los neuroesteroides discutidos anteriormente pueden ocurrir del mismo modo en pacientes con cirrosis y encefalopatía hepática mínima. La concentración de algunos neuroesteroides aumenta en cerebro de pacientes cirróticos fallecidos

con encefalopatía hepática (165) y en ratas con hiperamonemia crónica (74). Esto sugiere que la hiperamonemia sería el principal contribuyente a los cambios en los niveles de neuroesteroides y en su acción sobre la neurotransmisión en la encefalopatía hepática. Se ha propuesto que el sistema de neuroesteroides juega un papel en la fisiopatología de este síndrome y puede ser una diana terapéutica para el tratamiento de la encefalopatía hepática (183).

Tabla 14: Efectos de la hiperamonemia crónica sobre la modulación por los neuroesteroides de receptores NMDA, GABA_A y sigma.

Neuroesteroide	Posible mecanismo	
	Ratas control	Ratas hiperamonémicas
THDOC	Agonista GABA _A	Agonista GABA _A (más potente que en controles)
Pregnanolona	Agonista GABA _A	<u>Antagonista NMDA</u>
DHEAS	Agonista sigma	Agonista sigma
Pregnenolona	Sin efecto	<u>Agonista sigma o agonista GABA_A</u>
Sulfato de pregnenolona	Agonista NMDA	Agonista NMDA (más potente que en controles)
Alopregnanolona-acetato	Antagonista NMDA	Antagonista NMDA (más potente que en controles)

Aparecen subrayados los efectos que cambia la hiperamonemia.

Los resultados presentados en esta tesis muestran que la hiperamonemia crónica moderada, similar a la presente en los pacientes con cirrosis hepática, altera los efectos de diferentes neuroesteroides sobre la modulación de la vía Glu-NO-GMPc y del GMPc extracelular (Tabla 14). Estos efectos se pueden resumir del siguiente modo:

- La hiperamonemia potencia las acciones de THDOC como agonista de los receptores GABA_A, de alopregnanolona-acetato como antagonista del receptor NMDA y de sulfato de pregnenolona como potenciador de la activación del receptor NMDA.

- La hiperamonemia modifica los tipos de efectos de pregnanolona y de pregnenolona (Figura 40):
 - La pregnanolona actúa como un agonista del receptor GABA_A en ratas de control, pero como un antagonista del receptor NMDA en ratas hiperamonémicas.
 - La pregnenolona (a 100 nM) no induce ningún efecto en las ratas de control, pero reduce la función de la vía Glu-NO-GMPc en las ratas hiperamonémicas, porque actúa como agonista del receptor GABA_A o como un agonista del receptor sigma que conduce a una reducción de la activación del receptor NMDA.

Los efectos de los neuroesteroides sobre la citrulina extracelular son esencialmente los mismos que sobre el GMPc, lo que indica que todos los neuroesteroides afectan la función de la vía Glu-NO-GMPc actuando sobre la activación de la NOS o en una etapa anterior, como por ejemplo, en la propia activación del receptor NMDA.

Los neuroesteroides que reducen la función de la vía (pregnanolona, THDOC, alopregnanolona-acetato o DHEAS) pueden contribuir al deterioro cognitivo en hiperamonemia y encefalopatía hepática. La pregnenolona deterioraría la función cognitiva en condiciones de hiperamonemia, pero no en condiciones fisiológicas.

La restauración de la vía Glu-NO-GMPc en hiperamonemia por sulfato de pregnenolona sugiere que este neuroesteroide podría ejercer efectos beneficiosos en el tratamiento de alteraciones cognitivas en hiperamonemia y encefalopatía hepática crónicas que están mediadas por la reducción de la función de la vía Glu-NO-GMPc, como la tarea de discriminación condicionada en un laberinto en Y.

3. TRATAMIENTO CRÓNICO INTRACEREBRAL CON SULFATO DE PREGNENOLONA EN RATAS CONTROL E HIPERAMONÉMICAS

3.1 El tratamiento crónico con sulfato de pregnenolona restaura la función de la vía Glu-NO-GMPc en cerebelo y la capacidad de aprendizaje en el laberinto en Y en ratas hiperamonémicas.

Tras el análisis de los resultados de los experimentos de microdiálisis se observó que la administración aguda de sulfato de pregnenolona, que actúa como modulador positivo del receptor NMDA en cerebelo de ratas control (190) e hiperamonémicas (174), restaura la función de la vía Glu-NO-GMPc en las ratas hiperamonémicas. Dado que el deterioro en la función de esta vía es responsable de la disminución de la capacidad de aprendizaje de la tarea de discriminación condicionada en el laberinto en Y, hipotetizamos que el tratamiento crónico con el sulfato de pregnenolona podría restaurar la capacidad de aprendizaje en ratas hiperamonémicas. Por esta razón, analizamos los efectos de la administración crónica de sulfato de pregnenolona sobre la función de dicha vía y sobre el aprendizaje de la tarea de discriminación condicionada en un laberinto en Y.

Datos previos de Lauderell y cols. también sugieren que el sulfato de pregnenolona podría mejorar el aprendizaje. Ensayaron su administración crónica intracerebroventricular en ratones mediante el uso de mini bombas osmóticas durante 3 ó 6 días antes de realizar un test de discriminación de brazo en un laberinto en Y. El test consiste en dos ensayos separados por un intervalo de tiempo, en el primer ensayo, un brazo se cerró y a los ratones se les permitió visitar los dos brazos accesibles. Al cabo de 2 ó 6 horas, se abrió el brazo y se dejó que los ratones exploraran de nuevo. La administración de

sulfato de pregnenolona aumentó significativamente la memoria de modo que pasaron más tiempo explorando el brazo nuevo (191). Tanto en este estudio de Lauderell y cols. como en el nuestro, el sulfato de pregnenolona se administra intracerebralmente con mini bombas osmóticas porque el sulfato de pregnenolona no atraviesa como tal la barrera hematoencefálica. Los esteroides necesitan tener alta lipofilia para poder atravesar la barrera hematoencefálica. El sulfato de pregnenolona se hidroliza a pregnenolona (192) y no atraviesa como tal la barrera hematoencefálica. Empleamos de mini bombas osmóticas para la administración intracerebroventricular de sulfato de pregnenolona a las ratas para conocer exactamente la cantidad de sulfato de pregnenolona administrado y garantizar que se alcanza en cerebro la concentración deseada.

Nuestro grupo ha descrito que la capacidad de aprendizaje de una tarea de discriminación condicionada en el laberinto en Y depende fundamentalmente de la función de la vía Glu-NO-GMPc en cerebelo (29). Hemos comprobado en distintos modelos animales que existe una excelente correlación entre la función de la vía Glu-NO-GMPc en cerebelo *in vivo* y la capacidad de aprendizaje de la tarea en el laberinto en Y. Cuando disminuye la formación de GMPc en respuesta a la activación del receptor NMDA, por ejemplo en ratas con hiperamonemia, encefalopatía hepática o expuestas prenatalmente a bifenilos policlorados (PCBs) o metilmercurio, disminuye la capacidad de aprender este test (29, 101, 193). Cuando aumenta la función de la vía Glu-NO-GMPc en cerebelo, por ejemplo en ratas prenatalmente expuestas a PBDE99 también aumenta la capacidad para aprender esta tarea (194).

Por otra parte, los tratamientos que restauran la función de la vía Glu-NO-GMPc en cerebelo de ratas con hiperamonemia o encefalopatía hepática como la administración de inhibidores de la fosfodiesterasa que degrada GMPc (zaprinast o sildenafil) también restauran la capacidad de aprender la tarea en el laberinto en Y (70).

La función de la vía y la capacidad de aprendizaje también se recuperan con la administración de ibuprofeno (73) o inhibidores de la MAP kinasa p38 (141) en ratas con encefalopatía hepática debida a anastomosis portocava.

La administración crónica del sulfato de pregnenolona consiguió restaurar los niveles basales de GMPc y la función de la vía Glu-NO-GMPc en cerebelo de ratas hiperamonémicas. Esta normalización de los niveles extracelulares de GMPc permitió recuperar la capacidad de aprendizaje de la tarea de discriminación condicionada en un laberinto en Y en las ratas hiperamonémicas.

3.2 El tratamiento crónico con sulfato de pregnenolona no afecta la actividad motora espontánea.

Estudiamos también los efectos de la administración crónica de sulfato de pregnenolona sobre la actividad motora en las ratas a una y tres semanas de tratamiento.

No encontramos diferencias en la actividad motora en 60 minutos entre las ratas control e hiperamonémicas. La administración crónica de sulfato de pregnenolona no afecta los movimientos ambulatorios ni los verticales ni a una ni a tres semanas de tratamiento.

El tratamiento durante una semana con sulfato de pregnenolona disminuye la distancia recorrida por las ratas control y la velocidad media tanto en ratas control como hiperamonémicas. Este efecto, desaparece a las tres semanas de tratamiento llegando a aumentarla significativamente en las ratas hiperamonémicas respecto a las ratas control.

La falta de efecto del sulfato de pregnenolona sobre la actividad motora coincide con la encontrada por Melchior y Ritzmann (195), que evaluaron la actividad motora y la ansiedad en un laberinto en

cruz elevado en ratones tratados con sulfato de pregnenolona. No encontraron ningún efecto sobre la actividad motora.

El control de la actividad motora es un fenómeno complejo en el que intervienen diversos circuitos neuronales, incluyendo el circuito de los ganglios basales-tálamo-corteza. El hecho de que el sulfato de pregnenolona no altere la actividad motora ni en ratas control ni hiperamonémicas podría deberse a que no afecte los procesos cerebrales implicados en el control de este comportamiento.

3.3 El tratamiento crónico con sulfato de pregnenolona normaliza los niveles basales de GABA extracelular y la coordinación motora en ratas hiperamonémicas.

El sulfato de pregnenolona administrado crónicamente también normaliza los niveles de GABA extracelular en el cerebelo de las ratas hiperamonémicas. La hiperamonemia crónica aumenta la concentración de GABA extracelular en cerebelo (74). El tratamiento con sulfato de pregnenolona la normaliza, reduciéndola a niveles similares a los de las ratas control. Un mecanismo por el que el sulfato de pregnenolona podría reducir los niveles de GABA extracelular en cerebelo podría ser por la inhibición de la liberación de GABA. Esto se ha descrito en determinadas condiciones en hipocampo. Teschemacher y cols. utilizaron la frecuencia de corrientes postsinápticas inhibitorias (mIPSCs) en presencia de TTX (para bloquear el potencial de acción) como un índice de la liberación de GABA independiente del potencial de acción. Encontraron que el sulfato de pregnenolona disminuye la frecuencia de mIPSCs, lo que sugiere que podría inhibir la liberación de GABA espontánea en el hipocampo (196). Mtchedlishvili y Kapur obtuvieron resultados similares al estudiar la liberación de GABA dependiente e independiente del potencial de acción en hipocampo, demostrando que el sulfato de pregnenolona puede inhibir la liberación de GABA en

ambos casos. Esta inhibición parece estar mediada por proteínas $G_{i/o}$ (197).

Efectos similares a los observados en hipocampo podrían explicar la disminución de GABA extracelular producida por el sulfato de pregnenolona en cerebelo de ratas hiperamonémicas. El tratamiento crónico con sulfato de pregnenolona también reduce ligeramente el GABA extracelular en ratas control pero el efecto no es estadísticamente significativo.

La coordinación motora se modula esencialmente por la neurotransmisión GABAérgica en cerebelo. Los niveles basales de GABA en cerebelo modulan la coordinación motora (100). El aumento del tono GABAérgico y la activación tónica de los receptores GABA en cerebelo inducen incoordinación motora (100).

La exposición a contaminantes ambientales como los bifenilos policlorados aumentan el GABA extracelular en cerebelo y la activación tónica de los receptores $GABA_A$. Existe una excelente correlación entre la concentración de GABA extracelular en cerebelo y la incoordinación motora, lo que indica que el aumento de GABA extracelular sería responsable del deterioro de la coordinación motora en animales expuestos perinatalmente a estos contaminantes (101).

Dado que los niveles de GABA extracelular están relacionados con la incoordinación motora (98) (101), el hecho de que el tratamiento crónico con sulfato de pregnenolona normalice los niveles de GABA extracelular parece ser la causa más probable de la mejora de la coordinación motora en ratas hiperamonémicas. De hecho, en nuestro estudio también existe una clara correlación entre los niveles extracelulares de GABA y el número de resbalones en el test de coordinación motora del beam-walking.

Los resultados obtenidos en esta tesis nos han permitido identificar un neuroesteroide, el sulfato de pregnenolona, como un posible agente terapéutico para mejorar el deterioro cognitivo y la

incoordinación motora en pacientes con encefalopatía hepática mínima o clínica. El tratamiento con sulfato de pregnenolona restaura la coordinación motora en ratas con hiperamonemia. Dado que los pacientes con encefalopatía hepática manifiestan problemas en la coordinación motora (77, 198), el tratamiento con sulfato de pregnenolona o sus precursores, podría mejorar la coordinación motora.

Los pacientes con encefalopatía hepática mínima o clínica también presentan deterioro cognitivo que comienzan con falta de concentración y de atención, enlentecimiento psicomotor y una disminución progresiva de la capacidad intelectual. Nuestros datos muestran que el tratamiento con sulfato de pregnenolona también restaura la capacidad de aprendizaje de la tarea de discriminación condicionada en el laberinto en Y, lo que sugiere que el aumento de los niveles de sulfato de pregnenolona también podría mejorar la función cognitiva en pacientes con encefalopatía hepática. Este aumento se podría conseguir administrando los precursores adecuados.

El uso de neuroesteroides puede ser una nueva alternativa terapéutica que podría ser útil para mejorar la función cognitiva y motora y la calidad de vida de pacientes con encefalopatía hepática mínima o clínica.

VI. CONCLUSIONES

1. Distintos neuroesteroides administrados de forma aguda a través de la sonda de microdiálisis modulan de forma rápida la activación de la vía glutamato-óxido nítrico-GMPc en cerebelo de ratas control a través de la modulación de receptores GABA_A, NMDA o sigma.

La pregnenolona, la pregnanolona y el THDOC no afectan el GMPc basal, mientras que el DHEAS, la alopregnanolona-acetato y la pregnenolona sulfato lo aumentan. El DHEAS, la pregnanolona, la alopregnanolona-acetato y el THDOC reducen el aumento de GMPc inducido por NMDA, la pregnenolona sulfato lo aumenta y la pregnenolona no lo modifica.

El THDOC y la pregnanolona actúan como agonistas del receptor GABA_A. La alopregnanolona-acetato actúa como antagonista del receptor NMDA y el sulfato de pregnenolona potencia su activación. El DHEAS actúa sobre como agonista del receptor sigma modulando negativamente al receptor NMDA. La pregnenolona no ejerce ningún efecto.

2. Los neuroesteroides afectan de modo similar los niveles extracelulares de GMPc y de citrulina. Esto indica que los neuroesteroides regulan la función de la vía Glu-NO-GMPc modulando la activación de la NOS o un paso anterior.

3. La hiperamonemia crónica con niveles de amonio similares a los de pacientes con cirrosis y encefalopatía hepática altera la modulación por los neuroesteroides de los receptores GABA_A, NMDA y sigma y de la vía Glu-NO-GMPc.

La hiperamonemia potencia las acciones de THDOC como agonista de los receptores GABA_A, de alopegnanolona-acetato como antagonista del receptor NMDA y de sulfato de pregnenolona como potenciador de la activación del receptor NMDA. No altera los efectos del DHEAS y modifica los tipos de efectos de pregnanolona y de pregnenolona. La pregnanolona actúa como agonista GABA_A en ratas control y como antagonista NMDA en hiperamonémicas. La

pregnenolona no tiene ningún efecto en ratas control pero actúa como agonista de receptores GABA_A o sigma en hiperamonémicas.

4. El tratamiento crónico con sulfato de pregnenolona normaliza los niveles de GABA extracelular en cerebelo y elimina la incoordinación motora en ratas hiperamonémicas.

5. El sulfato de pregnenolona administrado crónicamente no modifica la actividad motora espontánea.

6. La administración crónica de sulfato de pregnenolona restaura la función de la vía Glu-NO-GMPc y los niveles de GMPc extracelular en ratas hiperamonémicas.

7. El tratamiento crónico intracerebral con sulfato de pregnenolona restaura la capacidad de aprendizaje de una tarea de discriminación condicionada en un laberinto en Y en ratas hiperamonémicas.

8. Tratamientos que aumenten los niveles de sulfato de pregnenolona en cerebro podrían mejorar la función cognitiva y la coordinación motora en pacientes con encefalopatía hepática mínima o clínica.

VII. BIBLIOGRAFÍA

1. *Hepatic encephalopathy—definition, nomenclature, diagnosis, and quantification: final report of the working party at the 11th World Congress of Gastroenterology, in Viena (1998)*. **Ferenci AL, Mullen K, Tarter R, Weissenborn K, Blei AT and member of the working party**. 2002, *Hepatology*, Vol. 35, pp. 716-721.

2. *Gastrointestinal bleeding in children*. **Yachha SK, K.A., Sharma BC, Kumar M**. 1996, *J Gastroenterol Hepatol* 11 (1996) 903–907, Vol. 11, pp. 903-7.

3. *Patients with minimal hepatic encephalopathy show impaired mismatch negativity correlating with reduced performance in attention tests*. **Felipo V, Ordoño JF, Urios A, El Mili N, Giménez-Garzó C, Aguado C, González-Lopez O, Giner-Duran R, Serra MA, Wassel A, Rodrigo JM, Salazar J, Montoliu C**. 2, 2012, *Hepatology*., Vol. 55, pp. 530-39.

4. *Neurological and neuropsychiatric syndromes associated with liver disease*. . **Weissenborn K, B.M., Krause J, Ennen J, Ahl B**. 2005, *AIDS*, pp. 19 Suppl 3 S93-8.

5. *Attention, Memory, and Cognitive Function in Hepatic Encephalopathy*. **Weissenborn K, Heidenreich S, Bokemeyer M, Berding G, Ahl B**. 4, 2005a, *Metabolic Brain Disease*, Vol. 20, pp. 359-67.

6. *The hepatic coma syndromes and lactulose*. **Conn HO, Livvenham M**. 1979, Baltimore: Williams and Wilkins.

7. *Characteristics of minimal hepatic encephalopathy*. **Amodio SM, Gatta A, Morgan MY**. 2004, *Metabolic Brain Disease*, Vol. 19, pp. 253-267.

8. *Systemic diseases that cause movement disorders*. **Alarcón F, Giménez-Roldán S**. (1), 2005, *Parkinsonism Relat Disord.*, Vol. 11, pp. 1-18.

9. *Extrapyramidal signs predict the development of overt hepatic encephalopathy in patients with liver cirrhosis*. **Compañy L,**

Zapater P, Pérez-Mateo M, Jover R. 5, 2010, Eur J Gastroenterol Hepatol., Vol. 22, pp. 519-25.

10. *Portal-systemic encephalopathy; neurological complications of liver disease.* **Sherlock S, Summerskills W, White LP, Phear EA.** 6836, 1954, Lancet, Vol. 267, pp. 454-7.

11. *High prevalence of sleep disturbance in cirrhosis.* **Córdoba J, Cabrera J, Lataif L, Penev P, Zee P, Blei AT.** 1998, Hepatology, Vol. 272, pp. 339-345.

12. *Hepatic bromsulphthalein-glutathione conjugating enzyme activity in patients with liver disease with particular reference to effects of enzyme inducer.* **Datta DV, Singh S, Nair R, Chhuttani PN, Nair CR.** 7, 1976, Indian J Med Res., Vol. 64, pp. 1070-76.

13. *Synthesis and catabolism of nucleotides.* **Frisell WR.** 1982, Human biochemistry, pp. 292-304.

14. *Intestinal glutaminase activity is increased in liver cirrhosis and correlates with minimal hepatic encephalopathy.* **Romero-Gómez M, Ramos-Guerrero R, Grande L, de Terán LC, Corpas R, Camacho I Bautista, JD.** 1, 2004, J Hepatol., Vol. 41, pp. 49-54.

15. *Diagnóstico de un varón de 72 años con fiebre, alteración del estado de consciencia e hiperamonemia.* **Sanz C.** 2, 2002, Revista del Hospital Privado de Comunidad, Vol. 5.

16. *Neurologic outcome in children with inborn errors of urea synthesis. Outcome of urea-cycle enzymopathies.* **Msall M, Batshaw ML, Suss R, Brusilow SW, Mellits ED.** 23, 1984, N. Engl. J. Med., Vol. 310, pp. 1500-05.

17. *A nationwide survey on transient hyperammonemia in newborn infants in Japan: prognosis of life and neurological outcome.* **Yoshino M, Sakaguchi Y, Kuriya N, Ohtani Y, Yamashita F, Hashimoto T, Oyanagi K, Tada K, Narisawa K, Kitagawa T.** 4, 1991, Neuropediatrics, Vol. 22, pp. 198-202.

18. *Transient hyperammonemia of the preterm infant.* **Ballard RA, Vinocur B, Reynolds JW, Wennberg RP, Merritt A,**

Sweetman L, Nyhan WL. 17, 1978, N. Engl. J. Med., Vol. 299, pp. 920-5.

19. *Bile duct ligation plus hyperammonemia in rats reproduces the alterations in the modulation of soluble guanylate cyclase by nitric oxide in brain of cirrhotic patients.* **Rodrigo R, Jover R, Candela A, Compañ A, Sáez-Valero J, Erceg S, Felipe V.** 2, 2005, Neuroscience., Vol. 130, pp. 435-43.

20. *Prolonged bile duct obstruction: a new experimental model for cirrhosis in the rat.* **Kountouras J, Billing BH, Scheuer PJ.** 1984, Br J Exp Pathol, Vol. 65, pp. 305-11.

21. *Brain edema and inflammatory activation in bile duct ligated rats with diet-induced hyperammonemia: A model of hepatic encephalopathy in cirrhosis.* **Jover R, Regina R, Felipe V, Insausti R, Saez-Valero J, Garcia-Ayllon MS, Suarez I, Candela A, Compan A, Esteban A, Cauli O, Auso E, Rodriguez E, Gutierrez A, Girona E, Erceg S, Berbel P, Perez-Mateo M.** 6, 2006, Hepatology, Vol. 43, pp. 1257-66.

22. *Reversibility of cholestatic changes following experimental common bile duct obstruction: fact or fantasy?* **Aronson DC, Chamuleau RA, Frederiks WM, Gooszen HG, Heijmans HS, James J.** 1993, J Hepatol, Vol. 18, pp. 85-95.

23. *Suppression of cellular immunity in obstructive jaundice is caused by endotoxins: a study with germ-free rats.* **Greve JW, Gouma DJ, Soeters PB, Buurman WA.** 1990, Gastroenterology, Vol. 98, pp. 478-85.

24. *Impaired specific cell-mediated immunity in experimental biliary obstruction and its reversibility by internal biliary drainage.* **Roughneen PT, Gouma DJ, Kulkarni AD, Fanslow WF, Rowlands BJ.** 1986, J Surg Res, Vol. 41, pp. 113-125.

25. *Hyperammonemia induces neuroinflammation that contributes to cognitive impairment in rats with hepatic encephalopathy.* **Rodrigo R, Cauli O, Gomez-Pinedo U, Agusti A,**

Hernandez-Rabaza V, Garcia-Verdugo JM, Felipo V. 2, 2010, *Gastroenterology*, Vol. 139, pp. 675-84.

26. *Obstructive jaundice in rats: cause of spatial memory deficits with recovery after biliary decompression.* **Huang LT, Hsieh CS, Chou MH, Chuang JH, Liou CW, Tiao MM, Lai MC.** 3, 2004, *World J Surg.*, Vol. 28, pp. 283-7.

27. *Brain cholinergic impairment in liver failure.* **García-Ayllón MS, Cauli O, Silveyra MX, Rodrigo R, Candela A, Compañ A, Jover R, Pérez-Mateo M, Martínez S, Felipo V, Sáez-Valero J.** 2008, *Brain Res Mol Brain Res*, Vol. 131, pp. 2946-56.

28. *Minimal hepatic encephalopathy and extrapyramidal signs in patients with cirrhosis.* **Jover R, Compañ L, Gutiérrez A, Zapater P, Pérez-Serra J, Girona E, Aparicio JR, Pérez-Mateo M.** 7, 2003, *Am J Gastroenterol*, Vol. 98, pp. 1599-604.

29. *Restoration of learning ability in hyperammonemic rats by increasing extracellular cGMP in brain.* **Erceg S, Monfort P, Hernandez-Viadel M, Llansola M, Montoliu C, Felipo V.** 2005, *Brain Res Mol Brain Res*, pp. 115-121.

30. *Glutamatergic and gabaergic neurotransmission and neuronal circuits in hepatic encephalopathy.* **Cauli O, Rodrigo R, Llansola M, Montoliu C, Monfort P, Piedrafita B, El Mlili N, Boix J, Agustí A, Felipo V.** 1, 2009, *Metab Brain Dis*, Vol. 24, pp. 69-80.

31. *Chronic liver failure in rats impairs glutamatergic synaptic transmission and long-term potentiation in hippocampus and learning ability.* **Monfort P, Erceg S, Piedrafita B, Llansola M, Felipo V.** 7, 2007, *Eur J Neurosci*, Vol. 25, pp. 2103-11.

32. *Spatial memory alterations in three models of hepatic encephalopathy.* **Méndez M, Méndez-López M, López L, Aller MA, Arias J, Cimadevilla JM, Arias JL.** 1, 2008, *Behav Brain Res*, Vol. 188, pp. 32-40.

33. *Minimal hepatic encephalopathy.* **Dhiman RK, Chawla YK.** 1, 2009, *Indian J Gastroenterol*, Vol. 28, pp. 5-16.

34. *Portacaval shunt in the rat: selective alterations in behavior and brain serotonin.* **Bengtsson F, Nobin A, Falck B, Gage FH, Jeppsson B.** 1986, *Pharmacol Biochem Behav*, Vol. 24, pp. 1611-16.

35. *Paradoxical protection of both protein-free and high protein diets against acute ammonium intoxication.* **Felipo V, Miñana MD, Grisolia S.** 1, 1988, *Biochem Biophys Res Commun.*, Vol. 156, pp. 506-10.

36. *A simple animal model of hyperammonemia.* **Azorín I, Miñana MD, Felipo V, Grisolia S.** 3, 1989, *Hepatology*, Vol. 10, pp. 311-314.

37. *Long-term ingestion of ammonium increases acetylglutamate and urea levels without affecting the amount of carbamoyl-phosphate synthase.* **Felipo V, Miñana MD, Grisolia S.** 3, 1988b, *Eur J Biochem.*, Vol. 176, pp. 567-71.

38. *Treatment of hyperammonemia with carbamylglutamate in rats.* **Grau E, Felipo V, Miñana MD, Grisolia S.** 3, 1992, *Hepatology*, Vol. 15, pp. 446-8.

39. *Induction of rat brain tubulin following ammonium ingestion.* **Felipo V, Miñana MD, Azorín I, Grisolia S.** 4, 1988c, *J Neurochem.*, Vol. 51, pp. 1041-45.

40. *Ammonium ingestion prevents depletion of hepatic energy metabolites induced by acute ammonium intoxication.* **Kosenko E, Felipo V, Miñana MD, Grau E, Grisolia S.** 2, 1991, *Arch Biochem Biophys.*, Vol. 290, pp. 484-8.

41. *High ammonia levels in brain induce tubulin in cerebrum but not in cerebellum.* **Miñana MD, Felipo V, Wallace R, Grisolia S.** 6, 1988, *J Neurochem.*, Vol. 51, pp. 1839-42.

42. *Protective effect of long term ammonium ingestion against acute ammonium intoxication.* **Miñana MD, Felipo V, Grisolia S.** 3, 1988b, *Biochem Biophys Res Commun*, Vol. 153, pp. 99-83.

43. *Brain ATP depletion induced by acute ammonia intoxication in rats is mediated by activation of the NMDA receptor and Na⁺,K⁽⁺⁾-*

ATPase. **Kosenko E, Kaminsky Y, Grau E, Miñana MD, Marcaida G, Grisolia S, Felipo V.** 6, 1994, *J Neurochem.*, Vol. 63, pp. 2172-78.

44. *Chronic hyperammonemia impairs the glutamate-nitric oxide-cyclic GMP pathway in cerebellar neurons in culture and in the rat in vivo.* **Hermenegildo C, Montoliu C, Llansola M, Muñoz MD, Gaztelu JM, Miñana MD, Felipo V.** 10, 1998, *Eur J Neurosci.*, Vol. 10, pp. 3201-9.

45. *Hyperammonemia impairs NMDA receptor-dependent long-term potentiation in the CA1 of rat hippocampus in vitro.* **Muñoz MD, Monfort P, Gaztelu JM, Felipo V.** 4, 2000, *Neurochem Res.*, Vol. 25, pp. 437-41.

46. *Chronic moderate hyperammonemia impairs active and passive avoidance behavior and conditional discrimination learning in rats.* **Aguilar MA, Miñarro J, Felipo V.** 2, 2000, *Exp Neurol*, Vol. 161, pp. 704-13.

47. *Chronic hyperammonemia alters the circadian rhythms of corticosteroid hormone levels and of motor activity in rats.* **Ahabrach H, Piedrafita B, Ayad A, El Mlili N, Errami M, Felipo V, Llansola M.** 7, 2010, *J Neurosci Res.*, Vol. 88, pp. 1605-14.

48. *Chronic hyperammonemia, glutamatergic neurotransmission and neurological alterations.* **Llansola M, Montoliu C, Cauli O, Hernández-Rabaza V, Agustí A, Cabrera-Pastor A, Giménez-Garzó C, González-Usano A, Felipo V.** 2012, *Metab Brain Dis.*, p. Pendiente de publicar.

49. *Effects of hyperammonemia and liver failure on glutamatergic neurotransmission.* **Monfort P, Muñoz MD, ElAyadi A, Kosenko E, Felipo V.** 4, 2002, *Metab Brain Dis.*, Vol. 17, pp. 237-50.

50. *Acute ammonia toxicity is mediated by the NMDA type of glutamate receptors.* **Marcaida G, Felipo V, Hermenegildo C, Miñana MD, Grisolia S.** 1, 1992, *FEBS*, Vol. 296, pp. 67-8.

51. *Activation of N-methyl-D-aspartate receptors in rat brain in vivo following acute ammonia intoxication: characterization by in vivo brain microdialysis.* **Hermenegildo C, Monfort P, Felipo V.** 3, 2000, *Hepatology.*, Vol. 31, pp. 709-15.

52. *Acute liver failure-induced death of rats is delayed or prevented by blocking NMDA receptors in brain.* **Cauli O, Rodrigo R, Boix J, Piedrafita B, Agusti A, Felipo V.** 3, 2008, *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.*, Vol. 295, pp. G503-11.

53. *Chronic hyperammonemia reduces the activity of neuronal nitric oxide synthase in cerebellum by altering its localization and increasing its phosphorylation by calcium-calmodulin kinase II.* **El-Mlili N, Rodrigo R, Naghizadeh B, Cauli O, Felipo V.** 3, 2008, *J Neurochem.*, Vol. 160, pp. 1440-49.

54. *Differential effects of chronic hyperammonemia on modulation of the glutamate-nitric oxide-cGMP pathway by metabotropic glutamate receptor 5 and low and high affinity AMPA receptors in cerebellum in vivo.* **Cabrera-Pastor A, Llansola M, Reznikov V, Boix J, Felipo V.** 1, 2012, *Neurochem Int.*, Vol. 61, pp. 63-71.

55. *Chronic exposure to ammonia alters the modulation of phosphorylation of microtubule-associated protein 2 by metabotropic glutamate receptors 1 and 5 in cerebellar neurons in culture.* **Llansola M, Erceg S, Felipo V.** 1, 2005, *Neuroscience.*, Vol. 133, pp. 185-91.

56. *Voltage-dependent block by Mg²⁺ of NMDA responses in spinal cord neurones.* **Mayer ML, Westbrook GL, Guthrie PB.** 5965, 1984, *Nature*, Vol. 309, pp. 261-3.

57. *Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurones.* **Nowak L, Bregestovski P, Ascher P, Herbet A, Prochiantz A.** 5950, 1984, *Nature*, Vol. 307, pp. 462-5.

58. *Anatomy and physiology of glutamate in the CNS.* **Greenamyre JT, Porter RH.** 11 Suppl 8, 1994, Neurology, Vol. 44, pp. S7-13.

59. *Biochemical studies of the structure and function of the N-methyl-D-aspartate subtype of glutamate receptors.* **Dunah AW, Yasuda RP, Luo J, Wang Y, Prybylowski KL, Wolfe BB.** 2, 1999, Mol. Neurobiol., Vol. 19, pp. 151-79.

60. *Structure and function of the NMDA receptor channel.* **Mori H, Mishina M.** 10, 1995, Neuropharmacology, Vol. 34, pp. 1219-37.

61. *Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system.* **Choi DW.** 8, 1988, Neuron, Vol. 1, pp. 623-34.

62. *Atypical antipsychotics.* **Owens MJ, Risch SC.** 1998, Textbook of Psychopharmacology (Schatzberg AF and Nemeroff CB eds), Vols. The American Psychiatric Press, Washington, DC., pp. 323-48.

63. *Group I metabotropic glutamate receptors: implications for brain diseases.* **Bordi F, Ugolini A.** 1, 1999, Prog Neurobiol, Vol. 59, pp. 55-79.

64. *Multiple presynaptic metabotropic glutamate receptors modulate excitatory and inhibitory synaptic transmission in hippocampal area CA1.* **Gereau RW, Conn PJ.** 10, 1995, J Neurosci., Vol. 15, pp. 6879-89.

65. *Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggests role as intercellular messenger in the brain.* **Garthwaite J, Charles SL, Chess-Williams R.** 6197, 1988, Nature, Vol. 336, pp. 385-88.

66. *Glutamate receptor agonists stimulate nitric oxide synthase in primary cultures of cerebellar granule cells.* **Kiedrowski L, Costa E, Wroblewski JT.** 1, 1992, J Neurochem., Vol. 58, pp. 335-41.

67. *Soluble guanylate cyclase from rat lung exists as a heterodimer.* **Kamisaki Y, Saheki S, Nakane M, Palmieri JA, Kuno**

T, Chang BY, Waldman SA, Murad F. 16, 1986, J. Biol. Chem., Vol. 261, pp. 7236-41.

68. *Expression of soluble guanylyl cyclase. Catalytic activity requires two enzyme subunits.* **Harteneck C, Koesling D, Söling A, Schult G, Böhme E.** 1-2, 1990, FEBS Lett., Vol. 272, pp. 221-23.

69. *Altered content and modulation of soluble guanylate cyclase in the cerebellum of rats with portacaval anastomosis.* **Monfort P, Corbalán R, Martínez L, López-Talavera J, Córdoba J, Felipo V.** 4, 2001, Neurosci., Vol. 104, pp. 1119-25.

70. *Oral administration of sildenafil restores learning ability in rats with hyperammonemia and with portacaval shunts.* **Erceg S, Monfort P, Hernández-Viadel M, Rodrigo R, Montoliu C, Felipo V.** 2, 2005a, Hepatology, Vol. 41, pp. 299-306.

71. *Altered modulation of soluble guanylate cyclase in lymphocytes from patients with liver disease.* **Corbalán R, Miñana MD, Del Olmo JA, Serra MA, Rodrigo JM, Felipo V.** 2002, J Mol Med, Vol. 80, pp. 117-23.

72. *Glutamate-induced activation of nitric oxide synthase is impaired in cerebral cortex in vivo in rats with chronic liver failure.* **Rodrigo R, Erceg S, Rodriguez-Diaz J, Saez-Valero J, Piedrafita B, Suarez I, Felipo V.** 1, 2007, J Neurochem., Vol. 102, pp. 51-64.

73. *Inflammation, hepatic encephalopathy: ibuprofen restores learning ability in rats with porto-caval shunts.* **Cauli O, Rodrigo R, Piedrafita B, Boix J, Felipo V.** 2007, Hepatology, Vol. 46, pp. 514-19.

74. *Hyperammonemia increases GABAergic tone in cerebellum but decreases it in the rat cortex.* **Cauli O, Mansouri MT, Agustí A, Felipo V.** 2009, Gastroenterology, Vol. 136, pp. 1359–1367.

75. *The inhibitory circuitry as target of antiepileptics drugs.* **Bohme I, Luddens H.** 2001, Current Medicinal Chemistry, Vol. 8, pp. 1257-74.

76. *Essential Neuroscience*. **Siege A, Sapru HN**. 2005, Lippincott Williams & Wilkins.
77. *GABA_A Receptors in the Vertebrate Retina*. **Qian H**. 2011.
78. *GABA receptors: A review of GABA and the receptors to which it binds*. **Martin IL, Dunn SMJ**. 2002, Tocris Cookson LTD.
79. *Perisynaptic localization of delta subunit-containing GABA(A) receptors and their activation by GABA spillover in the mouse dentate gyrus*. **Wei W, Zhang N, Peng Z, Houser CR, Mody I**. 33, 2003, J. Neurosci., Vol. 23, pp. 10650-61.
80. *Multiple facets of GABAergic neurons and synapses: multiple fates of GABA signalling in epilepsies*. **Cossart R, Bernard C, Ben-Ari Y**. 2, 2005, Trends Neurosci, Vol. 28, pp. 108-15.
81. *Assembly and cell surface expression of heteromeric and homomeric g-aminobutyric acid type A receptors*. **Connolly CN, Krishek BJ, McDonald B, Smart TG, Moss SJ**. 1, 1996, J Biol Chem , Vol. 271, pp. 89-96.
82. *Function and structure in glycine receptors and some of their relatives*. **Colquhoun D, Sivilotti LG**. 6, 2004, Trends Neurosci, Vol. 27, pp. 337-44.
83. **Llinás R, Walton KD**. *Cerebellum. In the Synaptic organization of the brain*. Shepherd GM. Oxford : Oxford University press, 1990.
84. *The cerebellum: a model system for studying GABA_A receptor diversity*. **Wisden W, Korpi ER, Bahn S**. 9-10, 1996, Neuropharmacology., Vol. 35, pp. 1139-60.
85. *Group I metabotropic glutamate receptors inhibit GABA release at interneuron-Purkinje cell synapses through endocannabinoid production*. **Galante M, Diana MA**. 20, 2004, J Neurosci., Vol. 24, pp. 4865-74.
86. *GABA(A) receptors: immunocytochemical distribution of 13 subunits in the adult rat brain*. **Pirker S, Schwarzer C**,

Wieselthaler A, Sieghart W, Sperk G. 4, 2000, *Neuroscience.*, Vol. 101, pp. 815-50.

87. *The distribution of 13 GABA(A) receptor subunit mRNAs in the rat brain. II. Olfactory bulb and cerebellum.* **Laurie DJ, Seeburg PH, Wisden W.** 3, 1992, *J Neurosc*, Vol. 12, pp. 1063-73.

88. *GABAA-receptor heterogeneity in the adult rat brain: differential regional and cellular distribution of seven major subunits.* **Fritschy JM, Mohler H.** 1, 1995, *J Comp Neurol.*, Vol. 359, pp. 154-94.

89. *Hepatic encephalopathy and the gamma-aminobutyric-acid neurotransmitter system.* **Schafer DF, Jones EA.** 8262, 1982, *Lancet.*, Vol. 1, pp. 18-20.

90. *gamma-Aminobutyric acid (GABA) and hepatic encephalopathy: testing the validity of electroencephalographic evidence of the GABA hypothesis.* **Myslobodsky, MS.** 2, 1987, *Hepatogastroenterology.*, Vol. 34, pp. 58-64.

91. *Role of endogenous benzodiazepineligands and their GABA-A-associated receptors in hepatic encephathy.* **Ahboucha S, Butterworth RF.** 2005, *Metab Brain Dis*, Vol. 20, pp. 425-37.

92. *Changes in the metabolism and binding of GABA in the rat brain in thioacetamide-induced hepatogenic encephalopathy.* **Wysmyk-Cybula U, Dabrowiecki Z, Albrecht J.** 1986, *Biomed Biochim Acta*, Vol. 45, pp. 413-19.

93. *Brain concentrations of benzodiazepines are elevated in an animal model of hepatic encephalopathy.* **Basile AS, Pannell L, Jaouni T, Gammal SH, Fales HM, Jones EA, Skolnick P.** 14, 1990, *Proc Natl Acad Sci USA* , Vol. 87, pp. 5263-67.

94. *Ammonia potentiates GABAA response in dissociated rat cortical neurons.* **Takahashi K, Kameda H, Kataoka M, Sanjou K, Harata N, Akaike N.** 1, 1993, *Neurosci Lett.*, Vol. 151, pp. 51-4.

95. *Modulation of ligand binding to components of the GABAA receptor complex by ammonia: implications for the pathogenesis of*

hyperammonemic syndromes. **Ha JH, Basile AS.** 1-2, 1996, *Brain Res.*, Vol. 720, pp. 35-44.

96. *Benzodiazepine-sensitive GABA(A) receptors limit the activity of the NMDA/NO/cyclic GMP pathway: a microdialysis study in the cerebellum of freely moving rats.* **Fedele E, Ansaldo MA, Varnier G, Raiteri M.** 2, 2000, *J Neurochem.*, Vol. 75, pp. 782-7.

97. *GABA(A), but not NMDA, receptors modulate in vivo NO-mediated cGMP synthesis in the rat cerebral cortex.* **Pepicelli O, Brescia A, Gherzi E, Raiteri M, Fedele E.** 4, 2004, *Neuropharmacology.*, Vol. 46, pp. 480-9.

98. *The level of GABA in the brain and locomotor behavior.* **Grimm V, Gottesfeld Z, Wassermann I, Samuel D.** 4, 1975, *Pharmacol Biochem Behav.*, Vol. 3, pp. 573-78.

99. *Co-modulation of acute ethanol-induced motor impairment by mouse cerebellar adenosinergic A1 and GABA(A) receptor systems.* **Saeed Dar M.** 1-3, 2006, *Brain Res Bull.*, Vol. 71, pp. 287-95.

100. *Alcohol-induced motor impairment caused by increased extrasynaptic GABA(A) receptor activity.* **Hanchar HJ, Dodson PD, Olsen RW, Otis TS, Wallner M.** 3, 2005, *Nat Neurosci.*, Vol. 8, pp. 339-45.

101. *Developmental exposure to polychlorinated biphenyls 52, 138 or 180 affects differentially learning or motor coordination in adult rats. Mechanisms involved.* **Boix J, Cauli O, Felipo V.** 4, 2010, *Neuroscience.*, Vol. 167, pp. 994-03.

102. *The effects of morphine- and nalorphine-like drugs in the nondependent and morphine-dependent chronic spinal dog.* **Martin WR, Eades, J. Thompson JA, Huppler RE, Gilbert PE.** 1976, *J Pharmacol Exp Ther.*, Vol. 197, pp. 517-32.

103. *Sigma receptors: biology and therapeutic potential.* **Guitart X, Codony X, Monroy X.** 3, 2004, *Psychopharmacology*, Vol. 174, pp. 301-19.

104. *Sigma receptors and sigma ligands: background to a pharmacological enigma.* **Leonard BE.** 2004, *Pharmacopsychiatry*, Vol. 37 Suppl 3, pp. S166-70.

105. *Novel sigma receptor agonists produce antidepressant-like effects in mice.* **Wang J, Mack AL, Coop A, Matsumoto RR.** 11, 2007, *Eur Neuropsychopharmacol*, Vol. 17, pp. 708-16.

106. *The hallucinogen N,N-dimethyltryptamine (DMT) is an endogenous sigma-1 receptor regulator.* **Fontanilla D, Johannessen M, Hajipour AR, Cozzi NV, Jackson MB, Ruoho AE.** 5916, 2009, *Science*, Vol. 323, pp. 934-37.

107. *Perfil farmacológico de los receptores σ .* **Beltrán D, Cavas M, Navarro JF.** 2, 2004, *Psiquiatr Biol*, Vol. 11, pp. 41-57.

108. *The pharmacology of sigma-1 receptors.* **Maurice T, Su TP.** 2, 2009, *Pharmacol Ther.*, Vol. 124, pp. 195-06.

109. *Physiological function of sigma-1 receptors in the central nervous system: neuromodulation.* **Beltrán D, Navarro JF.** 2, 2007, *Psiquiatr Biol*, Vol. 14, pp. 67-76.

110. *Neuroprotective sigma ligands attenuate NMDA and trans-ACPD-induced calcium signaling in rat primary neurons.* **Klette KL, Lin Y, Clapp LE, DeCoster MA, Moreton JE, Tortella FC.** 1-2, 1997, *Brain Res.*, Vol. 756, pp. 231-40.

111. *Involvement of direct inhibition of NMDA receptors in the effects of sigma-receptor ligands on glutamate neurotoxicity in vitro.* **Nishikawa H, Hashino A, Kume T, Katsuki H, Kaneko S, Akaike A.** 1-2, 2000, *Eur J Pharmacol.*, Vol. 404, pp. 41-8.

112. *Neurosteroids: A new brain function?* **Baulieu EE, Robel P.** 1990, *J Steroid Biochem Mol Biol*, Vol. 37, pp. 395-403.

113. *Characterization and measurement of dehydroepiandrosterone sulfate in rat brain.* **Corpéchet C, Robel P, Axelson M, Sjövall J, Baulieu EE.** 8, 1981, *Proc Natl Acad Sci USA*, Vol. 78, pp. 4704-07.

114. *Pregnenolone and its sulfate ester in the rat brain.* **Corpechot C, Synguelakis M, Talha S, Axelson M, Sjovali J, Vihko R, Baulieu EE, Robel P.** 1983, *Brain Res*, Vol. 270, pp. 119-25.

115. *Molecular biology of steroid hormone synthesis.* **Miller WL.** 1988, *Endocr Rev*, Vol. 9, pp. 295-318.

116. *Role of the peripheral-type benzodiazepine receptor and the polypeptide diazepam binding inhibitor in steroidogenesis.* **Papadopoulos V, Brown AS.** 1-6, 1995, *J Steroid Biochem Mol Biol.*, Vol. 53, pp. 103-10.

117. *Diazepam binding inhibitor and its processing products stimulate mitochondrial steroid biosynthesis via an interaction with mitochondrial benzodiazepine receptors.* **Papadopoulos V, Berkovich A, Krueger KE, Costa E, Guidotti A.** 3, 1991, *Endocrinology.*, Vol. 129, pp. 1481-88.

118. *Selective serotonin reuptake inhibitors directly alter activity of neurosteroidogenic enzymes.* **Griffin LD, Mellon SH.** 23, 1999, *Proc Natl Acad Sci USA*, Vol. 96, pp. 13512-17.

119. *Biosynthesis and action of neurosteroids.* **Mellon SH, Griffin LD, Compagnone N.** 2001, *Brain Research Reviews*, Vol. 37, pp. 3-12.

120. *Novel brain function: biosynthesis and actions of neurosteroids in neurons.* **Tsutsui K, Ukena K, Usui M, Sakamoto H, Takase M.** 4, 2000, *Neurosci Res.*, Vol. 36, pp. 261-73.

121. *A novel aspect of the cerebellum: biosynthesis of neurosteroids in the Purkinje cell.* **Tsutsui K, Sakamoto H, Ukena K.** 3, 2003, *Cerebellum.*, Vol. 2, pp. 215-22.

122. *Neurosteroid quantification in human brain regions: comparison between Alzheimer's and nondemented patients.* **Weill-Engerer S, David JP, Sazdovitch V, Liere P, Eychenne B, Pianos A, Schumacher M, Delacourte A, Baulieu EE, Akwa Y.** 11, 2002, *J Clin Endocrinol Metab.*, Vol. 87, pp. 5138-43.

123. *The anesthetic effects of steroid hormones.* **Seyle H.** 1941, Proc Soc Exp Biol Med, Vol. 46, pp. 106-12.

124. *Neurosteroids: biosynthesis and function of these novel neuromodulators.* **Compagnone NA, Mellon SH.** 1, 2000, Front Neuroendocrinol., Vol. 21, pp. 1-56.

125. *3 alpha-Hydroxy-5 beta-pregnan-20-one sulfate: A negative modulator of the NMDA-induced current in cultured neurons.* **Park-Chung M, Wu FS, Farb DH.** 1994, Mol Pharmacol, Vol. 46, pp. 146-50.

126. *Neurosteroids: biochemistry, modes of action, and clinical relevance.* **Mellon SH.** 5, 1994, J Clin Endocrinol Metab., Vol. 78, pp. 1003-8.

127. *Neurosteroids: GABAA-agonistic and GABAA-antagonistic modulators of the GABAA receptor.* **Majewska M.** 1991, E CaS Paul (Ed.), Neurosteroids and Brain Function, Thieme, New York., pp. 109-11.

128. *Implicación de los neuroesteroides en la conducta normal y patológica.* **Martín-García E, Darbra S, Pallarès M.** 11, 2007, Rev Neurol., Vol. 44, pp. 661-76.

129. *alpha4beta3delta GABA(A) receptors characterized by fluorescence resonance energy transfer-derived measurements of membrane potential.* **Adkins CE, Pillai GV, Kerby J, Bonnert TP, Haldon C, McKernan RM, Gonzalez JE, Oades K, Whiting PJ, Simpson PB.** 42, 2001, J Biol Chem., Vol. 276, pp. 38934-39.

130. *Pregnenolone sulfate and aging of cognitive functions: behavioral, neurochemical, and morphological investigations.* **Mayo W, Le Moal M, Abrous DN.** 2, 2001, Horm Behav., Vol. 40, pp. 215-17.

131. *Role of pregnenolone, dehydroepiandrosterone and their sulfate esters on learning and memory in cognitive aging.* **Vallée M, Mayo W, Le Moal M.** 1-3, 2001, Brain Res Brain Res Rev., Vol. 37, pp. 301-12.

132. *Steroid hormones and neurosteroids in normal and pathological aging of the nervous system.* **Schumacher M, Weill-Engerer S, Liere P, Robert F, Franklin RJ, Garcia-Segura LM, Lambert JJ, Mayo W, Melcangi RC, Parducz A, Suter U, Carelli C, Baulieu EE, Akwa Y.** 1, 2003, *Prog Neurobiol.*, Vol. 71, pp. 3-29.

133. *The neurosteroid pregnenolone sulfate infused into the medial septum nucleus increases hippocampal acetylcholine and spatial memory in rats.* **Darnaudéry M, Pallarés M, Piazza PV, Le Moal M, Mayo W.** 2, 2002, *Brain Res.*, Vol. 951, pp. 237-42.

134. *Glucocorticoid involvement in memory consolidation.* **Sandi C.** 9, 2003, *Rev Neurol.*, Vol. 37, pp. 843-48.

135. *The neurosteroid pregnenolone sulfate blocks deficits induced by a competitive NMDA antagonist in active avoidance and lever-press learning tasks in mice.* **Mathis C, Vogel E, Cagniard B, Criscuolo F, Ungerer A.** 8, 1996, *Neuropharmacology.*, Vol. 35, pp. 1057-64.

136. *The neurosteroid pregnenolone sulfate blocks NMDA antagonist-induced deficits in a passive avoidance memory task.* **Mathis C, Paul SM, Crawley JN.** 2, 1994, *Psychopharmacology (Berl.)*, Vol. 116, pp. 201-06.

137. *Pregnenolone sulfate antagonizes dizocilpine amnesia: role for allopregnanolone.* **Cheney DL, Uzunov D, Guidotti A.** 12, 1995, *Neuroreport.*, Vol. 6, pp. 1697-00.

138. *Individual differences in cognitive aging: implication of pregnenolone sulfate.* **Mayo W, George O, Darbra S, Bouyer JJ, Vallée M, Darnaudéry M, Pallarès M, Lemaire-Mayo V, Le Moal M, Piazza PV, Abrous N.** 1, 2003, *Prog Neurobiol.*, Vol. 71, pp. 43-8.

139. *Neurosteroids: deficient cognitive performance in aged rats depends on low pregnenolone sulfate levels in the hippocampus.* **Vallée M, Mayo W, Darnaudéry M, Corpéchet C, Young J, Koehl**

M, Le Moal M, Baulieu EE, Robel P, Simon H. 26, 1997, Proc Natl Acad Sci USA, Vol. 94, pp. 14865-70.

140. *The effects of pregnenolone sulfate and ethylestrenol on retention of a passive avoidance task.* **Isaacson RL, Varner JA, Baars JM, De Wied D.** 1, 1995, Brain Res., Vol. 689, pp. 79-84.

141. *A presynaptic action of the neurosteroid pregnenolone sulfate on GABAergic synaptic transmission.* **Mtchedlishvili Z, Kapur J.** 4, 2003, Mol Pharmacol., Vol. 64, pp. 857-64.

142. *Infusion of neurosteroids into the nucleus basalis magnocellularis affects cognitive processes in the rat.* **Mayo W, Dellu F, Robel P, Cherkaoui J, Le Moal M, Baulieu EE, Simon H.** 1-2, 1993, Brain Res., Vol. 607, pp. 324-28.

143. *Inhibition by the neurosteroid allopregnanolone of basal and stress-induced acetylcholine release in the brain of freely moving rats.* **Dazzi L, Sanna A, Cagetti E, Concas A, Biggio G.** 1-2, 1996, Brain Res., Vol. 710, pp. 275-80.

144. *The neurosteroid pregnenolone sulfate infused into the nucleus basalis increases both acetylcholine release in the frontal cortex or amygdala and spatial memory.* **Pallarés M, Darnaudéry M, Day J, Le Moal M, Mayo W.** 3, 1998, Neuroscience., Vol. 87, pp. 551-58.

145. *Inhibition by the neurosteroid allopregnanolone of basal and stress-induced acetylcholine release in the brain of freely moving rats.* **Dazzi L, Sanna A, Cagetti E, Concas A, Biggio G.** 1-2, 1996, Brain Res., Vol. 710, pp. 275-80.

146. *The neurosteroid pregnenolone sulfate reduces learning deficits induced by scopolamine and has promnestics in mice performing and appetitive learning task.* **Meziane H, Mathis C, Paul SM, Uregerer A.** 1996, Psychofarmacology, Vol. 126, pp. 323-30.

147. *The effects of pregnenolone on acquisition and retention of a flood search task.* **Isaacson RL, Yoder PE, Varner J.** 1994, Behav Neural Biol, Vol. 61, pp. 170-06.

148. *The promnesic neurosteroid pregnenolone sulfate increases paradoxical sleep in rats.* **Darnaudery M, Bouyer JJ, Pallarés M, Le Moal M, Mayo W.** 1999, *Brain rese*, Vol. 818, pp. 492-98.

149. *Sigma 1 receptor agonists and neurosteroids attenuate B25-35-amyloid peptide-induced cell death: mechanism of action.* **Maurice T, Su TP, Privat A.** 1998, *Neuroscience*, Vol. 83, pp. 413-28.

150. *Neurosteroids block the memory-impairing effects of ethanol in mice.* **Melchior CL, Ritzmann RF.** 1996, *Pharmacol Biochem Behav*, Vol. 53, pp. 51-6.

151. *DHEAS selectively impairs contextual-fearconditioning: support for the antigluocorticoid hypothesis.* **Fleshner M, Pugh CR, Tremblay D, Rudy JW.** 1997, *Behav Neurosci*, Vol. 111, pp. 512-17.

152. *Memory-enhancing effects in male mice of pregnenolone and steroids metabolically derived from it.* **Flood JF, Morley JE, Roberts E.** 1992, *Proc Natl Acad Sci USA*, Vol. 89, pp. 1567-71.

153. *The neurosteroids DHEA and DHEAS may influence cognitive performance by altering affective state.* **Frye CA, Lacey EH.** 1999, *Physiolo Behav*, Vol. 66, pp. 85-92.

154. *Effect of dehydroepiandrosterone on avoidance behaviour of adult male rats.* **Fetodova YO, Goncharov NP, Saprionov NS.** 2004, *Bull Exp Biol Med*, Vol. 138, pp. 54-7.

155. *Dehydroepiandrosterone is an anxiolytic in mice on the plus maze.* **Melchior CL, Ritzmann RF.** 1994, *Pharmacol Biochem Behav*, Vol. 47, pp. 437-41.

156. *Mitochondrial diazepam-binding inhibitor receptor complex agonist antagonize dizocilpine amnesia: putative role for allopregnanolone.* **Romeo E, Cheney DL, Zivkovic I, Costa E, Guidotti A.** 1994, *J Pharmacol Exp Ther*, Vol. 270, pp. 89-96.

157. *Allopregnanolone inhibits learning in the Morris water maze.* **Johansson IM, Birzniece V, Lindblad C, Olsson T, Bäckström T.** 2, 2002, *Brain Res.*, Vol. 934, pp. 125-31.

158. *Effects of pregnanolone alone and in combination with other positive GABA_A modulators on a complex behaviour in rats.* **Gerak LR, Stevenson MW, Winsauer PJ, Moerschbaeche JM.** 2004, *Psychopharmacology (Berl)*, Vol. 173, pp. 195-02.

159. *Neuroactive steroids in neuropsychopharmacology.* **Rupprecht R, Holsboer F.** 2001, *Int Rev Neurobiol*, Vol. 46, pp. 461-77.

160. *Neuroactive steroid regulation of neurotransmitter release in the CNS: action, mechanism and possible significance.* **Zheng P.** 2009, *Prog Neurobiol*, Vol. 89, pp. 134-52.

161. *Steroid hormone metabolites are barbiturate-like modulators of the GABA receptor.* **Majewska MD, Harrison NL, Schwartz RD, Barker JL, Paul SM.** 4753, 1986, *Science.*, Vol. 232, pp. 1004-07.

162. *Neurosteroid pregnenolone sulfate antagonizes electrophysiological responses to GABA in neurons.* **Majewska MD, Mienville JM, Vicini S.** 3, 1988, *Neurosci Lett.*, Vol. 90, pp. 279-84.

163. *Neurosteroids: endogenous regulators of the GABA(A) receptor.* **Belelli D, Lambert JJ.** 7, 2005, *Nat Rev Neurosci.*, Vol. 6, pp. 565-75.

164. *The neuropsychopharmacological potential of neuroactive steroids.* **Rupprecht, R.** 1997, *J Psychiatr Res*, Vol. 31, pp. 297-14.

165. *Increased levels of pregnenolone and its neuroactive metabolite allopregnanolone in autopsied brain tissue from cirrhotic patients who died in hepatic coma.* **Ahboucha S, Pomier-Layrargues G, Mamer O, Butterworth RF.** 4, 2006, *Neurochem Int.*, Vol. 49, pp. 372-8.

166. *The peripheral benzodiazepine receptor and neurosteroids in hepatic encephalopathy.* **Norenberg MD, Itzhak Y, Bender AS.** 1997, *Adv Exp Med Biol.*, Vol. 420, pp. 95-111.

167. *Pathophysiology of hepatic encephalopathy: The concept of synergism.* **Butterworth RF.** (suppl. 1), 2008, *Hepatology Research*, Vol. 38, pp. S116–S121.

168. *The function of the glutamate-nitric oxide-cGMP pathway in brain in vivo and learning ability decrease in parallel in mature compared with young rats.* **Piedrafita B, Cauli O, Montoliu C, Felipo V.** 4, 2007, *Learn Mem*, Vol. 14, pp. 254-8.

169. *A stereotaxic atlas of the rat brain.* **Pellegrino LJ, Pellegrino AS, Cushman AJ.** 1979, New York: Plenum Press.

170. *Intracerebral microdialysis: 30 years as a tool for the neuroscientist.* **Bourne JA.** 16-24, 2003, *Clin Exp Pharmacol Physiol.*, Vols. 1-2, p. 30.

171. *The effect of dizocilpine (MK-801) on conditional discrimination learning in the rat.* **Murray TK, Ridley RM.** 5, 1997, *Behav Pharmacol.* 1997 Oct;8(5):383-8., Vol. 8, pp. 383-88.

172. *Neurosteroid access to the GABAA receptor.* **Akk G, Shu HJ, Wang C, Steinbach JH, Zorumski CF, Covey DF, Mennerick S.** 50, 2005, *J Neurosci.*, Vol. 25, pp. 11605-13.

173. *Actions of 3 alpha,5 alpha-tetrahydrodeoxycorticosterone on single neurones of the mesencephalic reticular formation in the rat.* **Ermirio R, Bianchi D, Ruggeri P, Cogo CE, Molinari C.** 1-2, 1989, *Neurosci Lett.*, Vol. 104, pp. 115-20.

174. *Hyperammonemia alters the modulation by different neurosteroids of the glutamate-nitric oxide-cyclic gmp pathway through nmda- gaba(a) - or sigma receptors in cerebellum in vivo.* **González-Usano A*, Cauli O*, Agustí A, Felipo V.** 2012, *J Neurochem.*, p. Epub ahead of print.

175. *Anticonvulsant and behavioral effects of neuroactive steroids alone and in conjunction with diazepam.* **Gasior M, Carter**

RB, Goldberg SR, Witkin JM. 2, 1997, *J Pharmacol Exp Ther.*, Vol. 282, pp. 543-53.

176. *Chronic pregnenolone effects in normal humans: attenuation of benzodiazepine-induced sedation.* **Meieran SE, Reus VI, Webster R, Shafton R, Wolkowitz OM.** 4, 2004, *Psychoneuroendocrinology.*, Vol. 29, pp. 486-00.

177. *Pregnenolone sulfate: a positive allosteric modulator at the N-methyl-D-aspartate receptor.* **Wu FS, Gibbs TT, Farb DH.** 3, 1991, *Mol Pharmacol.*, Vol. 40, pp. 333-36.

178. *Dehydroepiandrosterone sulfate attenuates dizocilpine-induced learning impairment in mice via sigma 1-receptors.* **Maurice T, Junien JL, Privat A.** 1-2, 1997, *Behav Brain Res.*, Vol. 83, pp. 159-64.

179. *An increase in spinal dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAS) enhances NMDA-induced pain via phosphorylation of the NR1 subunit in mice: involvement of the sigma-1 receptor.* **Yoon SY, Roh DH, Seo HS, Kang SY, Moon JY, Song S, Beitz AJ, Lee JH.** 6, 2010, *Neuropharmacology.*, Vol. 59, pp. 460-67.

180. *Opipramol, a potent sigma ligand, is an anti-ischemic agent: neurochemical evidence for an interaction with the N-methyl-D-aspartate receptor complex in vivo by cerebellar cGMP measurements.* **Rao TS, Cler JA, Mick SJ, Ragan DM, Lanthorn TH, Contreras PC, Iyengar S, Wood PL.** 12, 1990, *Neuropharmacology.*, Vol. 29, pp. 1199-04.

181. *Neurosteroid quantification in human brain regions: comparison between Alzheimer's and nondemented patients.* **Weill-Engerer S, David JP, Sazdovitch V, Liere P, Eychenne B, Pianos A, Schumacher M, Delacourte A, Baulieu EE, Akwa Y.** 11, 2002, *J Clin Endocrinol Metab.*, Vol. 87, pp. 5138-43.

182. *Neurosteroid biosynthetic pathway changes in substantia nigra and caudate nucleus in Parkinson's disease.* **Luchetti S,**

Bossers K, Frajese GV, Swaab DF. 5, 2010, *Brain Pathol.* , Vol. 20, pp. 945-51.

183. *The neurosteroid system: an emerging therapeutic target for hepatic encephalopathy.* **Ahboucha S, Butterworth RF.** 3-4, 2007, *Metab Brain Dis.* , Vol. 22, pp. 291-08.

184. *Neurocognitive deficits in schizophrenia are associated with alterations in blood levels of neurosteroids: a multiple regression analysis of findings from a double-blind, randomized, placebo-controlled, crossover trial with DHEA.* **Ritsner MS, Strous RD.** 2, 2010, *J Psychiatr Res.*, Vol. 44, pp. 75-80.

185. *Sigma 1 receptor-related neuroactive steroids modulate cocaine-induced reward.* **Romieu P, Martin-Fardon R, Bowen WD, Maurice T.** 9, 2003, *J Neurosci.*, Vol. 23, pp. 3572-76.

186. *Sigma1 receptor ligands and related neuroactive steroids interfere with the cocaine-induced state of memory.* **Romieu P, Lucas M, Maurice T.** 7, 2006, *Neuropsychopharmacology*, Vol. 31, pp. 1431-43.

187. *Characterization of discriminative stimulus effects of the neuroactive steroid pregnanolone.* . **Engel SR, Purdy RH, Grant KA.** 2, 2001, *J Pharmacol Exp Ther.*, Vol. 297, pp. 489-95.

188. *Inhibition of the NMDA response by pregnenolone sulphate reveals subtype selective modulation of NMDA receptors by sulphated steroids.* **Malayev A, Gibbs TT, Farb DH.** 4, 2002, *Br J Pharmacol.*, Vol. 135, pp. 901-09.

189. *Possible role of nitric oxide in the nootropic and anti-amnesic effects of neurosteroids on aging- and dizocilpine-induced learning impairment.* **Reddy DS, Kulkarni SK.** 2, 1998, *Brain Research*, Vol. 799, pp. 215-29.

190. *Differential modulation of the glutamate-nitric oxide-cyclic GMP pathway by distinct neurosteroids in cerebellum in vivo.* **Cauli O*, González-Usano A*, Agustí A, Felipo V.** 2011, *Neuroscience.*, Vol. 190, pp. 27-36.

191. *Prolonged intracerebroventricular infusion of neurosteroids affects cognitive performances in the mouse.* **Ladurelle N, Eychenne B, Denton D, Blair-West J, Schumacher M, Robel P, Baulieu E.** 2, 2000, *Brain Res.*, Vol. 858, pp. 371-79.

192. *Gas chromatographic-mass fragmentographic quantitation of 3 alpha-hydroxy-5 alpha-pregnan-20-one (allopregnanolone) and its precursors in blood and brain of adrenalectomized and castrated rats.* **Cheney DL, Uzunov D, Costa E, Guidotti A.** 6, 1995, *J Neurosci.*, Vol. 15, pp. 4641-50.

193. *Developmental exposure to polychlorinated biphenyls PCB153 or PCB126 impairs learning ability in young but not in adult rats.* **Piedrafita B, Erceg S, Cauli O, Monfort P, Felipo V.** 1, 2008, *Eur J Neurosci.*, Vol. 27, pp. 177-82.

194. *Polychlorinated biphenyls PCB 153 and PCB 126 impair the glutamate-nitric oxide-cGMP pathway in cerebellar neurons in culture by different mechanisms.* **Llansola M, Piedrafita B, Rodrigo R, Montoliu C, Felipo V.** 2, 2009, *Neurotox Res.*, Vol. 16, pp. 97-105.

195. *Pregnenolone and pregnenolone sulfate, alone and with ethanol, in mice on the plus-maze.* **Melchior CL, Ritzmann RF.** 4, 1994, *Pharmacol Biochem Behav.*, Vol. 48, pp. 893-97.

196. *Presynaptic action of the neurosteroid pregnenolone sulfate on inhibitory transmitter release in cultured hippocampal neurons.* **Teschemacher A, Kasparov S, Kravitz EA, Rahamimoff R.** 1-2, 1997, *Brain Res.*, Vol. 772, pp. 226-32.

197. *A presynaptic action of the neurosteroid pregnenolone sulfate on GABAergic synaptic transmission.* **Mtchedlishvili Z, Kapur J.** 4, 2003, *Mol Pharmacol.*, Vol. 64, pp. 857-64.

198. *Contribution of hyperammonemia and inflammatory factors to cognitive impairment in minimal hepatic encephalopathy.* **Felipo V, Urios A, Montesinos E, Molina I, Garcia-Torres ML, Civera M, Olmo JA, Ortega J, Martinez-Valls J, Serra MA,**

Cassinello N, Wassel A, Jordá E, Montoliu C. 1, 2012, *Metab Brain Dis.*, Vol. 27, pp. 51-8.

