

VNIVERSITATŌ DE VALÈNCIA

CENTRO DE INVESTIGACIÓN PRÍNCIPE FELIPE

PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOMEDICINA Y FARMACIA



**ALTERACIONES NEUROLÓGICAS EN PACIENTES  
CIRRÓTICOS CON ENCEFALOPATÍA HEPÁTICA MÍNIMA.**

**IMPLICACIÓN DE LA INFLAMACIÓN Y EL ESTRÉS  
OXIDATIVO EN EL DETERIORO COGNITIVO**

**TESIS DOCTORAL**

**presentada por:**

**CARLA GIMÉNEZ GARZÓ**

**dirigida por:**

**DR. VICENTE FELIPE**

**DRA. CARMINA MONTOLIU**

**DR. FEDERICO V. PALLARDÓ**

**VALENCIA, 2014**



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

La Dra. **Carmina Montoliu Félix**, Investigadora de la FIHCV-INCLIVA y Profesora del departamento de Histología de la Universidad de Valencia,

El Dr. **Federico V. Pallardó Calatayud**, Investigador y Catedrático del departamento de Fisiología de la Universidad de Valencia,

CERTIFICAN:

Que la memoria de Tesis Doctoral realizada por D<sup>a</sup> Carla Giménez Garzó, titulada “**Alteraciones neurológicas en pacientes cirróticos con Encefalopatía Hepática Mínima. Implicaciones de la inflamación y el estrés oxidativo en el deterioro cognitivo**”, ha sido realizada bajo su dirección y reúne todos los requisitos necesarios para su juicio y calificación.

En Valencia, Marzo de 2014.

**Vicente Felipo**

**Carmina Montoliu**

**Federico V. Pallardó**





# **AGRADECIMIENTOS**

Por fin llegó el momento más esperado durante el proceso de escritura de la Tesis. Después de tantos meses deseando llegar a este apartado es inevitable sentir emoción al no saber por dónde empezar, así que allá voy...

En primer lugar, expresar a mi familia la gratitud que se merecen por respetar y apoyar siempre todas mis decisiones por arriesgadas que parezcan. A mis padres, Carlos y Charo, a quienes admiro profundamente por ser como son, por sus lecciones de humildad, y enseñarme a dejarme la piel en lo que hago y que no hay mayor satisfacción que la que se siente cuando consigues las cosas por ti mismo. Gracias por darme todo y hacer de mí lo que soy. A mi hermana Elena (*ma teta*) y a Raúl, que pese a los 400km que nos separan siempre están ahí para animarme, escucharme, aconsejarme, apoyarme y para lo que sea (también para preguntarme miles de veces si se puede tomar un ibuprofeno cada 6h!!!). Teta, los malos momentos existen para que podamos apreciar al máximo los buenos, 'Ànim i endavant!'. Y la dedicatoria esperada por todos...a mi Panxo!!!! ¿por qué?, por estar ahí, por su cariño incondicional y por ser un luchador.

A quienes me dieron la oportunidad de sumergirme en esta aventura, el Dr Vicente Felipo y la Dra Carmina Montoliu. Gracias por confiar en mí desde el principio, por no desistir cuando me ofuscaba y por enseñarme lo dura pero gratificante que puede llegar a ser la ciencia. Gracias por dirigirme y por aguantar todos mis lloriqueos. Al Dr Federico Pallardó por aceptar co-dirigir mi tesis, por las veces que se ha prestado a ayudarme y por ofrecerme nuevas oportunidades. De la misma manera, al Dr Serra, del Servicio de Digestivo del Hospital Clínico y a las doctoras Giner y González, del Hospital Arnau de Vilanova de Valencia, por facilitarme el trabajo y aportar a esta tesis lo fundamental, los pacientes, quienes también merecen unas palabras de agradecimiento. Al Dr Wassel, con mucho cariño, por darme la oportunidad de estar en la consulta, lo que me ha permitido conocer cada caso de principio a fin, y por su disponibilidad a nivel personal.

Toda nueva etapa tiene una anterior. Gracias a todos los que me acompañasteis durante la carrera, sobre todo a ti, Álvaro, que me viste hacer mis primeros pinitos en ciencia y me animaste siempre. Sé que estarás tan orgulloso de mí como yo de ti. Te mereces lo mejor, que es lo que poco a poco estás consiguiendo. Ánimo!

A mis amig@s, los de siempre, a los cuales veo poco pero hacen que disfrute al máximo de esos momentos, y que no paran de hacerme tía. A los que comparten conmigo más tiempo, Pablo e Iñaki (*pelé y melé*) por todas las horas que hemos echado juntos, tanto de carcajadas como de aburrimiento. A mi chico, Sergio, por empezar conmigo esta aventura, por aguantarme en mis momentos de histeria producto de mi facilidad para ahogarme en un vaso de agua. Por compartir conmigo las cosas que me gustan y por tus constantes ánimos. Espero que estés orgulloso. Te quiero.

Al 'Primado Reig Team', mis compañeros de piso. A los que ya no están y echo en falta: Irene, Elisa, Conchi, Juan (y sus guitarra), Cristian y Vera (te echo mucho de menos). Especial reconocimiento a los que han compartido conmigo el último año de esta locura: Fran, María y Carmen, gracias por estar ahí para ayudarme en los momentos malos, por no cansaros de preguntar todos los días 'que tal ha ido el día' (aunque llevase escrito en la frente 'no preguntes') y por ser mi familia durante todo este tiempo.

A mi grupo de laboratorio del CIPF, el I-06, Neurobiología. Por nuestras risas, nuestros agobios, nuestros momentos de 'rajadas'. Por ser el labo de las bienvenidas, las despedidas, los cumpleaños en fin, de los dulces y las derramas. A mis queridísimas técnicas, las mejores del mundo, Mar, Paqui y Mari Carmen, pilares fundamentales del grupo: por enseñarme, por dejar vuestros experimentos para ayudarme con alguna *cagada* siempre con una sonrisa y por hacer tan fácil el trabajo con vosotras. A Alba, por todo su apoyo desde que nos conocemos, por los momentos 'confesionario' y risas en quirófano, los sustos por los pasillos, y las peleas de hermanas. Ahora tienes el mejor título del mundo, el de madraza. A Andrea, por sus gracias ingeniosas y por la racionalidad de sus consejos. A Ana, por la serenidad que transmite y...por ser eres la caña de España!!!. A Vite, el romancero del labo, por enseñarnos un nuevo dialecto...el Orihuelano...y junto con Morris, por los momentos piscina. A Marta, por sus consejos mientras fumamos, y a Omar por el toque de humor que ponía en todo. A Miquel por repartir sonrisas y a Vitaly por su alegría y locura, y por ser un luchador incansable (que alguien se lo traduzca!!!). A las nuevas incorporaciones les deseo lo mejor y paciencia, muuuucha paciencia. Y por último a mi cachorrita Raquel, heredera de mi legado, sabes que aquí estoy para lo que sea baby!! Espero que nos queden muchas locuras que planear juntas, seremos la Bella y la Bestia (allá vamos, Tailandia!!!)

Después de 2 años en el CIPF, empecé un nuevo viaje en el Clínico, donde pese a mis temores de sentirme sola, me he sentido más acompañada que nunca. A todos los que me habéis acompañado (Fundación, UV, CIBERer...) que sin tener por qué hacerlo os volcasteis para hacerme un hueco en vuestras vidas. Sois muy grandes!!!

Carmina y Amparo (también mi co-directora!!), mis jefas, amigas, madres...habéis estado ahí a las duras y a las maduras. Gracias por cuidarme y por mimarme. Por todas las horas echadas juntas haciendo mil cosas a la vez (y todo para YA), y por dar la cara por mí. Ahora te toca a ti poner orden!!!! Jajaja (ya me entendéis). Os quiero mucho y podéis contar conmigo para lo que sea, queda aquí plasmado!!

A Layla, Carol y Chusa, por ser grandes compañeras y mejor personas. Layla, gracias por no tener en cuenta mi dejadez, y por entretenerme tanto con mis historietas pero sobre todo gracias por apoyarme en todo momento y por todo lo que atañe a nuestra relación personal. Carol, gracias por tus consejos, algunos un tanto arriesgados (jejeje). Espero continuar la amistad que hemos entablado. Os quiero.

A mis chulitos, Edu y Sergius, que rozáis la perfección como pareja artística (no tenéis precio), imposible contar tantos *pitis* y carcajadas, sin olvidar los maratones de chistes pésimos...pero sobre todo imposible olvidar todos los momentos compartidos (y el Tomorrowland Group, con mi pronunciación, evidentemente). Gracias por obligarme a reír cuando yo misma me lo prohibía. Sois increíbles chicos, os quiero INFINITO0000!! Edu, gracias por ser ese gran amigo, siempre dispuesto a contarme y que te cuente, a aconsejarme, a compartirlo todo, a sacar siempre mi mejor sonrisa y a darme un fuerte abrazo cuando lo necesito y no lo pido.

A mis chiquis, Santi i Marta, por estar ahí SIEMPRE, SIEMPRE, SIEMPRE!!! Gracias por vuestra nobleza, por ayudarme tanto sobre todo en este tramo final de mi tesis (un poco más y me redactáis la tesis). Marta gracias por tu sensatez, por confiar en mí, y por tus cariños. Santiago!! Gracias por despertarme miles de noches con tus 'wasaps', lo que hace que te odie en esos momentos, pero que se me pasa cuando sueltas la gilipollez!!!. Sabes que te quiero con locura y que desde el principio nuestras *profundas* conversaciones han hecho que te adore. Mil gracias a los dos por obligarme a levantarme cuando caigo, y por no desistir en implicarme en vuestros planes. Gracias también por preocuparos tanto por mi futuro inmediato, sois grandes amigos. Os quiero con locura.

A los demás miembros del CIBERer. Josele, eres un crack a nivel profesional y personal, una de esas personas con la que da gusto trabajar. A Lorena por tu dulzura, y que al igual que tu marido, os dejáis el alma ayudando a todo el mundo. A Isa, gracias por ayudarme, eres una gran persona y una gran técnico.

A mis 'adorables vecinos'. Al Dr Dasí y a su mujer Mer por tener siempre una sonrisa guardada para mí. A los nuevos, el Climent's Team, unos cracks!! Joan, te esperan cosas grandes, te lo mereces y espero verlo. A la tropa peligrosa (Chiri, Alberto, Jaume, Ray), por ser tan atentos, tan cariñosos y tan GRANDES!! Con vosotros...quien dijo 'contexto'!! Gracias chicos por hacer tan amenos los días, sois geniales (plasmado queda el momento del Chiri con su 'recortada').

A Sandra, Bego y Ari, por vuestro cariño y por ponerle siempre buena cara al mal tiempo. Hacéis que todo parezca más fácil. Os adoro.

En fin, gracias a todos y cada uno de vosotros (y muchos más a los que no he nombrado) por ser como sois y por quererme como soy. Habéis sido unos compañeros de viaje increíbles.

Ojalá nos queden muchas risas juntos.

***“La ciencia será siempre una búsqueda, jamás un descubrimiento real. Es un viaje,  
nunca una llegada ”***

**(Karl Popper)**



**A mi família**



## ABREVIATURAS

---

<b>2VP:</b>	<b>2-Vinilpiridina</b>
<b>3-NT:</b>	<b>3-Nitrotirosina</b>
<b>8-OH-dG:</b>	<b>8-hidroxi-deoxiguanosina</b>
<b>ADN:</b>	<b>Ácido Desoxiribonucleico</b>
<b>ARN:</b>	<b>Ácido Ribonucleico</b>
<b>CAT:</b>	<b>Catalasa</b>
<b>CMF:</b>	<b>Clorometilfluoreceína</b>
<b>DAF:</b>	<b>Diaminofluoresceína</b>
<b>DCF:</b>	<b>Diclorofluoresceína</b>
<b>DHR:</b>	<b>Dihidrorodamina</b>
<b>DNP:</b>	<b>Dinitrofenilhidrazina</b>
<b>EH:</b>	<b>Encefalopatía hepática</b>
<b>EHM:</b>	<b>Encefalopatía hepática mínima</b>
<b>FCCP:</b>	<b><i>Carbonyl cyanide 4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazone</i></b>
<b>GMPc:</b>	<b>Guanosin Monofosfato cíclico</b>
<b>GR:</b>	<b>Glutación Reductasa</b>
<b>GPx:</b>	<b>Glutación Peroxidasa</b>
<b>GSH:</b>	<b>Glutación reducido</b>
<b>GSSG:</b>	<b>Glutación oxidado</b>
<b>GST:</b>	<b>Glutación S-Transferasa</b>
<b>HE:</b>	<b>Hidroetidina</b>
<b>HPLC:</b>	<b><i>High-performance liquid chromatography</i></b>
<b>IL:</b>	<b>Interleucina</b>
<b>MELD:</b>	<b><i>Model for end-stage Liver Disease</i></b>
<b>MDA:</b>	<b>Malondialdehido</b>
<b>MTX:</b>	<b>MitoSox</b>
<b>NO:</b>	<b>Óxido nítrico</b>
<b>OR:</b>	<b><i>Odds ratio</i></b>
<b>PHES:</b>	<b><i>Psychometric Hepatic Encephalopathy Score</i></b>
<b>Pb:</b>	<b>Plumbagina</b>
<b>Pc:</b>	<b>Percentil</b>
<b>ROS:</b>	<b>Especies reactivas del oxígeno</b>
<b>RNS:</b>	<b>Especies reactivas del nitrógeno</b>
<b>SOD:</b>	<b>Superóxido Dismutasa</b>
<b>TMRM:</b>	<b>Tetrametilrodamina</b>
<b>TNF-<math>\alpha</math>:</b>	<b>Factor de necrosis tumoral</b>
<b>VPP:</b>	<b>Valor predictivo positivo</b>
<b>VPN:</b>	<b>Valor predictivo negativo</b>





# ÍNDICE

---

<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>1. CIRROSIS HEPÁTICA</b> .....	3
1.1. ALTERACIONES ASOCIADAS A LA CIRROSIS .....	5
1.1.1. HIPERAMONEMIA .....	5
1.1.2. INFLAMACIÓN .....	5
1.1.2.1. Mediadores de la inflamación .....	6
1.1.2.2. Inflamación sistémica .....	9
1.1.3. ESTRÉS OXIDATIVO/NITROSATIVO .....	9
<b>2. ENCEFALOPATÍA HEPÁTICA</b> .....	12
2.1. ENCEFALOPATÍA HEPÁTICA MÍNIMA (EHM) .....	13
2.2. ALTERACIONES NEUROLÓGICAS DE LA EH Y EHM .....	14
2.2.1. ALTERACIONES NEUROPSIQUIÁTRICAS .....	14
2.2.2. ALTERACIONES COGNITIVAS .....	15
2.2.3. ALTERACIONES MOTORAS .....	17
2.2.4. OTRAS ALTERACIONES NEUROPSIQUIÁTRICAS .....	20
2.3. FACTORES QUE CONTRIBUYEN A LA EH CLÍNICA Y MÍNIMA .....	21
2.3.1. HIPERAMONEMIA .....	21
2.3.2. INFLAMACIÓN .....	23
2.3.2.1. Inflamación en pacientes con Encefalopatía Hepática. Sinergia entre hiperamonemia e inflamación .....	23
2.3.2.2. Inflamación en modelos animales de encefalopatía hepática crónica. Sinergia entre hiperamonemia e inflamación en la inducción de encefalopatía hepática .....	24
2.3.3. NEUROINFLAMACIÓN .....	24
2.3.3.1. Neuroinflamación en pacientes con Encefalopatía Hepática Crónica .....	25
2.3.3.2. Neuroinflamación en modelos animales de Encefalopatía Hepática Crónica .....	26
<b>3. ESTRÉS OXIDATIVO/NITROSATIVO</b> .....	27
3.1. CONCEPTO DE ESTRÉS OXIDATIVO .....	27
3.2. RADICALES LIBRES .....	28
3.2.1. TIPOS DE RADICALES LIBRES .....	28
3.2.1.1. Radicales libres derivados del oxígeno .....	29
3.2.1.2. Radicales libres derivados del nitrógeno .....	33
3.2.2. GENERACIÓN DE LOS RADICALES LIBRES .....	34
3.2.2.1. Fuentes exógenas generadoras de radicales libres .....	34

# ÍNDICE

---

3.2.2.1. Fuentes endógenas generadoras de radicales libres .....	34
3.3. INDICADORES DE ESTRÉS OXIDATIVO .....	39
3.3.1. DAÑO OXIDATIVA DE BIOMOLÉCULAS .....	39
3.3.2. COCIENTE GSSG/GSH COMO INDICADOR DE ESTRÉS OXIDATIVO.....	41
3.4. 3-NITROTIROSINA .....	42
3.5. POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL .....	43
3.6. SISTEMAS ANTIOXIDANTES .....	44
3.6.1. ENZIMAS ANTIOXIDANTES .....	45
3.6.1.1. Catalasa .....	45
3.6.1.2. Superóxido Dismutasa.....	45
3.6.1.3. Glutación Peroxidasa .....	47
3.6.1.4. Glutación Reductasa .....	48
3.6.1.5. Glutación S-Transferasa.....	48
3.6.2. ANTIOXIDANTES NO ENZIMÁTICOS .....	49
3.6.2.1. Glutación .....	49
<b>4. ESTRÉS OXIDATIVO EN EH CLÍNICA Y MÍNIMA .....</b>	<b>54</b>
4.1. ESTRÉS OXIDATIVO/NITROSATIVO EN MODELOS ANIMALES DE EH CRÓNICA .....	54
4.2. ESTRÉS OXIDATIVO/NITROSATIVO EN PACIENTES CON EH CRÓNICA.....	55
<b>II. OBJETIVOS.....</b>	<b>59</b>
<b>III. MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>63</b>
1. PACIENTES Y CONTROLES.....	65
1.1. EXTRACCIÓN DE LA SANGRE .....	66
1.2. REALIZACIÓN DE LOS TESTS PSICOMÉTRICOS .....	66
2. DIAGNÓSTICO DE ENCEFALOPATÍA HEPÁTICA MÍNIMA .....	67
2.1. PHES.....	67
2.2. FRECUENCIA CRÍTICA DE PARPADEO (FCP) .....	68
3. ESTUDIO DE LAS ALTERACIONES COGNITIVAS EN PACIENTES CON EHM .....	69
3.1. TEST STROOP DE COLORES Y PALABRAS.....	69
3.2. TEST d2 .....	71
3.3. TEST ORAL DE CLAVES .....	73
3.4. TEST ORAL DE DÍGITOS.....	74
3.5. TEST ORAL DE LETRAS Y NÚMEROS .....	74

# ÍNDICE

---

4. ESTUDIO DE ALTERACIONES EN LA COORDINACIÓN MOTORA EN PACIENTES CON EHM.....	75
4.1. TEST DE COORDINACIÓN BIMANUAL.....	75
4.2. TEST DE COORDINACIÓN VISUOMOTORA.....	75
5. DETERMINACIÓN DE AMONIO EN SANGRE .....	76
6. AISLAMIENTO DE CÉLULAS MONONUCLEARES.....	77
7. AISLAMIENTO DE ERITROCITOS .....	78
8. DETERMINACIÓN DE CITOCINAS PRO-INFLAMATORIAS .....	79
8.1. DETERMINACIÓN DE INTERLEUCINA-18 .....	79
8.2. DETERMINACIÓN DE INTERLEUCINA-6 .....	79
9. DETERMINACIÓN DE NITRATOS Y NITRITOS .....	80
10. DETERMINACIÓN DE GMPc.....	81
11. DETERMINACIÓN DE 3-NITROTIROSINA LIBRE POR HPLC .....	82
12. ACTIVIDAD DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES.....	83
12.1. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS .....	83
12.1.1. LISIS DE ERITROCITOS .....	83
12.1.2. LISIS DE CÉLULAS MONONUCLEARES.....	83
12.2. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES.....	84
12.2.1. ACTIVIDAD CATALASA (CAT) .....	84
12.2.1.1. ACTIVIDAD CAT EN ERITROCITOS .....	84
12.2.1.2. ACTIVIDAD CAT EN CÉLULAS MONONUCLEARES.....	85
12.2.2. ACTIVIDAD SUPERÓXIDO DISMUTASA (SOD) .....	86
12.2.2.1. ACTIVIDAD SOD EN ERITROCITOS.....	87
12.2.2.2. ACTIVIDAD SOD EN CÉLULAS MONONUCLEARES .....	88
12.2.3. ACTIVIDAD GLUTATIÓN PEROXIDASA (GPx).....	89
12.2.4. ACTIVIDAD GLUTATIÓN REDUCTASA (GR) .....	90
12.2.5. ACTIVIDAD GLUTATIÓN S-TRANSFERASA (GST) .....	91
13. MEDIDA DE HEMOGLOBINA EN ERITROCITOS.....	92
14. MEDIDA DE PROTEINA EN CÉLULAS MONONUCLEARES .....	93
15. DETERMINACIÓN DE ANTIOXIDANTES NO ENZIMÁTICOS: GLUTATIÓN .....	94
16. MARCADORES DE DAÑO OXIDATIVO/NITROSATIVO EN LAS BIOMOLÉCULAS .....	96
16.1. DETERMINACIÓN DE LA CARBONILACIÓN DE PROTEÍNAS .....	96
16.2. DETERMINACIÓN DE MALONDIALDEHÍDO (MDA) POR HPLC.....	97
16.3. DETERMINACIÓN DE 8-HIDROXIDEOXIGUANOSINA (8-OHdG).....	98
17. ESTUDIO DEL ESTRÉS OXIDATIVO/NITROSATIVO MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO .....	99
18. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS .....	101

# ÍNDICE

---

<b>IV. RESULTADOS</b> .....	103
1. Estudio de alteraciones neurológicas en pacientes con EHM.....	105
1.1. Diagnóstico de la EHM en pacientes cirróticos.....	105
1.2. Alteraciones en coordinación motora en EHM: Coordinación Bimanual y Visuomotora.....	108
1.3. Estudio de las alteraciones cognitivas en pacientes con EHM.....	110
1.3.1. Atención selectiva: Test de Stroop.....	110
1.3.2. Atención selectiva/sostenida y concentración: Test d2.....	111
1.3.3. Test oral de Claves.....	114
1.3.4. Test oral de Dígitos.....	115
1.3.5. Test oral de Letras y Números.....	116
1.4. Capacidad predictiva de EHM de los tests neurológicos.....	117
1.4.1. Coordinación motora: Bimanual y Visuomotora.....	117
1.4.2. Atención selectiva: test Stroop y test oral de Claves.....	118
1.4.3. Atención selectiva/sostenida y concentración: Test d2.....	118
1.4.4. Memoria de trabajo: tests orales de Dígitos y Letras y Números.....	119
2. Análisis de las alteraciones bioquímicas en pacientes con EHM.....	120
2.1. Hiperamonemia.....	120
2.2. Inflamación.....	120
2.3. Nitratos/Nitritos en plasma.....	121
2.4. GMPc plasmático.....	122
3. Análisis del estrés oxidativo/nitrosativo en EHM.....	123
3.1. 3-Nitrotirosina como indicador de estrés oxidativo/nitrosativo.....	123
3.2. Mecanismos antioxidantes.....	124
3.2.1. Actividades de enzimas antioxidantes.....	124
3.2.1.1. Actividad Catalasa.....	124
3.2.1.2. Actividad SOD.....	125
3.2.1.3. Actividad GPx.....	126
3.2.1.4. Actividad GR.....	127
3.2.1.5. Actividad GST.....	128
3.2.2. Mecanismo antioxidante no enzimático: GSH.....	129
3.3. Daño oxidativo/nitrosativo en biomoléculas.....	130
3.3.1. Carbonilación de proteínas.....	130
3.3.2. Oxidación del ADN: 8-OHdG.....	131
3.3.3. Oxidación de lípidos: MDA.....	132
4. Correlación entre inflamación, estrés oxidativo y algunas alteraciones neurológicas en pacientes con EHM.....	133

# ÍNDICE

---

4.1. Inflamación e Hiperamonemia.....	133
4.2. Daño oxidativo/nitrosativo de biomoléculas.....	135
4.3. Correlación de las actividades de las enzimas antioxidantes con las alteraciones neurológicas, inflamación e hiperamonemia.....	138
4.3.1. Actividad de las enzimas antioxidantes en eritrocitos .....	138
4.3.2. Actividad de las enzimas antioxidantes en células mononucleares.....	139
5. Estudio del estrés oxidativo/nitrosativo mediante citometría de flujo .....	141
5.1. Peróxido de Hidrógeno .....	142
5.2. Anión Superóxido celular .....	147
5.3. Anión Superóxido mitocondrial .....	152
5.4. Óxido Nítrico.....	157
5.5. Peróxidos y Peroxinitrito .....	162
5.6. Tioles reducidos (GSH) .....	167
5.7. Potencial de membrana mitocondrial .....	172
6. Correlación entre especies reactivas del oxígeno/nitrógeno (ROS/RNS) en células de la serie blanca, daño oxidativo, inflamación, hiperamonemia y algunas alteraciones neurológicas en pacientes con EHM .....	177
6.1. Correlación entre ROS/RNS y parámetros bioquímicos .....	177
6.1.1. Inflamación.....	177
6.1.2. GMPc plasmático .....	177
6.1.3. Hiperamonemia .....	177
6.2. Correlación entre ROS/RNS y marcadores de daño oxidativo.....	178
6.2.1. Ratio GSSG/GSH en sangre total.....	178
6.2.2. 3-Nitrotirosina en suero .....	178
6.2.3. MDA en suero .....	178
6.2.4. 8-OHdG en suero.....	178
6.3. Correlación entre ROS/RNS y alteraciones cognitivas.....	179
6.3.1. Puntuación en la batería PHES.....	179
6.3.2. Atención selectiva-sostenida y concentración mental: test d2 .....	179
6.3.3. Atención selectiva: test Stroop y test oral de Claves .....	180
6.3.4. Memoria de trabajo: tests orales de Dígitos y Letras y Números .....	180
6.4. Correlación entre ROS/RNS y alteraciones motoras .....	180
6.4.1. Coordinación bimanual.....	180
6.4.2. Coordinación visuomotora .....	181

# ÍNDICE

---

<b>V. DISCUSIÓN</b> .....	187
1. Alteraciones cognitivas y motoras en pacientes cirróticos con EHM .....	189
1.1. Alteraciones cognitivas en pacientes con EHM .....	191
1.1.1 Atención selectiva .....	191
1.1.2. Atención selectiva-sostenida y concentración mental .....	192
1.1.3. Memoria de trabajo .....	193
1.2. Alteraciones en la coordinación motora.....	194
2. Alteraciones bioquímicas en pacientes cirróticos con EHM .....	195
3. Estrés oxidativo en pacientes cirróticos con EHM.....	196
3.1. Daño oxidativo/nitrosativo y mecanismos antioxidantes.....	196
3.2. Alteraciones en especies reactivas del oxígeno/nitrógeno, potencial de membrana mitocondrial y glutatión reducido en células mononucleares sanguíneas.....	202
3.2.1. Niveles basales de ROS/RNS, potencial de membrana mitocondrial y GSH..	203
3.2.2. Respuesta celular al aumento de ROS/RNS .....	207
<b>VI. CONCLUSIONES</b> .....	213
<b>VII. ANEXO</b> .....	217
<b>VIII. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	223

# **I. INTRODUCCIÓN**





# 1. CIRROSIS HEPÁTICA

La cirrosis hepática es el estadio final de un proceso de fibrosis progresiva secundaria a un daño hepático crónico, caracterizándose por la distorsión de la arquitectura del hígado y formación de nódulos de regeneración. Esto puede desencadenar una hipertensión portal e insuficiencia hepatocelular.

Las principales causas de la cirrosis hepática son el consumo de alcohol, virus de hepatitis C y el hígado graso asociado a la obesidad (Friedman et al, 2004).

En la práctica clínica, el diagnóstico de la cirrosis se establece en base a una biopsia hepática con presencia de nódulos de regeneración, o por combinación de datos clínicos (indicios de cirrosis), analíticos (hiperbilirrubinemia, coagulopatía...) y radiológicos (morfología nodular o heterogénea) característicos de esta patología.

- **Epidemiología de la cirrosis**

Aunque se desconoce con exactitud, se estima que la prevalencia de la cirrosis hepática en Estados Unidos es del 0,15% en la población general (Bethesda MD: National Institutes of Health, 1994). En 2006, la cirrosis fue la 12ª causa de muerte en este país (Heron et al, 2009).

Sin embargo, existen varios factores que hacen pensar que la prevalencia de esta patología es mayor (Schuppan and Afdhal, 2008), ya que hay causas de enfermedad hepática que pueden no ser diagnosticadas, como las infecciones crónicas por virus B y C, o la esteatohepatitis. Por otro lado, hay que tener en cuenta que la cirrosis en su fase compensada, es indetectable durante largos periodos de tiempo.

- **Estadíos de la cirrosis**

La cirrosis se caracteriza por una fase sin síntomas evidentes, denominada ‘cirrosis compensada’, seguida de una progresión a una fase de ‘cirrosis descompensada’ caracterizada por complicaciones derivadas de la hipertensión portal y de la insuficiencia hepática. En la fase de cirrosis compensada, la presión portal no suele provocar varices gastro-esofágicas ni ascitis. Sin embargo, conforme el daño hepático avanza, esta presión aumenta y la función hepática disminuye, dando lugar a ascitis, hemorragia digestiva, ictericia y encefalopatía hepática. Estos son los síntomas que marcan el paso de una fase a la siguiente.

En clínica, el estadio de la cirrosis se establece en base a las siguientes escalas de función hepática:

- Child-Pugh (Child and Turcotte, 1964): es la más utilizada y permite clasificar la gravedad, riesgo quirúrgico y el pronóstico global (Tabla 1)
- MELD (Kamath et al, 2001) : es un índice pronóstico de la cirrosis en su fase avanzada, que se aplica principalmente para la priorización de trasplantes hepáticos a los pacientes (Tabla 1)

**Tabla 1. Escalas Child-Pugh y MELD.**

<b>Clasificación Child-Pugh</b>			
<b>Parámetros/Puntos</b>	<b>1 punto</b>	<b>2 puntos</b>	<b>3 puntos</b>
<b>Bilirrubina</b>	< 2 mg/dl	2-3 mg/dl	> 3 mg/dl
<b>Albúmina</b>	> 3,5 mg/dl	2,8-3,5 mg/dl	< 3,5 mg/dl
<b>Tiempo Protrombina</b>	> 50% < INR 1,7	30-50% INR 1,7-2,3	< 30% > 2,3
<b>Ascitis</b>	No	Leve	Moderada-grave o con diuréticos
<b>Encefalopatía Hepática</b>	No	Grados I-II	Grados III-IV
<b>Índice MELD</b>			
<b>MELD= 9,6 x [Ln creatinina (mg/dl)] + 3,8 [Ln bilirrubina (mg/dl)] + 11,2 [Ln INR] + 6.4</b>			

El Child-Pugh se puntúa con un número y una letra dependiendo de la gravedad de la cirrosis: Child A ≤6 puntos; Child B= 7-9 puntos; Child C ≥ 10 puntos. Abreviaturas: INR (International Normalized Ratio), MELD (Model for End-stage Liver Disease), Ln (logaritmo neperiano)

## **1.1. ALTERACIONES ASOCIADAS A LA CIRROSIS**

La alteración de la función hepática en cirrosis conduce a una amplia variedad de alteraciones en la detoxificación de distintas sustancias y metabolitos y en la síntesis y secreción de algunas moléculas como la albúmina, entre otras. Dada su relevancia en la inducción de la encefalopatía hepática y en el contexto de esta tesis, se describen a continuación tres de las alteraciones más relevantes: hiperamonemia, inflamación y estrés oxidativo.

### **1.1.1. HIPERAMONEMIA**

El amonio es un producto del metabolismo de proteínas y otros compuestos nitrogenados. A concentraciones altas, es tóxico y altera la función del sistema nervioso central (SNC).

Normalmente, el amonio es detoxificado en el hígado por incorporación en urea mediante el ciclo de la urea, que es posteriormente eliminada en la orina. En otros tejidos como el cerebro, músculo, etc, el amonio se detoxifica por incorporación en glutamina que se transporta al hígado donde la glutaminasa la escinde en glutamato y amonio que, se incorpora en urea para su eliminación.

En enfermedades hepáticas, como la cirrosis, el amonio no es eliminado eficientemente, aumentando así sus niveles tanto en sangre como en cerebro, actuando como agente neurotóxico. Datos experimentales y clínicos apoyan que la hiperamonemia juega un papel esencial en el desarrollo de la Encefalopatía Hepática (HE). (Ver apartado 2.3.1)

### **1.1.2. INFLAMACIÓN**

La inflamación es la respuesta inmune del organismo frente a agresiones externas o a agentes patógenos. Este proceso se caracteriza por un aumento del flujo sanguíneo en la zona afectada y diversos tipos de respuestas celulares, con el objetivo de aislar y destruir el agente nocivo.

El proceso inflamatorio se puede desencadenar por agentes biológicos (bacterias, virus, hongos, parásitos), por agentes químicos (toxinas, venenos, ácidos, etc), agentes físicos (radiaciones, calor, frío, etc), traumatismos, alteraciones vasculares (isquemia) o alteraciones inmunitarias (hipersensibilidad, enfermedades autoinmunes, etc).

En la inflamación, participan distintos tipos celulares (macrófagos, leucocitos, etc) y mediadores de la inflamación, que son pequeñas biomoléculas que median la comunicación intercelular. Estos mediadores pueden ser de origen lipídico (prostaglandinas, leucotrienos, tromboxanos), proteico (citocinas, factores de crecimiento, interleucinas, etc) y aminas vasoactivas (serotonina, histamina), y, amplifican la respuesta inflamatoria uniéndose a receptores específicos presentes en las células diana.

### **1.1.2.1. Mediadores de la inflamación:**

- **Derivados del ácido araquidónico:** también denominados eicosanoides, son productos de las enzimas ciclooxigenasa 1, 2 y 3 (COX-1, COX-2, COX-3) y lipooxigenasas. Las COX producen prostaglandinas (PG): PGE<sub>2</sub>, PGI<sub>2</sub> o prostaciclina, PGD<sub>2</sub> y PGF, y tromboxanos (TX) (Hecker, 1995). Las lipooxigenasas producen los leucotrienos.

Las prostaglandinas se encuentran en la mayoría de tejidos en mamíferos y median en multitud de procesos fisiológicos y patológicos. COX-2 se induce en procesos inflamatorios y es el principal productor de PGE<sub>2</sub> que aumenta en procesos inflamatorios (Lee et al, 1992). Los macrófagos sintetizan PGE<sub>2</sub> en respuesta a mediadores pro-inflamatorios como el TNF- $\alpha$ , IL-1 o lipopolisacáridos (LPS) bacterianos (Reddy and Herschman, 1994; Levi et al, 1998). Esta prostaglandina es un potente vasodilatador y sus efectos se producen a través de receptores presentes en sus células diana.

Las isoformas de la ciclooxigenasa, COX-1 y COX-2, presentan diferencias en su expresión y distribución tisular y en su función celular y fisiológica.

La COX-1 es constitutiva y se expresa en la mayoría de tejidos. Por ello se le atribuye, además de la función en procesos inflamatorios, funciones homeostáticas como la protección de la mucosa intestinal, mantenimiento del flujo sanguíneo renal o participación en la agregación plaquetaria (Simon, 1999; Vonkeman and van de Laar, 2010).

La COX-2 en condiciones normales no se expresa en la mayoría de tejidos, aunque es constitutiva en cerebro y riñones (Fung and Kirschenbaum, 1999). La expresión de COX-2 se induce en respuesta a diferentes estímulos inflamatorios como el interferón  $\gamma$  (IFN-  $\gamma$ ), factor

de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleucina 1 (IL-1), factores de crecimiento, etc (Mollace et al, 2005; Ye et al, 2010). Debido a que la COX-2 es la isoforma inducible se considera que las PG que produce están involucradas en procesos de inflamación mientras que a las PG liberadas por la COX-1 se les atribuye el mantenimiento de funciones fisiológicas. La COX-3 es una isoforma de la COX1. Se ha observado en humanos una abundante expresión del RNA mensajero de COX-3 en corteza cerebral y corazón. La inhibición de esta isoforma podría contribuir al efecto antipirético de muchos antiinflamatorios no esteroideos.

- **Citocinas:** Las principales citocinas pro-inflamatorias que participan en la respuesta inflamatoria son la interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), interleucina-6 (IL-6), factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleucina-8 (IL-8), así como las interleucinas 12, 16 y 18 (IL-12, IL-16 e IL-18). Por otra parte participan las interleucinas anti-inflamatorias como la interleucina 4 (IL-4) e interferones como el gamma (IFN- $\gamma$ ).

Las células que producen TNF- $\alpha$  son principalmente monocitos/macrófagos, linfocitos T, neutrófilos, mastocitos y células endoteliales (Feldmann et al, 2001). In vivo, la citocina que se secreta al principio del proceso inflamatorio es el TNF- $\alpha$  cuyos niveles séricos en ratones aumentan 30 minutos después de un estímulo inflamatorio (Tracey et al, 1987). Si se bloquea la liberación de TNF- $\alpha$  en respuesta a un estímulo inflamatorio in vivo, la expresión de otras citocinas como IL-1 o IL-6 se reduce (Fong et al, 1989), sugiriendo que TNF- $\alpha$  es esencial para la iniciación o amplificación de la liberación de IL-1 e IL-6. Este dato junto con experimentos análogos in vitro (Brennan et al, 1989) indican que el TNF- $\alpha$  coordina la respuesta de citocinas tras un daño. El TNF- $\alpha$  induce diversas quimiocinas y moléculas de adhesión (Doukas and Pober, 1990; Schroder et al, 1990) lo que acelera la atracción de leucocitos inflamatorios al lugar del daño y la liberación de más TNF- $\alpha$ . Además el TNF- $\alpha$  aumenta la función del sistema inmune aumentando la proliferación de linfocitos T, aunque exposiciones excesivamente prolongadas al TNF- $\alpha$  producen inmunosupresión (Yokota et al, 1988; Gordon and Wofsy, 1990).

Las interleucinas (ILs) son una familia de polipéptidos pertenecientes al grupo de citocinas. Son secretadas principalmente por leucocitos. Su principal función es regular las funciones relacionadas con este tipo de células: activación, diferenciación o proliferación celular, secreción de anticuerpos, quimiotaxis y regulación de otras citocinas. La interleucina 1 (IL-1) la producen los macrófagos, monocitos y células dendríticas en respuesta a la liberación del TNF- $\alpha$  (Feldmann et al, 2001). Existen 3 isoformas IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-1RA. La IL-1 $\beta$  está implicada en la patogénesis de diferentes enfermedades que cursan con inflamación como

artritis reumatoide (Gattorno et al, 2008) o la enfermedad de Crohn (Kahle et al, 1992). La IL-6 es secretada por macrófagos, células T, células endoteliales y fibroblastos y participa en la fase aguda. Su liberación es inducida por la IL-1 y se incrementa en respuesta a TNF- $\alpha$ . Es una citocina proinflamatoria. La interleucina-8 (IL-8) se sintetiza en fibroblastos, células endoteliales, monocitos, macrófagos y células dendríticas. Es un potente factor quimiotáctico de neutrófilos. Amplifica la respuesta inflamatoria local. La interleucina-12 (IL-12) es producida por los macrófagos, monocitos y otras células presentadoras de antígenos. Promueve la activación de la inmunidad celular activando las células T colaboradoras de tipo 1 (Th1) y estimula la producción y citotoxicidad de las células T citotóxicas y de las células Natural Killer (NK). Tiene un efecto sinérgico con el TNF- $\alpha$  en la inducción de interferón- $\gamma$ . La IL-16 es producida por los linfocitos T y actúa como quimiotáctico específico de eosinófilos. La IL-4 es una citocina anti-inflamatoria responsable del control de la inflamación del cerebro. La IL-4 reduce la producción de COX-2 y de mediadores inflamatorios como TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  por microglia activa *in vivo* e *in vitro* (Ledebøer et al, 2000; Furlan et al, 2000). La IL-18 es producida tanto por células del sistema inmune como células de otros sistemas (células intestinales y células epiteliales del sistema respiratorio). En colaboración con IL-12, IL-18 estimula una respuesta inmune de tipo Th1, la cual juega un papel clave en la defensa frente a microorganismos mediante la inducción del interferón- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ). Además la sobreproducción de IL-12 y IL-18 induce severos procesos inflamatorios, sugiriendo que IL-18 es una potente citocina proinflamatoria implicada en la fisiopatología de la inflamación (Nakanishi et al, 2001). IL-18 está implicada a parte, también en respuestas de tipo Th2 (Striz et al, 2005).

- **Aminas vasoactivas:** la serotonina y la histamina. Se almacenan en gránulos en distintos tipos celulares, y son mediadores precoces de la inflamación. Los principales productores de histamina son los mastocitos, aunque también pueden producirla basófilos y plaquetas. La histamina participa en la inflamación dilatando las arteriolas y aumentando la permeabilidad de las vénulas. La serotonina produce efectos similares y está presente en plaquetas y ciertas células neuroendocrinas.

- **Óxido Nítrico (NO):** es un gas soluble producido en macrófagos, células endoteliales, neuronas y muchos otros tipos celulares por la óxido nítrico sintasa (NOS) que transforma L-arginina en citrulina y NO. Participa como mediador en la vasodilatación. La NOS puede ser inducible (iNOS) o constitutiva: neuronal (nNOS) y endotelial (eNOS). La expresión de iNOS se induce en procesos inflamatorios. Además iNOS activa a COX-2 (Ye et al, 2010).

- **Especies reactivas del oxígeno (ROS) y del nitrógeno (RNS)** (Ver apartado 3.2)

### 1.1.2.2. Inflamación sistémica

La inflamación sistémica se conoce también como Síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS). Es el conjunto de fenómenos clínicos y fisiológicos que resultan de la activación general del sistema inmune, con independencia de la causa que lo origine. Las causas pueden ser infección (sepsis), traumatismo, isquemia, procesos inflamatorios, etc. Se considera que un paciente tiene SIRS cuando presenta al menos 2 de estos síntomas (Rolando et al, 2000):

- Temperatura corporal superior a 38º C o inferior a 36º C.
- Frecuencia cardíaca superior a 90 latidos por minuto.
- Taquipnea: frecuencia respiratoria superior a 20 respiraciones por minuto.
- Recuento leucocitario superior a  $12 \times 10^9/L$  o inferior a  $4 \times 10^9/L$ .
- Presencia de más del 10% de neutrófilos inmaduros.

### 1.1.3. ESTRÉS OXIDATIVO/NITROSATIVO

Los mecanismos implicados en la inducción y prevención del estrés oxidativo se describen en el apartado 3.1. Se resumen a continuación algunos estudios que muestran la presencia de estrés oxidativo en pacientes con cirrosis hepática.

Tradicionalmente se consideraba que la presión portal en las enfermedades hepáticas estaba determinada solamente por la alteración de la arquitectura hepática y por el flujo sanguíneo esplácnico. Pero al ser documentada una hipertensión portal reversible en hepatitis alcohólica y en el fallo hepático agudo, se comprobó que es necesaria la intervención de mediadores vasoactivos para explicar el mecanismo de esta hipertensión portal aguda y también el por qué los pacientes con cirrosis desarrollaban hemorragia aguda por varices en periodos de descompensación hepática. Uno de estos mediadores puede ser el 8-isoprostaglandin F<sub>2a</sub> (8-iso-PGF<sub>2a</sub>), el cual se forma por la oxidación de lípidos mediada por radicales libres y, que ha demostrado elevar la presión portal en ratas cirróticas (Marley et al, 1997). Extrapolándolo a pacientes con cirrosis, la oxidación de lípidos (ver apartado 3.1.1) secundaria al daño hepático por alcohol, sepsis u otras enfermedades hepáticas puede producir un aumento agudo de la presión portal (a través del 8-iso-PGF<sub>2a</sub> y/u otros mediadores) tal y como se observa en el daño hepático agudo. Esta elevación de la presión portal se puede reducir con SQ29548 un antagonista del receptor de tromboxanos

(Marley et al, 1997). El daño hepático inducido por alcohol está relacionado, al menos en parte, con un estrés oxidativo/nitrosativo causado por la producción de ROS/RNS y/o a un descenso de las defensas antioxidantes (Nordmann, 1994).

Yamamoto et al. (1998) estudiaron la presencia de estrés oxidativo en pacientes con hepatitis, cirrosis y hepatoma, midiendo en plasma los niveles de 10- ubiquinol (CoQ10 en su forma reducida) y 10-ubiquinona (CoQ10 en su forma oxidada). En sujetos sanos el CoQ10 se encuentra mayoritariamente en su forma reducida (ubiquinol), mientras que en pacientes cirróticos, y en otras patologías hepáticas, se encuentran mayores niveles de CoQ10 en su forma oxidada (ubiquinona) en relación a la forma reducida, siendo esto un indicador de estrés oxidativo en dichos pacientes.

En 2007, Geetha et al, analizaron en eritrocitos de pacientes cirróticos marcadores de estrés oxidativo (peróxidos lipídicos, hidroperóxidos lipídicos, óxido nítrico) y defensas antioxidantes (glutación reducido (GSH), y actividades de enzimas antioxidantes como catalasa (CAT), superóxido dismutasa (SOD), glutation peroxidasa (GPx)...). Encontraron un aumento significativo en todos los marcadores de estrés oxidativo y en la actividad GPx, mientras que había una importante disminución en el GSH, y actividades SOD y CAT, concluyendo que los pacientes cirróticos muestran estrés oxidativo.

Spahr et al. (2007) administraron alopurinol (400mg/día) durante 10 días a pacientes cirróticos con el objetivo de evaluar si este antioxidante era capaz de revertir los efectos del estrés oxidativo. Se midió en suero como marcador de estrés oxidativo, el malondialdeido (MDA), indicador de oxidación de lípidos, antes y después de la administración del alopurinol. El resultado fue que el MDA estaba aumentado en pacientes cirróticos respecto a los sujetos sanos, y después de la administración durante 10 días del antioxidante, los niveles de MDA disminuyeron un 23%, disminuyendo el estrés oxidativo.

Ergün et al. (2011) encontraron en pacientes cirróticos un aumento en sangre de marcadores de estrés oxidativo (malondialdehido (MDA), y nitrotirosina como indicador de peroxinitritos) y de antioxidantes (GSH, actividad catalasa (CAT), y superóxido dismutasa (SOD)). Vieron un aumento significativo en todos los parámetros medidos, excepto en la nitrotirosina en los pacientes cirróticos respecto a los sujetos sanos. El aumento de las defensas antioxidantes podría ser debido a una respuesta adaptativa. Los niveles de GSH aumentados pueden deberse al aumento del óxido nítrico, ya que induce la  $\gamma$ -glutamylcisteinasintetasa (síntesis de GSH) (Patel et al, 2000).



Basili et al. (2011) utilizaron como marcador de estrés oxidativo en pacientes cirróticos la medida de isoprostanos, que aumentan la respuesta plaquetaria por activación de la glicoproteína IIb/IIIa, y derivan de la activación de la NADPH-oxidasa 2 (NOX-2). Encontraron un aumento de los niveles circulantes de NOX-2, lo que produce un aumento de isoprostanos, indicando ambos, la presencia de estrés oxidativo.

## **2. ENCEFALOPATÍA HEPÁTICA**

La Encefalopatía Hepática (EH) es un síndrome neuropsiquiátrico complejo caracterizado por una alteración funcional del sistema nervioso central subsiguiente a un fallo hepático. El rango de manifestaciones clínicas varía desde alteraciones sutiles en las funciones mentales (ver apartado 2.2), hasta coma profundo y muerte (Adams and Foley, 1953; Gazzard and Dawson, 1986). La EH se presenta en hasta un 50-70% de los pacientes con cirrosis (Riordan and Williams, 1997). Es una alteración potencialmente reversible, pero su aparición conlleva un mal pronóstico.

Se estima que entre 80,000 y 160,000 personas sufren algún grado de encefalopatía hepática en España.

Dependiendo de la duración y el grado de disfunción hepática existen dos tipos principales de EH clínica: aguda y crónica.

- **Encefalopatía hepática aguda:** Está asociada a un fallo hepático agudo o fulminante y es un síndrome clínico de evolución rápida como consecuencia de una inflamación o necrosis masiva hepática. Las principales causas de este tipo de EH son las hepatitis víricas agudas, intoxicación por paracetamol y reacciones idiosincrásicas a fármacos. El grado de mortalidad es muy elevado, debido en muchos casos al aumento de la presión intracraneal.

- **Encefalopatía hepática crónica:** Es la forma más frecuente de EH clínica. Acompañada por desviación de la sangre portal a la circulación sistémica (EH porto-sistémica). Esto ocurre tras una intervención quirúrgica (anastomosis porta-cava) en un paciente con una enfermedad hepática crónica o espontáneamente en pacientes cirróticos debido a la hipertensión portal. Esta desviación de la sangre 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. En estos pacientes se pueden producir episodios de EH clínica como consecuencia de determinados factores desencadenantes (hemorragia digestiva, alta ingesta de proteínas, estreñimiento, infección). Estos episodios de EH son habitualmente reversibles cuando el factor desencadenante es eliminado.

La EH es un factor predictivo de mortalidad en los pacientes cirróticos. Se estima que uno y tres años después del primer episodio de encefalopatía hepática clínica la mortalidad es del 40 y del 70%, respectivamente (Bustamante et al, 1999).

## **2.1. ENCEFALOPATÍA HEPÁTICA MÍNIMA (EHM)**

Además de los tipos de EH clínica mencionados, existe una forma más leve denominada encefalopatía hepática mínima (EHM), en la cual se centra esta tesis.

Pacientes sin signos evidentes de EH clínica pueden presentar diversos déficits cognitivos (percepción visuo-espacial, atención, concentración) y motores que no son detectables en un examen neurológico rutinario pero se ponen de manifiesto cuando se realizan tests psicométricos o neurofisiológicos adecuados. Este tipo de EH se denominaba encefalopatía hepática subclínica o latente, términos que hoy en día han sido reemplazados por EHM (Lockwood et al, 1993; Schomerus and Hamster, 1998; Lockwood, 2000; Ferenci et al, 2002; Amodio et al, 2004; Romero-Gomez et al, 2007).

La EHM disminuye la calidad de vida de los pacientes (Slowik et al, 2001), aumenta el riesgo de padecer accidentes laborales, domésticos y de tráfico y predispone a sufrir EH clínica. Se han utilizado diversas baterías de pruebas psicométricas para detectar y valorar la EH mínima. Se ha llegado a un consenso para utilizar los mismos tests en todos los hospitales, seleccionando como batería de referencia, la denominada PHES (Psychometric Hepatic Encephalopathy Score) (Weissenborn et al, 2001; Ferenci et al, 2002).

Yen y Liaw (1990), mostraron que el 50% de los pacientes con EH mínima desarrollan EH evidente durante los siguientes 6 meses.

## **2.2. ALTERACIONES NEUROLÓGICAS DE LA EH Y EHM**

### **2.2.1. ALTERACIONES NEUROPSIQUIÁTRICAS**

En la encefalopatía hepática aguda, los desórdenes neurológicos avanzan, en horas o días, desde un estado mental alterado hasta el coma. La muerte ocurre, frecuentemente, por un edema masivo del cerebro y aumento de la presión intracraneal.

Sin embargo, 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 EH, desorientación y comportamiento extraño en grado II, acabando finalmente en estupor y coma en grados III y IV (Weissenborn et al, 2005). 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 este (Weissenborn et al, 2005b).

El espectro clínico de la EH 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 EH clínica se clasifica en 4 grados según las manifestaciones neuropsicológicas. En la Tabla 2 se presentan los criterios de West-Haven para la estadificación del estado mental en pacientes con EH clínica.

La EH ocasional está caracterizada por un episodio de alteración neuropsiquiátrica debido a un factor desencadenante y generalmente no deja huellas en los pacientes en términos de alteraciones en los test psicométricos y del electroencefalograma (EEG). La EH recurrente se caracteriza por episodios múltiples de encefalopatía intercalados por periodos en los que la situación neurológica del paciente es aparentemente normal.

Tabla 2. Criterios de West-Haven para la estadificación del estado mental en la Encefalopatía Hepática clínica

Grados EH	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.

(Según Conn y Lieberthal, 1979)

### 2.2.2. ALTERACIONES COGNITIVAS

Las alteraciones cognitivas comienzan con falta de concentración y de atención y una disminución de la capacidad intelectual. Los pacientes con EH 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. 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 (Weissenborn et al, 2005).

Existe cierta controversia en cuanto a si existe o no deterioro en la memoria en los pacientes con EH (Weissenborn et al, 2003). Los test psicométricos empleados para medir la memoria en pacientes con EH evalúan fundamentalmente la memoria semántica y la memoria de trabajo (Weissenborn et al, 2005). En los tests que dependen de la atención, como ocurre en muchos tests de memoria, es difícil saber a qué alteración atribuir un error, a la atención o

a la memoria. Existen test que permiten diferenciar entre atención y memoria. Uno de ellos es la retención de dígitos (Tewes, 1991) que mide la memoria a corto plazo, cuantificando el número de dígitos ordenados de forma seriada que un paciente puede recordar de forma correcta tras haberlos escuchado o leído. Otro test de memoria a corto-plazo es la lista de palabras de Luria (Christensen, 1984). En estos dos tests los pacientes con EH obtienen peores resultados que los sujetos control (Weissenborn et al, 2005). El test de memoria de fotografías o dibujos mide la memoria a largo plazo (Bäumler, 1974). Se muestran al paciente varias imágenes duplicadas y desordenadas y tiene que recordar donde estaban las imágenes duplicadas y emparejarlas. En este test también se han observado alteraciones en los pacientes con EH (Weissenborn et al, 2005).

Los pacientes con EH presentan otras alteraciones cognitivas como alteraciones en la percepción visuo-espacial que se manifiestan por ejemplo en la apraxia, incapacidad para reproducir figuras simples con bloques o figuras. También presentan un déficit en el proceso de aprendizaje, mostrando dificultad a la hora de aprender nuevas tareas. Los pacientes cirróticos con EH obtienen peores resultados que individuos controles en pruebas de inteligencia, aprendizaje y memoria así como de percepción motora y espacial (Puca et al, 1989) sin embargo la capacidad verbal no está alterada. La etiología de la cirrosis no influye en los resultados obtenidos en estas pruebas (Rehnstrom et al, 1977).

Hilsabeck et al. (2002) mostraron que los pacientes con hepatitis crónica causada por el virus C también muestran alteraciones cognitivas en tareas que requieren atención, aprendizaje, velocidad psicomotora y flexibilidad mental, indicando que estos pacientes presentan alteraciones psicomotoras similares a los de los pacientes con otras enfermedades crónicas del hígado como la cirrosis por consumo crónico de alcohol.

Como se ha mencionado antes, en los pacientes con EH mínima las alteraciones cognitivas no son evidentes y sólo se pueden detectar realizando tests psicométricos específicos. El término EHM se refiere a cambios sutiles en la función cognitiva o parámetros electrofisiológicos que pueden ser observados en pacientes con cirrosis que no presentan evidencias clínicas de EH (Amodio et al, 2004). Para diagnosticar la presencia de EH mínima, se utiliza actualmente una batería (PHES) que consta de 5 tests psicométricos: Tests de conexión numérica A y B, test de la clave de números, test de puntos seriados y test del trazado de línea (ver apartado 2.1 de Material y métodos).

Los resultados obtenidos en los test de la batería PHES se ajustan en función de la edad y el nivel de formación de acuerdo con las tablas de normalidad de los sujetos control ([www.redeh.org](http://www.redeh.org)).

Se considera que un paciente presenta EHM cuando en esta batería obtiene una puntuación igual o inferior a -4.

Las alteraciones en la capacidad de atención, procesamiento de la información (Dhiman and Chawla, 2009), coordinación motora, etc, tienen importantes consecuencias en la vida diaria de los pacientes. Por ejemplo, la mayoría de los pacientes cirróticos con EHM tienen disminuida la capacidad de conducir vehículos (Schomerus et al, 1981; Bajaj et al, 2009). Los pacientes con EHM presentan alteraciones en funciones de la vida diaria como la interacción social, comportamiento emocional, dormir, trabajar o realizar tareas domésticas (Groeneweg et al, 1998; Prasad et al, 2007).

### **2.2.3. ALTERACIONES MOTORAS**

En pacientes con encefalopatía hepática crónica se presentan frecuentemente alteraciones en la actividad y coordinación motoras (Tabla 3).

Los trastornos del movimiento pueden ser debidos a alteraciones en uno o más de los 3 grandes sistemas motores que configuran la organización del sistema motor en mamíferos: vía cortico-espinal, circuitos de los ganglios basales y cerebelo (Alarcon and Giménez-Roldán, 2005). En los pacientes con EH crónica se han descrito alteraciones y síntomas relacionados con los 3 niveles de organización.

Manifestaciones clínicas motoras relacionadas con un mal funcionamiento de los ganglios basales (signos extrapiramidales: expresión facial, desórdenes en el habla, alteración al andar, estabilidad postural, bradiquinesia, etc) se han descrito en pacientes con EH mínima y cirrosis hepática compensada (Krieger et al, 1996; Jover et al, 2003). Alteraciones de la coordinación motora (cerebelares) están presentes en pacientes con EH de grado I y II, y alteraciones de la vía cortico-espinal en pacientes desde grado I al IV de EH (Krieger et al, 1996; Jones and Weissenborn, 1997; Weissenborn et al, 2005).

Jover et al. (2005), realizaron una serie de tests psicométricos para medir el deterioro cognitivo, los signos extrapiramidales y la calidad de vida. 22 de los 46 pacientes cirróticos

## I. Introducción

---

estudiados manifestaron alteraciones motoras extrapiramidales y obtuvieron peores resultados en los tests psicométricos y de calidad de vida.

Company et al. (2010) comprobaron que la presencia de alteraciones motoras extrapiramidales predice el desarrollo de EH clínica y que los signos avanzan a medida que avanza la enfermedad reduciendo la calidad de vida.

**Tabla 3. Alteraciones motoras en pacientes con Encefalopatía Hepática (clasificación West-Haven)**

Grados EH	Sintomatología
0	Cambios sutiles en pruebas de conexión numérica o pruebas psicométricas
1	Temblor, incoordinación, apraxia <sup>1</sup>
2	Asterixis <sup>2</sup> , lenguaje lento o incomprensible, ataxia <sup>3</sup>
3	Reflejos hipoactivos, nistagmo <sup>4</sup> , rigidez postural y clonus <sup>5</sup>
4	Postura descerebrada y dilatación pupilar, reflejo oculocefálico <sup>6</sup> , ausencia de respuesta a estímulos en estadios avanzados.

(Según Amodio et al, 2004)

1) 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

2) Temblor de las manos en forma de aleteo

3) Ausencia o irregularidad en la coordinación de los movimientos musculares

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

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

6) 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.



- **Descripción de algunas alteraciones motoras en pacientes con encefalopatía hepática:**

- Aquinesia: pobreza del número de actos motores. Es un síntoma muy invalidante presente en un buen porcentaje de pacientes cirróticos (Spahr et al, 1996; 2000; Jones and Weissenborn, 1997; Jover et al, 2005). La aquinesia afecta a algunos movimientos elaborados, como la escritura, el lenguaje oral (disartria acinética), el balanceo normal de los brazos al andar, la expresión facial (hipomimia: faz inexpressiva y con disminución del parpadeo) (Ferenci et al, 2002).

- Bradiquinesia: enlentecimiento o reducción progresiva de la velocidad y amplitud de los movimientos repetitivos. En una persona no afectada los movimientos automáticos se desarrollan de forma involuntaria y subconsciente. En los pacientes con cirrosis hepática se han descrito retrasos en la iniciación motora, debilidad y fatigabilidad al reiterar los movimientos y enlentecimiento en la realización de las tareas. Esto afecta muchos aspectos motores de su vida diaria, como vestirse, asearse, comer, actividades manuales, etc., exigiéndoles su ejecución mucho más tiempo del que para ellos era habitual. El enlentecimiento psicomotor es uno de los primeros síntomas de la encefalopatía hepática (Spahr et al. 1996; Jones and Weissenborn, 1997; Joebges et al, 2003). Incluso en pacientes con encefalopatía hepática mínima, es posible observar bradiquinesia.

- Asterixis: Es el temblor más característico que presentan los pacientes con EH ("flapping tremor") (Uribe et al, 1980; Jones and Weissenborn, 1997; Timmermann et al, 2002; 2004; 2005; Paul et al, 2004). Los pacientes sufren sacudidas repentinas e involuntarias de un músculo o grupo de músculos causadas por contracciones musculares repentinas que no pueden ser controladas por la persona que las padece.

- Rigidez: es otro de los síntomas que pueden presentar los pacientes con EH (Jones and Weissenborn, 1997; Jover et al, 2003). Consiste en una contractura permanente de las masas musculares, que se traduce en una dificultad creciente para la movilización pasiva de las articulaciones.

- Alteraciones de la postura: los pacientes con EH también pueden presentar trastornos posturales y de la marcha (Burkhard et al, 2003;

Mechtcheriakov et al, 2005). La postura habitual del paciente tiende a la flexión del tronco, de la cabeza y de las cuatro extremidades.

#### **2.2.4. OTRAS ALTERACIONES NEUROPSIQUIÁTRICAS**

Además de las alteraciones cognitivas y motoras se pueden observar en pacientes con EH otras alteraciones neuropsiquiátricas. Se han 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 (Sherlock et al, 1954).

Un 50% de los pacientes con cirrosis hepática presentan alteraciones del sueño caracterizados por somnolencia durante el día, sobre todo a primeras horas, letargia y sopor, mientras que durante la noche la calidad del sueño esta disminuida, duermen menos tiempo y el sueño está fragmentado, con múltiples despertares (Cordoba et al, 1998).

## 2.3. FACTORES QUE CONTRIBUYEN A LA EH CLÍNICA Y MÍNIMA

En el desarrollo de la Encefalopatía Hepática (tanto clínica como mínima) están implicadas diversas alteraciones, descritas a continuación, las cuáles pueden actuar de forma sinérgica. A continuación, se describen las más relevantes:

### 2.3.1. HIPERAMONEMIA

El amonio es esencial en la homeóstasis del nitrógeno y participa en la síntesis de importantes compuestos pero, a concentraciones en sangre y cerebro elevadas, resulta tóxico, provocando alteraciones funcionales en el sistema nervioso central (Gerok and Haüssinger, 1984; Cooper, 1993; Felipe and Butterworth, 2002). Por ello, los niveles de amonio en sangre (~ 100  $\mu\text{M}$  en el hombre, ~ 150  $\mu\text{M}$  en la rata) y en cerebro se encuentran estrictamente regulados por distintas reacciones que mantienen el equilibrio entre su formación y su eliminación.

Los mecanismos patogénicos de la encefalopatía hepática no están bien establecidos. Sin embargo, parece claro que la hiperamonemia es uno de los principales responsables de este proceso. Existen datos experimentales y clínicos que apoyan el papel de la hiperamonemia en el desarrollo de la encefalopatía hepática:

1. Los factores desencadenantes de la EH y del coma hepático (ingesta proteica, hemorragia intestinal, etc.) en pacientes cirróticos van asociados a un aumento de los niveles de amonio.

2. El funcionamiento del hígado en las deficiencias congénitas del ciclo de la urea es normal excepto en la detoxificación del amonio. En estas situaciones también se produce encefalopatía hepática. Los niños nacidos con hiperamonemia debida a una deficiencia congénita en el ciclo de la urea, presentan retraso mental y el grado del mismo se correlaciona con el nivel y la duración de la hiperamonemia neonatal (Shih and Tanaka, 1978; Msall et al, 1984).

3. Los tratamientos clínicos que revierten la EH van dirigidos a reducir los niveles de amonio: reducción de la ingesta proteica, control de la flora bacteriana intestinal productora de amonio con antibióticos o la reducción de la absorción del amonio intestinal por acidificación del lumen con lactulosa o lactitol.

4. Existe una buena correlación entre la severidad de los síntomas neurológicos en los pacientes y la concentración arterial de amonio que presentan (Clemmesen et al, 1999).

5. La neuropatología que se manifiesta en la encefalopatía hepática es similar a la observada como consecuencia de la exposición del cerebro a niveles altos de amonio:

- Tanto en EH aguda como en la exposición aguda a amonio en modelos animales, los astrocitos se hinchan provocando edema cerebral. Esta complicación se presenta en pacientes con síndromes hiperamonémicos agudos (fallo hepático agudo, síndrome de Reye, enzimopatías congénitas del ciclo de la urea, etc.) y se correlaciona con los niveles de amonio alcanzados en esos pacientes (1-5 mM) (Clemmesen et al, 1999).

- Tanto en EH crónica como en la exposición crónica a amonio los astrocitos sufren alteraciones morfológicas y funcionales similares, apareciendo los denominados astrocitos de Alzheimer tipo II. Estas alteraciones se observan tanto en pacientes con fallo hepático crónico como en pacientes con hiperamonemia crónica debida a enzimopatías congénitas del ciclo de la urea (Michalak and Butterworth, 1997), en ratones con hiperamonemia inducida por inyección de ureasa (Gibson et al, 1974) y en cultivos de astrocitos expuestos a amonio (Norenberg, 1987).

Todos los datos anteriores apoyan que la hiperamonemia juega un papel esencial en el desarrollo de la EH.

Otros estudios sugieren que la hiperamonemia en la encefalopatía hepática mínima podría ser responsable de la activación de la guanilato ciclasa soluble por un aumento de óxido nítrico (NO), ya que la activación de ésta en linfocitos correlaciona con los niveles aumentados de amonio y, conduce a un aumento del GMP cíclico (GMPC). En este estudio se demuestra como los niveles de GMPC se encuentran aumentados en plasma de pacientes cirróticos con encefalopatía hepática mínima (EHM), al igual que los niveles de nitratos/nitritos, mientras que los niveles de GMPC en linfocitos se encuentran disminuidos basalmente en los pacientes con EHM y al inducir la guanilato ciclasa soluble mediante un donante de óxido nítrico (S-nitroso-N-acetyl-penicillamine 'SNAP') en linfocitos, se produce un aumento en éste (Montoliu et al, 2007). Otros estudios en cerebros de pacientes cirróticos fallecidos, demostraron que la inducción de la guanilato ciclasa soluble es mayor en los pacientes cirróticos que en los controles en la corteza cerebral mientras que en el cerebelo se ve el efecto contrario (Monfort et al, 2001). En estudios previos, se demostró que estas alteraciones en la vía glutamato-NO-GMPC, están implicadas en la modulación de importantes procesos cerebrales tales como la

comunicación intercelular, aprendizaje, memoria y en el ciclo sueño-vigilia (Ding et al, 1994; 1997; Boulton et al, 1995; Pape, 1995).

## **2.3.2. INFLAMACIÓN**

### **2.3.2.1. Inflamación en pacientes con Encefalopatía Hepática. Sinergia entre hiperamonemia e inflamación.**

En pacientes con fallo hepático agudo la inflamación periférica está asociada con la progresión de la EH (Rolando et al, 2000). La hiperamonemia y la inflamación actúan sinérgicamente en la inducción y el grado de severidad de la EH.

Existe una correlación entre los niveles séricos de TNF- $\alpha$  y la severidad de la EH en pacientes con fallo hepático crónico. Los pacientes en grado I de EH presentan concentraciones de TNF- $\alpha$  más bajas que los que están en grado II, siendo los pacientes en grado IV los que muestran las concentraciones séricas de TNF- $\alpha$  más altas (Odeh M, 2004).

Shawcross et al. (2004) demostraron que la inflamación agrava las alteraciones neurológicas producidas por la hiperamonemia en pacientes cirróticos. Administraron a pacientes cirróticos una solución de aminoácidos para inducir hiperamonemia, la cual provocó un deterioro de la función neuropsicológica (evaluada mediante tests psicométricos) cuando los pacientes presentaban inflamación pero no tras la resolución de la misma. Estos datos indican que la inflamación y la hiperamonemia tienen efectos sinérgicos en la inducción de las alteraciones neurológicas en EH. Estos mismos investigadores, comprobaron posteriormente que la inflamación determina el grado de severidad de la EH en pacientes cirróticos con EH avanzada. Los niveles de inflamación eran superiores en pacientes con EH en grado 4 que en grado 3 mientras que los niveles de amonio eran similares en grado 3 y 4 (Shawcross et al., 2011).

Montoliu et al. (2009) mostraron que la IL-6 e IL-18 están aumentadas en pacientes cirróticos con encefalopatía hepática mínima (EHM) comparadas con pacientes sin EHM y que existe una correlación entre los niveles de IL-6 e IL-18 en suero y el grado de EHM. Los pacientes con niveles más altos de IL-6 e IL-18 presentaron un mayor grado de EHM, sugiriendo que alteraciones relacionadas con la IL-6 e IL-18 podrían contribuir al deterioro

cognitivo en la EHM y que sus concentraciones en sangre podrían ser útiles para distinguir pacientes cirróticos con y sin EHM.

### **2.3.2.2. Inflamación en modelos animales de encefalopatía hepática crónica. Sinergia entre hiperamonemia e inflamación en la inducción de encefalopatía hepática.**

Estudios en modelos animales corroboran la sinergia entre inflamación e hiperamonemia en la inducción de la EH. Marini y Broussard (2006) inyectaron ratones control e hiperamonémicos con LPS para inducir inflamación. El grado de inflamación (aumento de citocinas) fue similar en ratones control e hiperamonémicos. Sin embargo, el deterioro cognitivo inducido fue mayor y se mantuvo más tiempo en los ratones hiperamonémicos que en los control. Este estudio muestra que la hiperamonemia y la inflamación actúan sinérgicamente en la inducción del deterioro cognitivo.

Jover et al. (2006) alimentaron ratas BDL con una dieta rica en acetato de amonio para inducir hiperamonemia o con pienso normal. Las ratas BDL con o sin hiperamonemia presentaron inflamación. Sin embargo, en las ratas BDL con hiperamonemia se observó un aumento de astrocitosis tipo II de Alzheimer, edema cerebral y un deterioro de la actividad motora respecto a ratas BDL alimentadas con pienso normal. Estos datos apoyan que la hiperamonemia y la inflamación actúan sinérgicamente en la inducción de alteraciones cerebrales y neurológicas.

Estos datos experimentales sugieren que estrategias terapéuticas dirigidas a reducir la inflamación podrían prevenir el progreso de la EH y sus complicaciones.

### **2.3.3. NEUROINFLAMACIÓN**

La preservación del funcionamiento del cerebro es esencial para la supervivencia, por ello está protegido de influencias externas por la barrera hematoencefálica (BHE). Cuando se produce una infección las citocinas no pueden atravesar la BHE directamente, por lo tanto son incapaces de producir un efecto directo en el cerebro. No obstante, el sistema inmune es capaz de transmitir señales al cerebro para que produzca una respuesta durante los procesos inflamatorios. La respuesta inmunitaria del sistema nervioso central se produce

fundamentalmente por la activación de la microglia, considerada como los macrófagos residentes del SNC (Bentivoglio et al, 2011). La microglia es muy sensible a los cambios que suceden en su entorno, constituyendo la primera línea defensiva del cerebro frente a una agresión (Lehnardt, 2010). La microglia activada se acumula en las zonas dañadas y expresa genes relacionados con la inflamación como citocinas pro-inflamatorias, enzimas como COX-2 y moléculas de adhesión y produce radicales libres (González-Scarano and Baltuch, 1999; Block et al, 2007).

Los astrocitos también participan en la respuesta inmunológica del SNC frente a agresiones. La activación de astrocitos se produce de forma gradual con cambios progresivos que influyen a las neuronas vecinas y a células no neuronales (Sofroniew and Vinters, 2010). Los astrocitos activados, como la microglia, secretan citocinas y quimiocinas participando en la respuesta inmune innata y adaptativa (Farina et al, 2007).

#### **2.3.3.1. Neuroinflamación en pacientes con Encefalopatía Hepática Crónica**

Los estudios sobre neuroinflamación en EH se han iniciado recientemente, por lo que todavía existen pocos estudios en humanos. Cagnin et al. (2006) utilizaron la tomografía de emisión de positrones (PET) en 5 pacientes cirróticos con EHM. Comprobaron que existe una correlación entre el deterioro cognitivo y la unión de [ $C^{11}$ ]-PK11195 al TSPO en pallidum, putamen derecho y región prefrontal dorsolateral derecha. El TSPO antes se denominaba 'peripheral type benzodiazepine receptor' (PBR) y ahora se conoce como 'translocation protein' (TSPO). En situaciones patológicas, que conducen a neuroinflamación, se observa un aumento de la síntesis de TSPO y de la unión de ligandos al mismo en astrocitos y microglia.

Actualmente, el análisis de la unión de ligandos al TPSO por PET es una técnica muy utilizada para evaluar neuroinflamación en pacientes in vivo.

El aumento del receptor TSPO en EH crónica podría ser consecuencia de la presencia de neuroinflamación, aunque esto no se ha estudiado en humanos.

**2.3.3.2. Neuroinflamación en modelos animales de Encefalopatía Hepática Crónica**

Guigere et al. (1992) observaron mediante autoradiografía un aumento de la expresión de TSPO en cerebelo, tálamo, corteza, hipocampo y estriado de ratas con EH inducida por anastomosis porta-cava (PCS). Esto se puede interpretar actualmente como indicador de la presencia de neuroinflamación.

Cauli et al. (2007) demostraron que en la corteza cerebral de ratas PCS aumentan parámetros neuroinflamatorios como la IL-6, la actividad COX y de la iNOS que acompañan al deterioro cognitivo y propusieron que la neuroinflamación juega un papel esencial en el deterioro cognitivo en EH crónica. Mostraron que la administración de un antiinflamatorio, ibuprofeno (30mg/kg/día), reduce la neuroinflamación y restaura la capacidad de aprendizaje de las ratas PCS en el laberinto en Y.

Estudiaron también el efecto del tratamiento con ibuprofeno sobre la hipoquinesia en ratas PCS y demostraron que, a dosis de 15mg/kg/día recuperaba la función motora en ratas PCS (Cauli et al, 2009).

Rodrigo et al. (2010) demostraron que ratas BDL presentan activación de microglia y neuroinflamación en cerebelo. Como modelo de hiperamonemia “pura” sin fallo hepático utilizaron ratas con hiperamonemia crónica moderada (alimentadas con una dieta rica en amonio), en las que también encontraron activación de microglia y neuroinflamación. Esto indica que la hiperamonemia per se induce neuroinflamación. Ambos modelos presentaron alteraciones cognitivas en la tarea de discriminación condicionada en el laberinto en Y y alteraciones motoras. En el cerebro de ratas BDL e hiperamonémicas hay un aumento de marcadores inflamatorios como iNOS, MHC II e IL-1 $\beta$  en cerebelo y de PGE2 extracelular en cerebelo. De nuevo, el tratamiento con ibuprofeno (30mg/kg rata/día) revirtió la activación de la microglía y restauró las alteraciones motoras y la capacidad de aprendizaje.

Estos estudios muestran que la neuroinflamación juega un papel esencial en el deterioro cognitivo y motor en EH.



## 3. ESTRÉS OXIDATIVO/NITROSATIVO

### 3.1. CONCEPTO DE ESTRÉS OXIDATIVO

El estrés oxidativo se define como una alteración del equilibrio entre las especies pro-oxidantes y las antioxidantes, a favor de las primeras (Sies, 1986) y puede originarse por un exceso de agentes pro-oxidantes, un déficit de agentes antioxidantes o por ambos factores a la vez.

El término estrés oxidativo, se refiere a las alteraciones producidas por las especies reactivas del oxígeno (ROS). La sobreproducción de radicales libres del nitrógeno (RNS) se denomina estrés nitrosativo (Ridnour et al, 2004).

Las ROS y RNS juegan un papel importante en el metabolismo celular. En general, niveles moderados de ROS/RNS pueden actuar como señales para promover la proliferación y supervivencia celular, mientras que un severo aumento de ROS/RNS puede inducir la muerte celular. En condiciones fisiológicas, el equilibrio entre la generación y eliminación de ROS/RNS mantiene el funcionamiento correcto de la señalización proteica sensible al estado redox. Normalmente la homeostasis redox asegura la respuesta celular correcta a distintos estímulos exógenos. Sin embargo, cuando la homeostasis redox se altera, el estrés oxidativo puede conducir a la muerte celular aberrante y contribuir al desarrollo de distintas patologías (Trachootham et al, 2008).

A pesar del papel fisiológico que desempeñan algunas especies reactivas del oxígeno (ROS) y del nitrógeno (RNS), también pueden dar lugar a reacciones de oxidación perjudiciales, contra las cuales los organismos han desarrollado defensas antioxidantes (Halliwell, 1996).

Las ROS y RNS son liberadas por macrófagos, neutrófilos, células endoteliales y tisulares en respuesta a diferentes estímulos, participando activamente en el proceso inflamatorio.

## **3.2. RADICALES LIBRES**

Un radical libre es una especie química que contiene uno o más electrones desapareados en su orbital externo lo que la convierte en una especie muy reactiva. Pueden tener una vida media extraordinariamente corta, del orden de milisegundos, debido a su gran reactividad (radical hidroxilo, por ejemplo), aunque varía según el tipo de radical libre (Simic, 1988).

En los seres vivos son habituales las reacciones que implican radicales libres (Harman, 2001). Debido a que los organismos se desarrollan en presencia de oxígeno, están expuestos a la generación de ROS, que son responsables del daño oxidativo de biomoléculas como el DNA, lípidos, proteínas y glúcidos (Sies 1986; Halliwell 1989; 1996). De hecho, participan en los mecanismos fisiopatológicos de multitud de enfermedades como cáncer, diabetes (Takada 1982), patologías cardiovasculares (Byers 1993), procesos reumáticos (Wolff and Dean, 1987), patologías gastroentéricas, afecciones broncopulmonares (Slade et al, 1993) o procesos neurodegenerativos (Marshall et al, 1999; Halliwell, 2001; Halliwell, 2006). También están implicados en procesos fisiológicos como el envejecimiento (Pacifci and Davies, 1991), o en el daño causado por el ejercicio físico agotador (Davies et al, 1982; Sastre 1992).

### **3.2.1. TIPOS DE RADICALES LIBRES**

El oxígeno molecular en estado basal tiene dos electrones desapareados en dos orbitales diferentes, por lo que algunos autores lo consideran un radical. Su estructura electrónica le permite reaccionar de manera muy eficaz con radicales libres, sin embargo con especies no radicales disminuye la velocidad de reacción (Cheeseman and Slater, 1993).

El oxígeno se presenta principalmente en su forma diatómica, debido a la gran estabilidad de dicha molécula. A pesar de esto, existe un gran número de especies derivadas del oxígeno que, o bien son muy reactivas, o son capaces de dar lugar a especies reactivas (Tabla 4). Algunas de estas especies son auténticos radicales libres derivados del oxígeno (radical hidroxilo) y otras no son en realidad radicales (peróxido de hidrógeno), pero participan en multitud de reacciones que dan lugar a la generación de radicales libres.

Tabla 4. Especies reactivas del oxígeno (ROS) y del nitrógeno (RNS)

ESPECIE QUÍMICA	SÍMBOLO
Radical Superóxido	$\cdot O_2^-$
Radical Hidroperóxido	$\cdot HO_2$
Peróxido de Hidrógeno	$H_2O_2$
Radical Hidroxilo	$\cdot OH$
Radical Alcoxilo	$\cdot RO$
Radical Peróxido	$\cdot ROO$
Radical Peroxinitrito	$\cdot ONOO^-$
Óxido Nítrico	$\cdot NO$
Dióxido de Nitrógeno	$\cdot NO_2$

(Se indica en verde las ROS y en azul las RNS)

### 3.2.1.1. RADICALES LIBRES DERIVADOS DEL OXÍGENO

#### ❖ Anión superóxido ( $\cdot O_2^-$ )

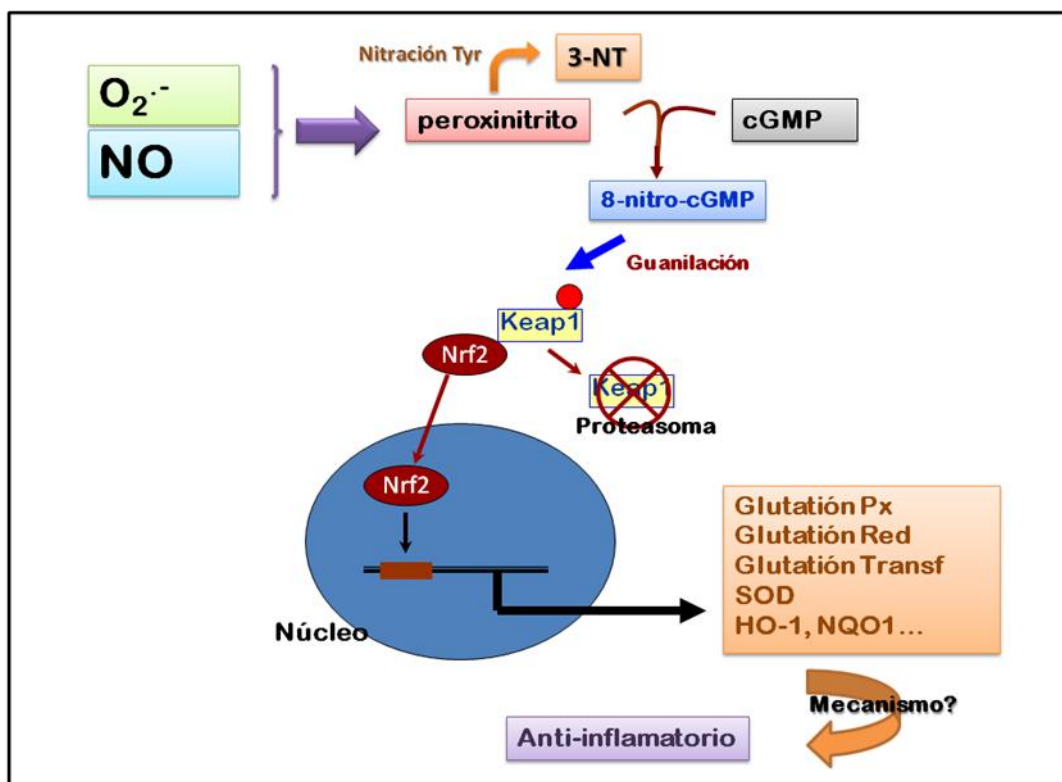
El anión superóxido es un radical que se forma por la reducción univalente del oxígeno molecular. A diferencia de otros radicales libres, caracterizados por su gran reactividad, el anión superóxido sólo es capaz de reaccionar eficazmente con un reducido grupo de moléculas (Halliwell, 1996). No ataca de manera significativa a lípidos poliinsaturados ni al ADN (Fridovich, 1997). Sin embargo, tiene gran importancia fisiopatológica ya que se genera en grandes cantidades (Ames et al, 1993) y sufre una conversión significativa a otras especies reactivas del oxígeno, que son muy reactivas y dañinas, como el radical hidroxilo (Sawyer, 1988; Fridovich, 1997). Se estima que en el organismo humano, una célula produce del orden de  $10^{10}$  moléculas de  $\cdot O_2^-$  por día (Ames et al, 1993).

#### ❖ Peroxinitritos ( $ONOO^-$ )

El anión superóxido tiene una alta capacidad para reaccionar con el óxido nítrico (NO), dando lugar a peroxinitrito, que puede ser muy dañino. Por un lado puede nitrar residuos

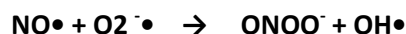
## I. Introducción

tirosina libres o de proteínas, formando 3-nitrotirosina (Beckmann et al,1994), de la que se hablará posteriormente. Por otro lado, el radical peroxinitrito es capaz de nitrar el GMPc dando lugar a una molécula recientemente identificada en sistemas biológicos, el 8NO<sub>2</sub>-GMPc. Esta molécula, en el citosol, guanila una proteína (Keap1) encargada de mantener a Nrf2 inactivo. Al guanilarse, keap1 se separa de Nrf2, dando lugar a que keap1 sea degradada por el proteasoma, y Nrf2 se transloque al núcleo, donde se une a una región (ARE) de diversos genes, activando su expresión. Varios de estos genes codifican enzimas antioxidantes y algunos, como la hemooxigenasa-1 (HO-1) podrían actuar como defensa frente la inflamación (Akaike et al, 2009) (Figura 3).



**Figura 1.** Reacción del peroxinitrito con el GMPc, dando lugar a 8-nitro-GMPc con la consecuente disociación del complejo keap1-Nrf2, translocación de Nrf2 al núcleo y aumento de la expresión de ARNm de enzimas antioxidantes.

El peroxinitrito no es un radical como tal. Se forma por reacción del anión superóxido con el óxido nítrico, que se produce a gran velocidad. En esta reacción también se produce radical hidroxilo que, junto con el peroxinitrito son potentes oxidantes responsables de peroxidación lipídica de membranas (Pacher et al, 2007; Siqueira et al, 2008).



Por tanto, el peroxinitrito es un buen marcador de la presencia de estrés oxidativo.

El anión peroxinitrito es un agente oxidante muy potente, capaz de nitrar residuos tirosina de proteínas, dando lugar a 3-nitrotirosina, que es un buen marcador de estrés oxidativo (Görg et al, 2010; Lobo Torres et al, 2011).

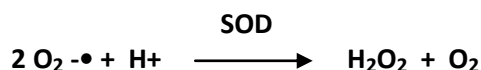
❖ **Radical hidroxilo ( $\cdot\text{OH}$ )**

El radical hidroxilo se forma mayoritariamente por descomposición de hidroperóxidos mediante la reacción de Fenton- Harber-Weiss (ver apartado 3.2.2.2). Es la especie derivada del oxígeno más reactiva y una de las especies químicas más reactivas conocidas. Se estima que su vida media es de alrededor de  $10^{-9}$  seg (Liochev and Fridovich, 1994), de manera que sus reacciones con la mayoría de biomoléculas ocurren muy cerca de su lugar de formación (Cheeseman and Slater, 1993).



❖ **Peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ )**

El peróxido de hidrógeno no es un radical como tal, ya que no posee electrones desapareados en su capa de valencia. Se forma como producto de la reacción de detoxificación del anión superóxido por la enzima superóxido dismutasa. Su eliminación la llevan a cabo dos enzimas: la catalasa y la glutatión peroxidada, de las cuales hablaremos posteriormente, que metabolizan el  $\text{H}_2\text{O}_2$  a agua (Arthur, 2000; Faraci and Didion, 2004; Wassmann et al, 2006; Ardanaz and Pagano, 2006).



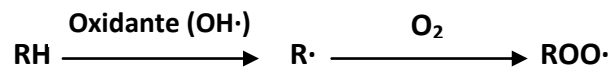
Es la ROS menos reactiva. Su importancia se debe al hecho de que participa en multitud de reacciones que dan lugar a la generación de radicales libres. Además, atraviesa con gran facilidad las membranas biológicas, pudiendo dar lugar a reacciones de oxidación en zonas de la célula alejadas de su lugar de producción.

❖ **Oxígeno singlete ( $^1\text{O}_2$ )**

El oxígeno singlete es una forma excitada del oxígeno molecular. Tampoco es un radical libre como tal, pero al ser una forma excitada reacciona fácilmente con otras moléculas. Se forma *in vivo* por acción de la luz sobre moléculas de oxígeno. También puede formarse en reacciones de oxidación de diferentes especies o durante algunas reacciones enzimáticas. Su vida media es de alrededor de  $10^{-6}$  segundos. Puede interactuar con otras moléculas transfiriéndoles su energía de excitación o combinándose químicamente con ellas.

❖ **Peroxilo ( $\text{ROO}^\bullet$ )**

El radical peroxilo se forma cuando un radical hidroxilo ataca a un ácido graso, arrancándole un átomo de hidrógeno y dejando un carbono del ácido graso con un electrón desapareado ( $\text{R}^\bullet$ ), de manera que lo convierte en radical libre. Éste carbono, reacciona con una molécula de oxígeno ( $\text{O}_2$ ), dando lugar al radical peroxilo, el cual puede participar en otras reacciones y generar otras especies radicales (Frei, 1994).



El peroxilo dará lugar a los peróxidos lipídicos e hidroperóxidos, los cuales son eliminados por acción de la enzima glutatión peroxidada (ver apartado 3.5.1.3).

### 3.2.1.2. RADICALES LIBRES DERIVADOS DEL NITRÓGENO

#### ❖ Óxido Nítrico (NO<sup>•</sup>)

El radical NO<sup>•</sup> es un gas lipófilo e hidrosoluble, cuya vida media es relativamente larga (3-5 seg). Su formación se debe a una reacción enzimática en la que la enzima Óxido Nítrico Sintasa (NOS) cataliza la conversión de L-Arginina a L-Citrulina, dando como producto NO<sup>•</sup> en numerosos tipos celulares (Moncada et al, 1991; Bush et al, 1992).

A concentraciones bajas, el NO actúa como una molécula de señalización en muchos procesos fisiológicos como la regulación de la liberación de neurotransmisores; la citotoxicidad mediada por macrófagos y neutrófilos (Rodrigo et al, 2000); la regulación de la presión sanguínea, relajación y viabilidad de células del músculo liso, etc (Bergendi et al, 1999; Liu et al, 2007). En linfocitos T participa en la respuesta inducida tras el reconocimiento del antígeno (Ibiza et al, 2006). A concentraciones muy elevadas puede dañar el ADN, ARN, lípidos y proteínas. Está implicado en muchos procesos fisiopatológicos como son el shock séptico, la hipertensión, la deficiencia inmunitaria, la impotencia, la isquemia cerebral, algunos desórdenes neurodegenerativos, la diabetes y el cáncer (Brennan et al, 1999).

Además puede reaccionar con el anión superóxido, dando lugar al anión peroxinitrito, que puede nitrar residuos tirosina libre ó de proteínas.

#### ❖ Dióxido de Nitrógeno (NO<sub>2</sub><sup>•</sup>)

El dióxido de nitrógeno es un radical libre presente como contaminante ambiental, producido primariamente a partir de la oxidación del NO<sup>•</sup> atmosférico (Postlethwait et al, 1995).

### **3.2.2. GENERACIÓN DE LOS RADICALES LIBRES**

Los radicales libres se pueden producir tanto a partir de moléculas endógenas como exógenas (Freeman and Crapo, 1982; Frei, 1994). Los radicales descritos anteriormente son especies con origen endógeno.

#### **3.2.2.1. Fuentes exógenas generadoras de radicales libres**

Algunas fuentes exógenas que producen radicales libres son:

- Antibióticos (Doroshov and Hochstein, 1982)
- Agentes antineoplásicos (Deno, 1982)
- Factores ambientales, como contaminantes aéreos fotoquímicos, pesticidas, solventes, humo del tabaco, anestésicos e hidrocarburos aromáticos (Mason, 1982).
- Radiaciones electromagnéticas (rayos X y  $\gamma$ ) y radiaciones de partículas (electrones, protones, neutrones, deuterones y partículas  $\alpha$  y  $\beta$ ) (Bielsky and Gebieki, 1977).

#### **3.2.2.2. Fuentes endógenas generadoras de radicales libres**

##### **❖ La cadena de transporte electrónico mitocondrial**

La cadena de transporte electrónico mitocondrial es una de las principales fuentes de radicales libres en la célula. Se calcula que entre el 1 y el 2% de los electrones transportados por la cadena de transporte electrónico mitocondrial en estado 4 no llegan al complejo IV y producen reducciones parciales del oxígeno (Boveris and Chance, 1973; Cadenas et al, 1977; Frei, 1994).

Debido a las propiedades del oxígeno, su reducción tetravalente requiere la transferencia sucesiva de 4 electrones al orbital  $\pi$  antienlazante. El citocromo  $a_3$  del complejo IV de la cadena respiratoria debe mantener estrechamente unidas a su centro activo todas las especies parcialmente reducidas del oxígeno hasta que se completa la transferencia de 4 electrones y 4 protones al  $O_2$  y con ello la formación de dos moléculas de  $H_2O$  (Benzi y Moretti, 1995).



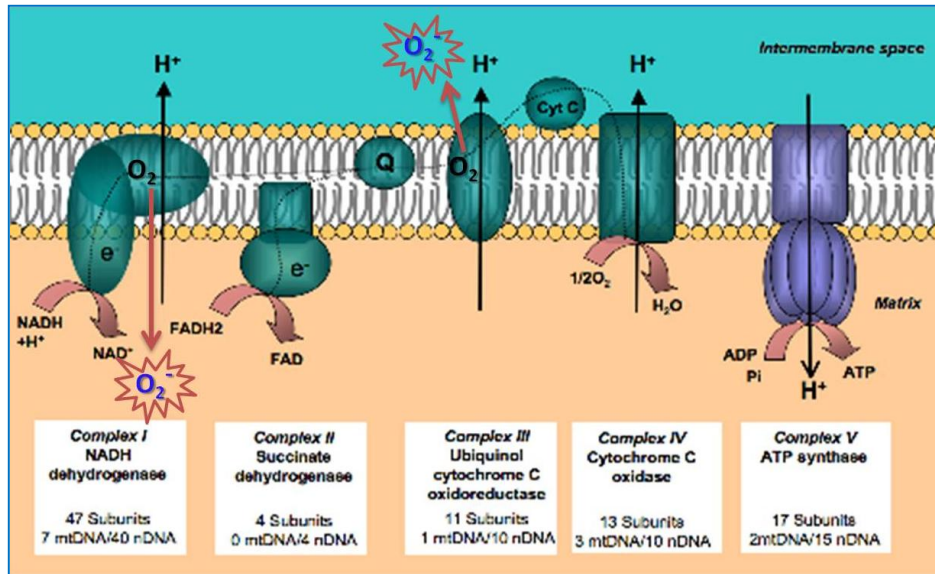
Por el contrario, los complejos I y II de la cadena de transporte electrónico mitocondrial tienen la capacidad de transferir un electrón directamente al  $O_2$ , pero no son capaces de retener el ión superóxido formado (Benzi y Moretti, 1995). La especie radical así formada es el  $\bullet O_2^-$ , que puede producir daños *in situ*. Este radical, también puede dismutarse, generando peróxido de hidrógeno, capaz de atravesar las membranas y salir al citoplasma, donde puede reaccionar con otras especies formando diversos tipos de radicales libres (Boveris et al, 1972).

Los procesos de formación de anión superóxido en la cadena respiratoria mitocondrial son un conjunto de reacciones cuya velocidad aumenta linealmente con la concentración de oxígeno presente en el medio.

Utilizando mitocondrias aisladas, se puede determinar experimentalmente el consumo de oxígeno por la mitocondria. En ausencia de sustrato o de ADP, el consumo de oxígeno provocado por la oxidación de sustratos endógenos es bajo. Este estado respiratorio se define como estado 1. Añadiendo un sustrato oxidable (glutamato o malato) el consumo aumenta levemente, siendo éste el estado 2.

En el estado 3 de la cadena respiratoria mitocondrial se produce el consumo de oxígeno en presencia de sustrato y ADP, dando lugar al transporte de electrones y síntesis de ATP. Cuando el ADP ha sido consumido y por tanto el gradiente electroquímico generado por la cadena de transporte electrónico no puede ser empleado para sintetizar ATP, se alcanza el estado 4. El mantenimiento del control respiratorio depende de la integridad de la membrana mitocondrial, de forma que si ésta se daña, se desacopla el transporte de electrones y la síntesis de ATP. Las mitocondrias que consumen la misma cantidad de oxígeno en el estado 3 que en el 4 están desacopladas (Rickwood et al, 1987).

La producción de ROS por las mitocondrias aumenta cuando el aporte de sustratos de la cadena de transporte electrónico mitocondrial excede la demanda de energía, esto es, en condiciones cercanas al estado 4, donde el cociente ATP/ADP es elevado. Entonces, aumentan la presión parcial del  $O_2$  y el grado de reducción de los transportadores redox de los complejos I, II, y III, aumentando así la producción de ROS (Skulachev, 1996).



**Figura 2. Cadena respiratoria mitocondrial.** En mamíferos, la cadena respiratoria consiste de cuatro complejos enzimáticos (complejo I-IV) y dos substratos intermedios (coenzima Q y citocromo c). El NADH+ H<sup>+</sup> y el FADH<sub>2</sub> producidos por el metabolismo intermediario son oxidados por la cadena respiratoria para establecer un gradiente electroquímico de protones, el cual es utilizado finalmente por el complejo V para producir ATP, la única fuente de energía utilizada por la célula (Bellance et al, 2009). Los complejos I y III son los principales productores de anión superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), liberándolo a la matriz mitocondrial y espacio intermembrana respectivamente (Dröse y Brandt, 2012).

#### ❖ Reacción de Fenton-Harber-Weiss

La reacción de Fenton- Haber-Weiss consiste en la reducción del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por iones de metales de transición, sobre todo el ion ferroso (Fe<sup>+2</sup>) y, en menor medida, el cuproso (Cu<sup>+</sup>) y otros iones. El peróxido de hidrógeno es una molécula relativamente estable en ausencia de catalizadores que promuevan su descomposición. Sin embargo, en presencia de dichos iones de metales de transición, puede interaccionar con ellos por medio de una reacción de oxidoreducción (Fenton- Haber-Weiss ).

Se descubrió a finales del siglo XIX que se podían oxidar moléculas orgánicas por mezcla de peróxido de hidrógeno y Fe<sup>+2</sup> (reactivo de Fenton) (Fenton, 1984). Haber y Weiss, posteriormente dieron una primera explicación del mecanismo de reacción: el Fe<sup>+2</sup> reduce al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que a su vez se descompone en el radical hidroxilo y el ion hidroxilo, oxidándose el metal por cesión de un electrón al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Haber and Weiss, 1932).



❖ **El sistema hipoxantina/xantina oxidasa**

La enzima xantina óxidoreductasa (XOR) es una enzima con dos isoformas: la xantina deshidrogenasa y la xantina oxidasa, que se forma por modificaciones posttraduccionales a partir de la forma deshidrogenasa. Ambas formas enzimáticas catalizan la hidroxilación de una amplia gama de sustratos como purinas, pirimidinas, pterinas y aldehídos (Hille and Nishino, 1995; Hille, 1996).

La xantina deshidrogenasa es una metaloflavoenzima compleja que participa en el metabolismo de las purinas, oxidando la hipoxantina a xantina y ésta a ácido úrico (Figura 3a). En su forma deshidrogenasa no produce ROS, puesto que emplea como aceptor de electrones al  $\text{NAD}^+$  (Saugstad, 1990; Kinnula et al, 1995). Sin embargo, en condiciones de hipoxia (Figura 3b), por ejemplo durante un proceso isquémico, la xantina deshidrogenasa es convertida a xantina oxidasa, por una proteasa activada por la hipoxia (Suzuki et al, 1991). En la forma oxidasa, esta enzima emplea oxígeno molecular como aceptor de electrones (Radi et al, 1992).

El sistema hipoxantina/xantina oxidasa puede producir especies reactivas del oxígeno en determinadas circunstancias. En condiciones de hipoxia, la xantina deshidrogenasa, encargada de metabolizar la hipoxantina a xantina, pasa a xantina oxidasa y, puesto que no hay oxígeno disponible, se va acumulando hipoxantina sin poder ser oxidada. Cuando se produce la reoxigenación, la hipoxantina acumulada se oxida a xantina y ácido úrico, generando grandes cantidades de  $\bullet\text{O}_2^-$  y  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Figura 3c) (Suzuki et al, 1991; Saugstad, 1990).

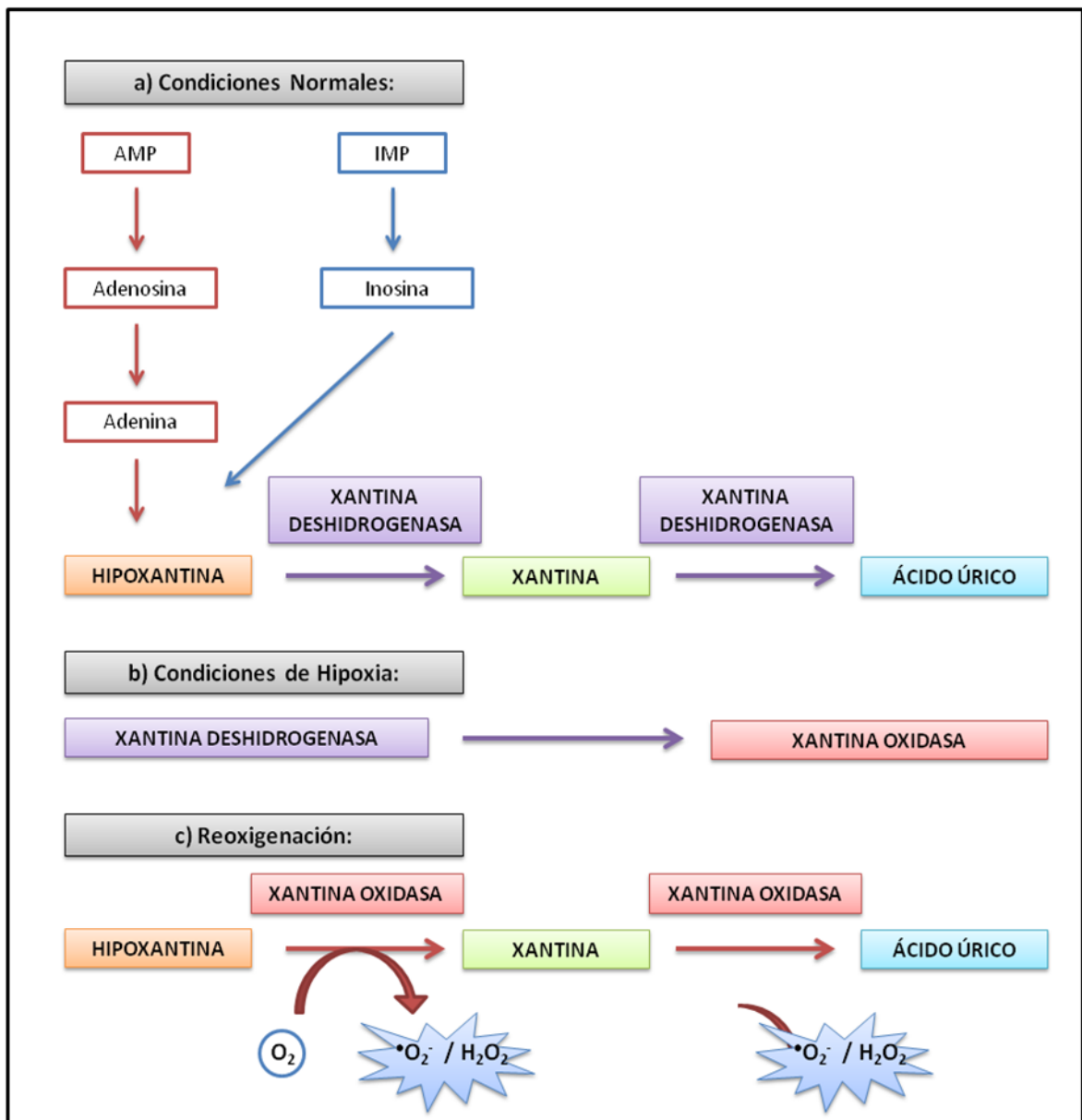


Figura 3. Sistema hipoxantina/xantina oxidasa: reacción en condiciones normales (a); en condiciones de hipoxia (b) y después de la reoxigenación (c)

### 3.3. INDICADORES DE ESTRÉS OXIDATIVO

#### 3.3.1. DAÑO OXIDATIVO DE BIOMOLÉCULAS

Los cuatro tipos principales de biomoléculas (lípidos, glúcidos, ácidos nucleicos y proteínas) susceptibles de ser oxidados. Los radicales libres atacan a las biomoléculas y son capaces de oxidarlas causando diversos tipos de alteraciones como pérdida de función, acumulación de moléculas oxidadas, mutaciones, etc.

Dada la importancia del daño que el estrés oxidativo puede producir en las células y en el organismo, es útil disponer de indicadores que nos permitan detectar y cuantificar su presencia y tipo. Se utilizan como indicadores de estrés oxidativo productos de la oxidación de las diferentes biomoléculas.

- **Oxidación de lípidos:** los lípidos son las moléculas más susceptibles a ser dañadas oxidativamente, en especial los ácidos grasos poliinsaturados (Cheeseman y Slater, 1993). Los radicales libres que pueden iniciar esta reacción son el radical hidroxilo ( $\text{HO}\bullet$ ), el peróxido ( $\text{ROO}\bullet$ ), el alcóxido ( $\text{RO}\bullet$ ) y el alquílico ( $\text{R}\bullet$ ).

El proceso se denomina peroxidación lipídica y comienza cuando un radical libre ataca a un carbono de la cadena alifática de un ácido graso, se desprende un átomo de hidrógeno, y se forma un radical alquílico (Frei, 1994; Halliwell, 1994). Esta reacción se produce preferentemente en los carbonos contiguos a dobles enlaces de los ácidos grasos poliinsaturados, ya que los radicales formados se pueden estabilizar por resonancia con el doble enlace. Este radical centrado en un átomo de carbono reacciona con el  $\text{O}_2$  y forma un radical peróxido,  $\text{R-COO}\bullet$ . Los radicales peróxido pueden reaccionar con cadenas laterales de otros ácidos grasos poliinsaturados adyacentes, formando un radical alquílico ( $\text{R}'\text{-CH}\bullet$ ) y un peróxido lipídico ( $\text{R-COOH}$ ), con lo que se propaga la reacción en cadena (Halliwell, 1994). Ciertos componentes de la defensa antioxidante de las células restringen la extensión de esta reacción en cadena, siendo incluso en ocasiones capaces de detenerla completamente (Vladimirov Yu et al, 1986).

De este modo, un solo ataque por un radical libre puede dar lugar a la formación de un gran número de productos de oxidación, principalmente aldehídos como malondialdehído y 4-hidroxi-nonenal, e hidrocarburos de cadena corta como etano y pentano (Halliwell, 1991; Halliwell, 1994).

- **Oxidación de proteínas:** todos los aminoácidos presentes en las proteínas tienen residuos susceptibles de ser atacados por los radicales libres, principalmente el grupo carbonilo por el radical hidroxilo (Stadtman, 1992). La tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina, metionina y cisteína son los aminoácidos que más procesos oxidativos sufren (Davies and Slater, 1987). Esta oxidación puede dar lugar a un cambio conformacional de la proteína y, en general a una pérdida o modificación de su función biológica.

Se ha propuesto que la oxidación de enzimas mediada por radicales libres es un mecanismo de marcaje para controlar el recambio proteico (Stadtman, 1992). Muchas proteasas degradan proteínas oxidadas con preferencia a las formas no oxidadas (Davies and Slater, 1987). Esto permite a las células eliminar proteínas inactivas ó alteradas.

Un claro ejemplo de la modificación de proteínas es la nitración de sus residuos tirosina por el radical peroxinitrito, que se forma por reacción del radical superóxido y óxido nítrico en condiciones de estrés oxidativo-nitrosativo.

- **Oxidación del ADN:** el daño al ADN por radicales libres puede ocurrir de dos modos principales: por reacción con los residuos de desoxirribosa, que no suele ser crítico, o por reacción con las bases del ADN, que es más habitual, y da lugar a una gran variedad de productos derivados (Breen and Murphy, 1995). El número de bases modificadas diferentes encontradas en el ADN tras un ataque oxidativo supera la veintena. La oxidación de la desoxiguanosina a 8-oxoguanosina es una de las lesiones más frecuentes, y reviste gran importancia por su alto efecto mutagénico (Bodepudi et al, 1992). No obstante, el ADN dañado puede ser reparado por enzimas que cortan la parte afectada, que es entonces excretada por la orina (Ames et al, 1993).

- **Oxidación de glúcidos:** los glúcidos reaccionan con facilidad con los radicales hidroxilo. La glucosa constituye un captador del radical superóxido, al retenerlo e impedir su acción sobre otras moléculas. La manosa y el manitol son eliminadores del radical hidroxilo. Se ha

observado que diversos polisacáridos actúan como agentes protectores celulares, impidiendo la acción de los radicales libres sobre otras moléculas (Albertini et al, 1996).

El daño oxidativo a los glúcidos reviste importancia cuando se trata de polisacáridos de función estructural, ya que son despolimerizados por los radicales libres dando lugar a procesos degenerativos. Por ejemplo, los proteoglicanos están sujetos a rotura oxidativa (Greenwald and Moy, 1980).

### 3.3.2. COCIENTE GSSG/GSH COMO INDICADOR DE ESTRÉS OXIDATIVO

El glutatión ( $\gamma$ -glutamil-cisteinil-glicina) es un tripéptido que desempeña diversas funciones metabólicas de gran importancia, relacionadas principalmente con la protección antioxidante de las células (Viña, 1990). El grupo activo es el sulfidrilo del residuo de cisteína, por lo que el glutatión ejerce su papel protector cuando se encuentra en su forma reducida (GSH). Dos moléculas de GSH pueden oxidarse cediendo un electrón cada una y combinándose entre sí dando lugar la forma disulfuro (GSSG). Por ello, un indicador característico de estrés oxidativo es el aumento de la concentración de glutatión oxidado con la consiguiente alteración del estado redox del glutatión, aumentando el cociente GSSG/GSH (Sies, 1986). (ver Apartado 3.5.2)

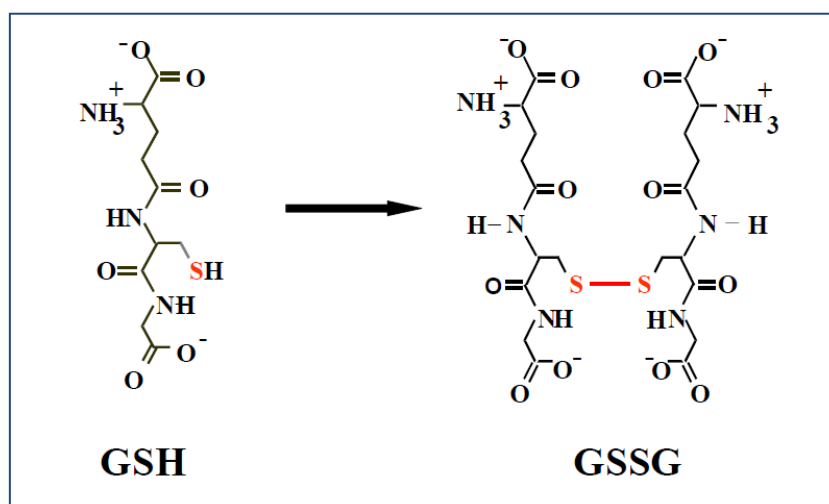


Figura 4. Estructura química del GSH y GSSG

### 3.4. 3-NITROTIROSINA (3-NT)

En condiciones de estrés oxidativo y nitrosativo, como hemos comentado, se producen radical superóxido y óxido nítrico que reaccionan dando lugar a peroxinitrito, molécula muy reactiva que nitra tirosina libre ó de proteínas, dando lugar a la 3-Nitrotirosina (Beckmann et al, 1994; Pacher et al, 2007).

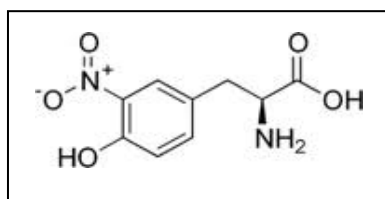


Figura 5. Estructura de la nitrotirosina

La nitración de la tirosina de las proteínas es una modificación covalente resultante de la adición de un grupo nitro (-NO<sub>2</sub>) a un grupo hidroxilo del anillo aromático de residuos tirosina (Gow, 2004). Esta nitración, produce cambios en la estructura y función de las proteínas.

La nitración de la tirosina ocurre mediante un mecanismo radicalario en el cual primero es extraído un átomo de hidrogeno que, rápidamente se combina con -NO<sub>2</sub> produciendo 3-nitrotirosina.

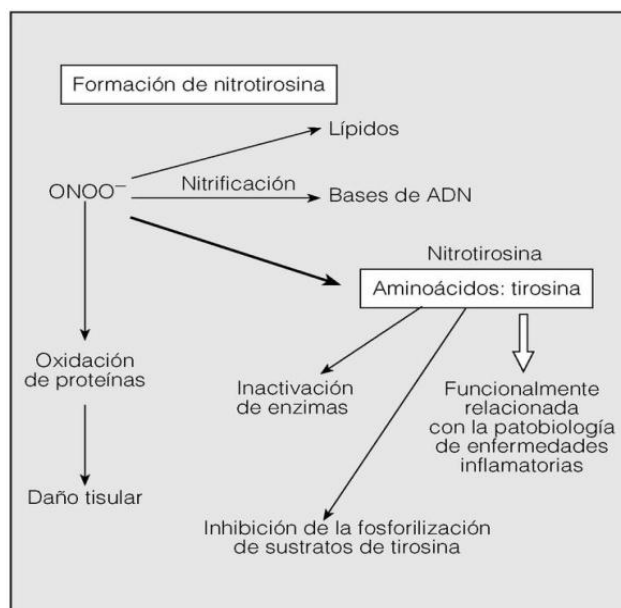
En la mayoría de los estudios, la nitración de tirosinas se asocia con una pérdida significativa de función de la proteína nitrada. Un ejemplo interesante de pérdida de actividad enzimática es la Mn-SOD mitocondrial, cuya nitración en el residuo Tyr-34 conduce a la completa inactivación de la enzima (MacMillan-Crow and Thompson, 1999), favoreciendo la generación de superóxido y peroxinitritos en este orgánulo, por la menor dismutación del •O<sub>2</sub>-.

La acumulación de 3-NT ha sido descrita en diversas enfermedades neurodegenerativas (Alzheimer, Parkinson, esclerosis múltiple) y cardiovasculares (ateroesclerosis, diabetes, infarto de miocardio...). Se ha medido tanto la 3-NT libre como la unida a proteínas en suero o plasma de pacientes.

Ansari y Scheff (2010) midieron los niveles de 3-NT en proteínas en sobrenadante post-mitocondrial, mitocondria y en fracciones sinaptosomales de corteza frontal obtenida post-mortem de individuos sanos, pacientes con deterioro cognitivo leve, y con la enfermedad de



Alzheimer. Encontraron un aumento en la nitración de los residuos tirosina (3-NT) de las proteínas en los tres tipos de fracciones analizadas en los pacientes respecto a los individuos sanos, y una tendencia al aumento de dicha alteración según se agrava la patología.



**Figura 6. Esquema de los efectos del peroxinitrito.** Esta especie puede oxidar directamente proteínas (izquierda) o puede nitrificar diversas moléculas. Entre ellas, el aminoácido tirosina es la molécula diana para dicho proceso. La formación de nitrotirosina puede alterar las funciones de las proteínas o actuar como marcador del estado de estrés nitrosativo celular.

### 3.5. POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL

La mitocondria juega un papel fundamental en rutas de señalización tanto de supervivencia como de muerte celular. Por un lado, este orgánulo proporciona el 90% del ATP para la supervivencia celular mediante la fosforilación oxidativa. Por otro lado, la mitocondria es el principal regulador de la muerte celular mediante apoptosis, necrosis y autofagia.

El estrés oxidativo, acompañado de la sobrecarga de calcio en la matriz mitocondrial, causa un aumento de la permeabilidad de las membranas mitocondriales por la formación de un poro de transición (mPTP) (Chipuk et al, 2006; Halestrap et al, 2009). La apertura del mPTP induce la despolarización de la membrana mitocondrial interna (MIM) conduciendo a una depleción de ATP y producción de ROS.

### 3.6. SISTEMAS ANTIOXIDANTES

Todas las células aeróbicas están sujetas a estrés oxidativo. El organismo ha desarrollado una serie de mecanismos de defensa antioxidante, tanto enzimáticos como no enzimáticos, dirigidos a protegerse frente a la acción dañina de los radicales libres. El término antioxidante fue definido como "cualquier sustancia que, a bajas concentraciones comparado con el sustrato oxidable, disminuye significativamente o inhibe la oxidación de este sustrato" (Sies, 1993; Halliwell, 1995; Halliwell, 1996).

Los antioxidantes pueden actuar por diferentes mecanismos:

- Previendo la formación de ROS
- Interceptando el ataque de las ROS
- Secuestrando los metabolitos reactivos y convirtiéndolos en moléculas menos reactivas
- Aumentando la resistencia de las dianas biológicas sensibles al ataque por ROS
- Facilitando la reparación del daño producido por las ROS
- Manteniendo un ambiente favorable para la intervención de otros antioxidantes

❖ Desde el punto de vista de la fisiología celular, los antioxidantes se clasifican en:

- **Primarios:** son endógenos y previenen la formación de nuevos radicales libres (RL), actuando en el inicio de la cadena de oxido-reducción, convirtiendo los RL existentes en moléculas menos perjudiciales (por ejemplo, enzimas antioxidantes: catalasa, superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa y reductasa, etc y otras moléculas no enzimáticas como el glutatión reducido).

- **Secundarios:** son exógenos y actúan al bloquear alguna etapa de la cadena de oxidación ya iniciada capturando radicales libres cuando hay sobreproducción de éstos, evitando así las reacciones en cadena (por ejemplo, Vitamina C, Vitamina E,  $\beta$ -caroteno...).

- **Terciarios:** son endógenos y su mecanismo de defensa se basa en la reparación de biomoléculas dañadas por los radicales libres. Incluyen enzimas reparadoras del ADN entre otras.

- ❖ Desde el punto de vista bioquímico, los antioxidantes se clasifican en **enzimáticos** y **no enzimáticos**. En esta tesis, se describen los antioxidantes en función de ésta última clasificación bioquímica.

### 3.6.1. ENZIMAS ANTIOXIDANTES

#### 3.6.1.1. Catalasa

La catalasa detoxifica el peróxido de hidrógeno mediante su conversión a agua y a una molécula de oxígeno (Chance et al, 1979).

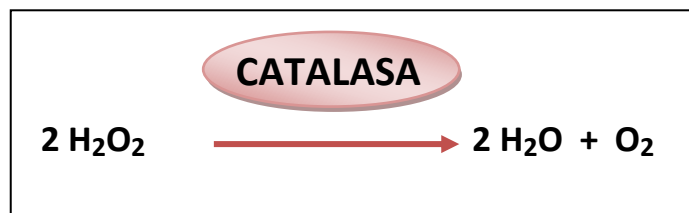


Figura 7. Reacción de la Catalasa, eliminando peróxido de hidrógeno

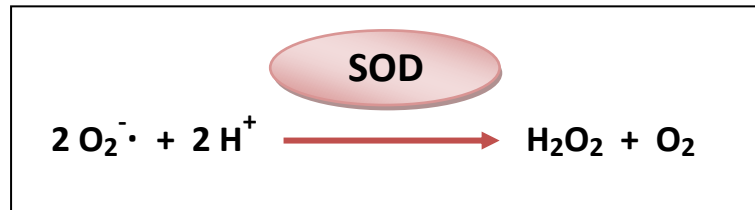
La enzima se presenta en forma de homotetrámero y se localiza principalmente en los peroxisomas (Tolbert and Essner, 1981), aunque también se ha descrito cierta actividad catalasa en mitocondrias y citosol (Eriksson et al, 1992; Prasad et al, 1994).

El peróxido de hidrógeno es un residuo del metabolismo celular de muchos organismos vivos y tiene entre otras, una función protectora contra microorganismos patógenos, pero dada su toxicidad debe transformarse rápidamente en compuestos menos peligrosos, función en la que juega un papel esencial la catalasa.

#### 3.6.1.2. Superóxido Dismutasa

La superóxido dismutasa es una familia de metaloproteínas ampliamente distribuida en los organismos vivos. Está presente en todas las células aeróbicas, e incluso en algunas bacterias anaeróbicas (Hassan and Fridovich, 1978). Constituyen la primera defensa frente al daño oxidativo que pueden causar el ión superóxido y las especies reactivas derivadas de éste (Fridovich, 1974). Su actividad fue descrita por primera vez en 1969 (McCord and Fridovich, 1969).

La superóxido dismutasa (SOD) cataliza la dismutación de superóxido en oxígeno y peróxido de hidrógeno. Debido a esto, es una importante defensa antioxidante en la mayoría de las células expuestas al oxígeno.



**Figura 8. Reacción de la SOD** para eliminar el anión superóxido, produciendo peróxido de hidrogeno

El anión superóxido (O<sub>2</sub><sup>-·</sup>) dismuta espontáneamente a O<sub>2</sub> y peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) de forma bastante rápida. La SOD es biológicamente necesaria porque el superóxido reacciona aún más rápido con NO<sup>·</sup> para formar peroxinitrito. Para evitarlo, la SOD elimina el anión superóxido. Aunque la vida media del superóxido es muy corta a concentraciones muy elevadas, es bastante larga a bajas concentraciones (Fridovich, 1974).

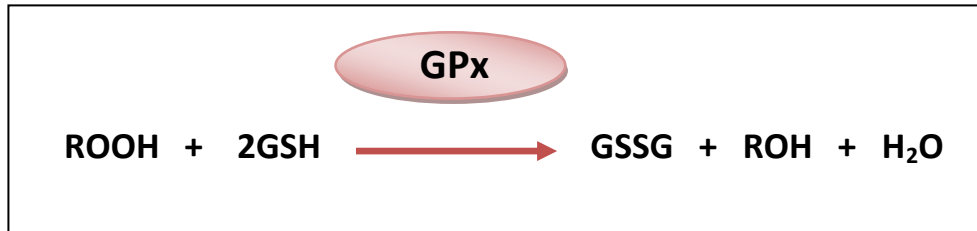
En mamíferos existen tres isoformas de superóxido dismutasa: SOD1, SOD2 y SOD3. La primera es un dímero, mientras que las otras son tetrámeros.

SOD1 y SOD3 contienen cobre y zinc, mientras que SOD2 tiene manganeso en su centro activo.

Las isoforma SOD1 se localiza en el citoplasma y en el núcleo, y se encuentran en elevadas concentraciones en hígado, cerebro y testículos, y en menor proporción en eritrocitos, pulmón y páncreas. SOD2, en mamíferos se encuentra mayoritariamente en la matriz mitocondrial (Weisiger and Fridovich, 1973; Kinnula et al, 1995) y en menor medida en el citosol. Su presencia en la mitocondria es de gran importancia, puesto que la cadena respiratoria mitocondrial es una de las principales fuentes generadoras de superóxido (Boveris y Chance, 1973). Por último, SOD3 es extracelular y se caracteriza por su elevada masa molecular (Marklund et al, 1982). Aunque esta isoforma es detectable en plasma, se localiza principalmente en el espacio extracelular de vasos sanguíneos, corazón, pulmones, riñón y placenta (Nozik-Grayck et al, 2005), probablemente para interceptar el daño causado por el superóxido que liberan neutrófilos y macrófagos (Fridovich, 1997).

### 3.6.1.3. Glutati3n Peroxidasa

La glutati3n peroxidasa (GPx) cataliza la reacci3n de reducci3n y, por tanto eliminaci3n, de hidroper3xidos y lipoper3xidos generados en las c3lulas utilizando como donante de electrones el glutati3n reducido, oxid3ndolo a glutati3n disulfuro (Chance, 1979).



**Figura 9. Reacci3n catalizada por la glutati3n peroxidasa (GPx):** ROOH puede ser un hidroper3xido o un lipoper3xido. Cuando ROOH es un hidroper3xido (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) la GPx lo reduce a H<sub>2</sub>O. Cuando ROOH es un lipoper3xido (LOOH) la GPx lo reduce a LOH.

Existen dos tipos de glutati3n peroxidasa, una dependiente de selenio (Se-GPx), y otra que no contiene selenio (GPx).

La Se-GPx es una prote3na tetram3rica con cuatro 3tomos de selenio, que cataliza la reducci3n del per3xido de hidr3geno y per3xidos org3nicos (Ketterer, 1986). Su centro activo contiene una ciste3na unida covalentemente a un 3tomo de selenio (Forstrom et al, 1978). Su actividad se ve muy afectada por el contenido en selenio de la dieta (Ketterer, 1986).

Por otro lado, la glutati3n peroxidasa no dependiente de selenio s3lo tiene actividad frente a per3xidos org3nicos (Ketterer, 1986). La mayor parte de la actividad glutati3n peroxidasa se encuentra en el citosol, aunque tambi3n est3 presente en la matriz mitocondrial (Ketterer, 1986).

En mam3feros, las 4 isoformas de GPx dependientes de selenio m3s importantes son (Margis et al, 2008):

- **GPx-1:** se encuentra en eritrocitos, h3gado, pulm3n y ri3n. A nivel subcelular, ha sido identificada en citosol, n3cleo y mitocondria. Su funci3n es reducir hidroper3xidos inorg3nicos (Brown et al, 2000).
- **GPx-2:** se encuentra en el tracto gastrointestinal acumul3ndose en citosol y n3cleo.

## I. Introducción

---

- **GPx-3:** es una GPx plasmática. Es una proteína secretada, localizada también en citosol.

- **GPx-4:** está distribuida ampliamente en diferentes tejidos, presente en citosol, núcleo, mitocondrias y unida a membranas. Su estructura es monomérica. Se encarga de reducir mayoritariamente los peróxidos lipídicos (Brown et al, 2000).

### 3.6.1.4. Glutathión Reductasa

La Glutathion Reductasa (GR) cataliza la reducción de GSSG a GSH mediante la oxidación de NADPH a NADP<sup>+</sup>.

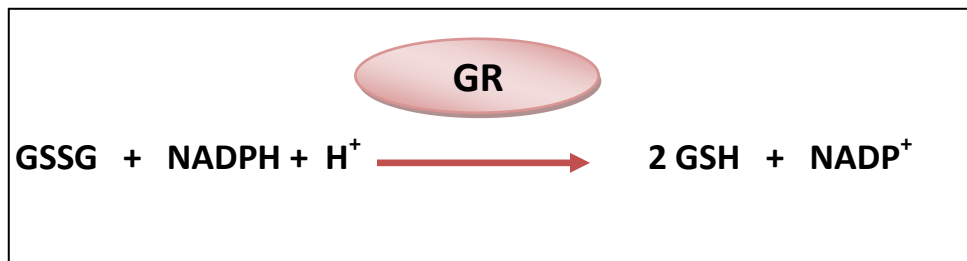


Figura 10: Reacción de reducción del GSSG catalizada por la glutathión reductasa (GR)

La GR es esencial, no sólo para el mantenimiento del GSH intracelular y la protección de los grupos tiol (-SH) de las proteínas frente a alteraciones estructurales, sino también para proporcionar el GSH necesario para mantener la actividad de la GPx (Figura 13).

### 3.6.1.5. Glutathión S-Transferasa

La glutathión S-transferasa (GST) es una enzima encargada de catalizar la conjugación del GSH con una amplia gama de moléculas electrófilas, reduciéndolo, por lo que es un importante componente del sistema de detoxificación de drogas, pesticidas y otros xenobióticos. También está implicada en el metabolismo de moléculas endógenas como el leucotrieno A4 o la prostaglandina A1.

Esta enzima no elimina directamente radicales libres. Su función es conjugar el glutathión, a través de su grupo sulfhidrilo (nucleofílico), con especies que han sido modificadas por

radicales libres (lipoperóxidos...) para eliminarlas, participando así en la reducción del estrés oxidativo.

Según su localización, existen principalmente 3 isoformas de GST: citosólica (cGST), mitocondrial (mGST) y microsomal.

### **3.6.2. ANTIOXIDANTES NO ENZIMÁTICOS**

Son moléculas que reaccionan directamente, sin que sea necesaria ninguna intervención enzimática, con las especies reactivas o con los productos de reacción de éstas. En ocasiones pueden participar también en procesos antioxidantes enzimáticos. Entre los antioxidantes no enzimáticos se encuentra el glutatión, la vitamina C, la vitamina E, los  $\beta$ -carotenos y el ácido úrico.

#### **3.6.2.1. Glutatión**

Es el tiol no proteico más abundante en las células de mamíferos . Constituye el principal antioxidante endógeno no enzimático, ya que su concentración intracelular (3-5  $\mu\text{mol/g}$  de tejido seco en hepatocitos de rata) es tan elevada como la concentración de glucosa, que es de las moléculas más comunes dentro de la célula (Viña et al, 1978). En sangre, se ha descrito que los niveles de glutatión son de 2.5mM (Waggiallah and Alzohairy, 2011).

Fue descubierto por Hopkins en 1921, pero fueron Harington y Mead, en 1935, quienes describieron finalmente la estructura correcta de la molécula, constituida por 3 aminoácidos: ácido glutámico, cisteína y glicina. Su estructura le confiere unas características que le otorgan una amplia e importante funcionalidad en la célula.

Puede encontrarse en dos formas según su estado de oxidación-reducción: glutatión reducido (GSH) o glutatión oxidado (GSSG), siendo el GSSG la combinación de dos moléculas de GSH unidas por un puente disulfuro.

El GSH desempeña numerosas e importantes funciones metabólicas (Viña, 1990), entre ellas, protege a la célula frente al ataque oxidativo, bien sea por radicales libres, peróxidos u otros agentes dañinos como las radiaciones.

## I. Introducción

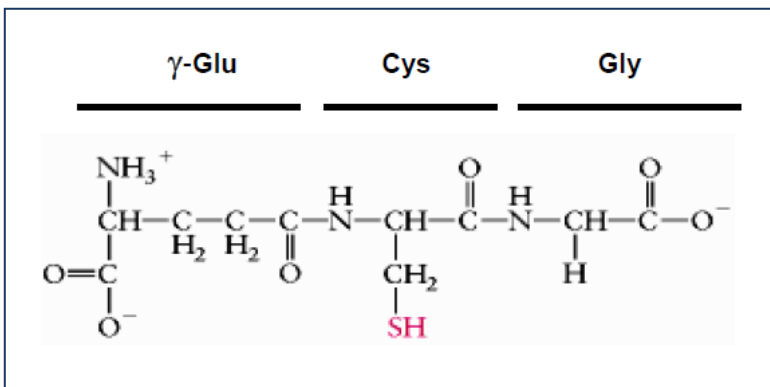
- **Estructura química:**

Su estructura química es determinante para que el GSH desempeñe muchas de sus funciones fisiológicas:

- un grupo tiol (-SH) de la cisteína le capacita para intervenir en reacciones redox y,

- un enlace  $\gamma$ -glutámico que le confiere resistencia a la degradación por peptidasas celulares. De hecho, este enlace sólo es hidrolizable por la enzima  $\gamma$ -glutamil transpeptidasa localizada en la membrana celular (Viña et al, 1992).

(A)



(B)

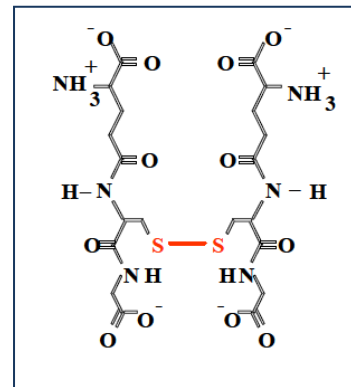


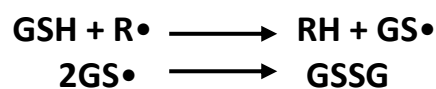
Figura 11. Estructura química del GSH:  $\gamma$ -glutamil cistein glicina (A) y del GSSG (B)

- **Propiedades físico-químicas:**

Gracias al grupo tiol (-SH) de la cisteína, el glutatión puede intervenir en reacciones de naturaleza redox, intercambiando electrones a través de éste (Kosower y Kosower ,1978), pudiendo reaccionar de las siguientes formas:

**1) Reacción directa con un radical libre:**

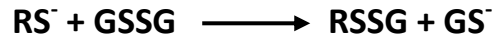
El GSH reacciona con un radical libre formándose el radical  $GS^\bullet$ , que es estable y persiste hasta encontrar otro radical y formar una molécula de GSSG.





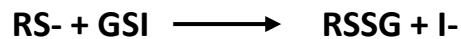
## 2) Intercambio tiol-disulfuro:

Puede reaccionar estando en forma oxidada con otro tiol uniéndose una molécula de glutatión al tiol formando GS<sup>-</sup>.



## 3) Oxidación dieléctrica:

Se produce a través de la formación de un intermediario, seguida por la sustitución de una molécula adecuada. Este mecanismo es uno de los empleados para deplecionar GSH de forma no enzimática:



- **Localización del GSH: glutatión mitocondrial, nuclear y endoplasmático**

La concentración y el estado redox del glutatión no es igual en los diferentes compartimentos celulares. La distribución y los niveles de glutatión en la mitocondria y citosol se describió por Sies y cols. (Wahlländer et al, 1979). El glutatión tiene diferente tasa de renovación en la mitocondria que en el citosol (Griffith y Meister, 1985). No se sintetiza en la mitocondria, pero se transporta a este orgánulo desde el citosol por un transportador específico. El glutatión mitocondrial tiene importantes funciones tanto en la fisiología normal como en situaciones patológicas (Linnane et al, 1989). Juega un papel en el envejecimiento (Miquel et al, 1980). En ratas, el GSH disminuye ligeramente (un 30%) con la edad en el citoplasma. Sin embargo, disminuye marcadamente en la mitocondria (Sastre et al, 1996). Además, existe una correlación entre el glutatión mitocondrial y el incremento del estrés oxidativo en el ADN de la mitocondria (de la Asuncion et al, 1998).

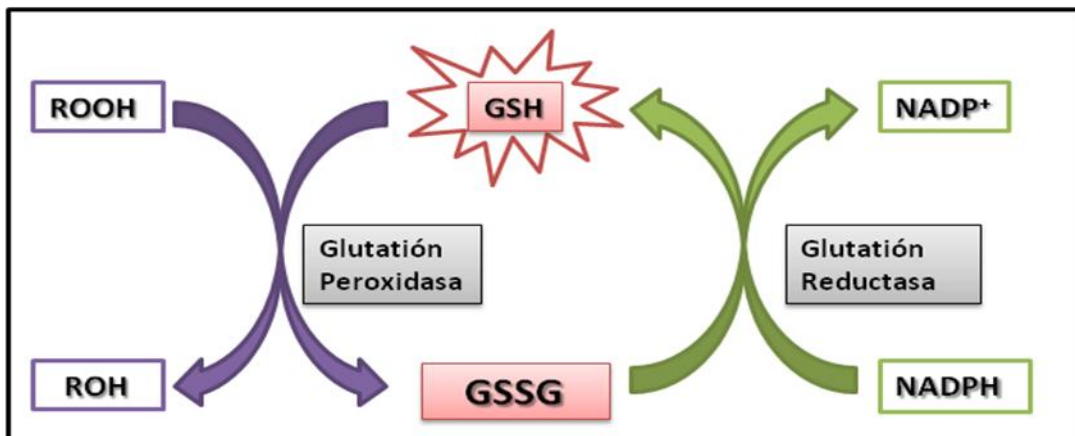
El retículo endoplasmático es otro compartimento celular en el que el glutatión juega un papel importante, particularmente debido a su relevancia en el plegamiento de proteínas de secreción (Trimm et al, 1986; Hwang et al, 1992).

- **Funciones fisiológicas del GSH**

El GSH participa en gran cantidad de procesos fisiológicos, incluyendo:

1. Papel en la síntesis del DNA: en este proceso se requiere la reducción de ribonucleótidos para formar desoxirribonucleótidos, reacción catalizada por la ribonucleótido reductasa. Debe intervenir un donante de hidrógeno que puede ser la tiorredoxina, o la glutarredoxina (Holmgren, 1979) dependiente de GSH.

2. Papel protector frente al estrés oxidativo (antioxidante). Dado que el GSH es uno de los antioxidantes principales de la célula, constituye una importante barrera de protección frente al estrés oxidativo (Sies, 1986). El GSH protege a la membrana celular contra el daño oxidativo ya que mantiene el estatus tiólico de la misma (Kosower y Kosower, 1983). El GSH puede excretarse también de las células y actuar como mecanismo de emergencia frente al daño que un exceso de GSSG puede causar, puesto que el GSSG reacciona con los grupos tioles de proteínas formando disulfuros mixtos (Ishikawa et al, 1989). El GSH también participa en la detoxificación de peróxidos por la glutatión peroxidasa.



**Figura 12. Ciclo redox del glutatión:** cuando se da una agresión oxidativa, el GSH se oxida a GSSG por medio de la reacción catalizada por la glutatión peroxidasa. El GSSG formado es inmediatamente reducido a GSH por medio del enzima glutatión reductasa. La glutatión reductasa requiere NADPH como cofactor, que será suministrado por la glucosa-6-fosfatodeshidrogenasa

El GSH puede reaccionar directamente con los radicales libre, sin necesidad de intervención enzimática, o bien mediante la glutatión peroxidasa (GPx), que es una enzima clave del ciclo redox del glutatión.

Los niveles de glutatión en la célula son muy altos, sin embargo, los niveles de la forma oxidada GSSG son significativamente más bajos. Asumiendo la glutatión reductasa en equilibrio y conociendo la relación NADP/NADPH, la relación GSH/GSSG debería ser cercana al valor de 10,000. A pesar del cuidado experimental, en el laboratorio se encuentran relaciones entre 10 y 100, por lo que se puede suponer que la glutatión reductasa no está en equilibrio in vivo (Viña et al, 1978). Por tanto, un cambio de glutatión reducido por oxidación de un 5% puede suponer un incremento de GSSG de más del 100%. Ésto implica que experimentalmente se ha de utilizar un método de medida que conlleve una oxidación del GSH mínima para poder medir con precisión el GSSG (Asensi et al, 1994).

3. Papel en la regulación de la síntesis de proteínas. Cuando el GSH se oxida los procesos de iniciación y elongación de la traducción del ARN mensajero se inhiben (Ochoa, 1983). Cuando el GSSG se reduce, la elongación se reanuda.

4. Colabora en la detoxificación de xenobióticos catalizada por la Glutathion S-Transferasa (Orrenius and Moldeus, 1984).

5. Contribuye a la captación de aminoácidos en algunos tejidos, como la glándula mamaria (Viña et al, 1989a).

6. Constituye un reservorio de grandes cantidades de cisteína (Tateishi et al, 1974b).

7. Modula actividades enzimáticas, por glutathionilación o por regulación del estatus redox (Pajares et al, 1992a; 1992b), y es coenzima de un sistema enzimático cuya función es poco conocida, el sistema de la glioxalasa. El GSH también mantiene la correcta estructura tridimensional de muchas proteínas que en ocasiones están S-glutathioniladas.

8. Juega un papel en la homeostasis del calcio (Bellomo et al, 1982).

9. Participa en la regulación de la proliferación celular (Terrádez et al, 1993) y, se ha relacionado asimismo con la resistencia de la célula a la muerte por apoptosis o por necrosis (Higuchi, 2004).

## **4. ESTRÉS OXIDATIVO EN EH CLÍNICA Y MÍNIMA**

Se dispone de muy escasa información en cuanto al papel del estrés oxidativo/nitrosativo en la patogénia de la EHM. La presente tesis estudia dicho papel en pacientes con EHM.

Investigaciones recientes indican que el estrés oxidativo podría tener un papel importante en la patogenia de la EH. Aunque los factores involucrados en la patogenia de la EH (hiperamonemia, inflamación) son capaces de generar radicales libres y disminuir la capacidad antioxidante, la participación exacta de las especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno (ROS/RNS) en la EH crónica y los mecanismos implicados no se conocen.

### **4.1. ESTRÉS OXIDATIVO/NITROSATIVO EN MODELOS ANIMALES DE EH CRÓNICA**

En estudios con ratas con EH crónica debida a anastomosis porta-cava (PCS) se ha visto que hay un aumento en la expresión de iNOS en cerebro, lo que conduce a un aumento de óxido nítrico (NO). Esta condición, propicia que el NO, reaccione con el  $O_2^-$  (potenciado por HA) dando lugar a peroxinitrito que entre otras funciones dañinas, nitraría residuos de Tyr. Se ha descrito un aumento de nitración de tirosina de proteínas en cerebro de ratas PCS respecto a las ratas control (Suárez et al, 2006).

Las ratas PCS también presentan en cerebro un aumento de la actividad NOS (Rao et al, 1995) y un aumento de expresión de iNOS y nNOS (Rao et al, 2002; Suárez et al, 2005, 2006).

Otros estudios en ratas PCS muestran un aumento en la nitración de los residuos tirosina en proteínas y en la oxidación de ARN en cerebro, indicando la presencia de estrés oxidativo. Las ratas PCS presentan además de hiperamonemia, aumento de ARNm de IL-6 y alteraciones motoras. La administración diaria de indometacina (que inhibe las ciclooxigenasas y formación de prostanoïdes) fue capaz de prevenir éstos efectos, excepto la hiperamonemia (Brück et al, 2011).

En corteza y cerebelo de ratas con EH debida a ligadura biliar (BDL), aumentan los niveles de nitritos, de malondialdehido (MDA, marcador de oxidación de lípidos), y la actividad superóxido dismutasa y, disminuyen los niveles de glutatión reducido y las actividades catalasa, glutatión peroxidasa, glutatión reductasa y glutatión transferasa, enzimas implicadas en la reducción del estrés oxidativo. La administración de N-acetilcisteína (NAC), un

antioxidante precursor del glutatión, restaura los niveles de nitritos, MDA y GSH y la actividad de éstas enzimas y, mejora las alteraciones motoras y cognitivas (Dhanda et al, 2012). Esto sugiere que el estrés oxidativo contribuye a estas alteraciones neurológicas.

Bosoi et al. (2012), estudiaron el estrés oxidativo y las defensas antioxidantes en ratas PCS (4 semanas) y BDL (6 semanas), midiendo radicales libres ( $H_2O_2$ ) y defensas antioxidantes en plasma y en cerebro. En las ratas PCS no encontraron un aumento de los parámetros de estrés oxidativo sistémico analizados, mientras que en las ratas BDL aumenta el  $H_2O_2$  en plasma respecto a sus controles, y disminuyen las defensas antioxidantes como la actividad catalasa, el GSH y el cociente GSH/GSSG y aumenta la actividad glutatión reductasa. En corteza cerebral, solo encontraron un aumento de la actividad glutatión reductasa, tanto en PCS como en BDL.

Por tanto, aunque escasos, algunos estudios sugieren la presencia de estrés oxidativo en modelos de EHM en ratas.

#### **4.2. ESTRÉS OXIDATIVO/NITROSATIVO EN PACIENTES CON EH CRÓNICA**

Negru et al. (1999) encontraron valores elevados de radicales libres, y una capacidad antioxidante disminuida en pacientes con EH por cirrosis hepática por consumo de alcohol.

Görg et al. (2010) estudiaron el estrés oxidativo/nitrosativo en muestras 'post-mortem' de corteza cerebral de pacientes con cirrosis sin y con EH. Encontraron un aumento de marcadores de estrés oxidativo en el córtex cerebral de los pacientes con EH: un aumento en la nitración de residuos Tyr de proteínas de entre 20-75kDa, aumento de oxidación de RNA (aumento de 8-hidroxiguanosina) en la corteza de los pacientes cirróticos con EH pero no en los cirróticos sin EH. También observaron un aumento marcado de la expresión de Hsp27 (proteína marcadora de estrés oxidativo). En pacientes con EH no encontraron diferencias en la superóxido dismutasa dependiente de cobre ó zinc ni de nNOS, pero sí una disminución en la actividad de la glutamina sintetasa (posiblemente debida a la nitración de tirosina). En pacientes cirróticos sin EH, no vieron cambios significativos en ningún parámetro. Estos datos muestran la existencia de estrés oxidativo/nitrosativo que podría jugar un papel en la patogénesis de la EH en pacientes cirróticos.

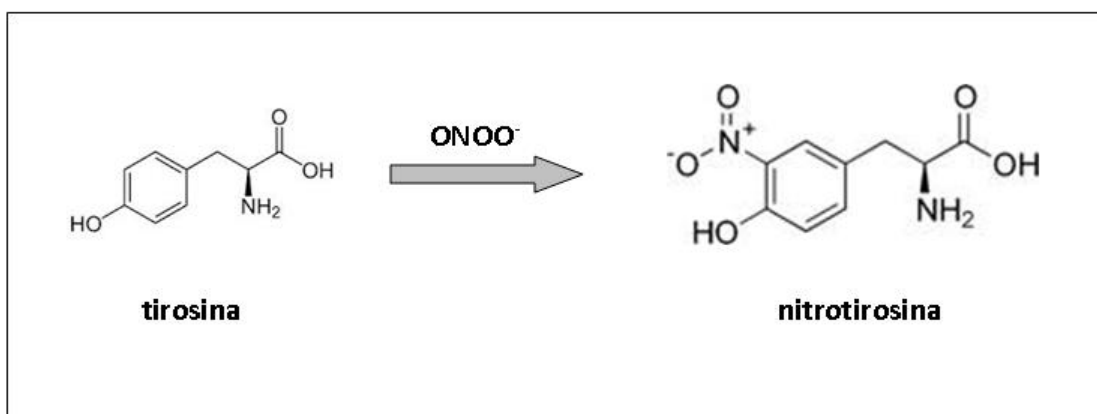
En un reciente estudio realizado en biopsias de cerebros de pacientes con cirrosis hepática con y sin EH se analizó la expresión de numerosos genes en corteza cerebral y sevió

## I. Introducción

que los pacientes con EH muestran un patrón alterado en la expresión de genes asociados al estrés oxidativo respecto a los pacientes sin EH, con aumento de genes antioxidantes: hemoxigenasa-1 (HO-1), selenoproteína-V, peroxiredoxina-4 y el receptor  $\alpha$  activado del peroxisoma proliferador (PPAR $\alpha$ ) pero no en genes prooxidantes (NOS) (Görg et al, 2013).

Estos estudios se realizaron en pacientes con EH clínica. En los últimos años se ha puesto de manifiesto el interés de obtener marcadores periféricos de la encefalopatía hepática mínima (fase previa a la EH clínica, sin sintomatología) para poder discernir los pacientes cirróticos que la padecen y los que no. Se ha propuesto la 3-NT como un buen biomarcador periférico (en suero) de la patología (Montoliu et al, 2011).

Un estudio realizado por nuestro grupo en pacientes con cirrosis hepática para identificar un biomarcador periférico que fuese capaz de diagnosticar la EHM, demostró que la 3-Nitrotirosina (3-NT) es un excelente biomarcador periférico de EHM, con una sensibilidad del 89%, una especificidad del 93% y un valor predictivo positivo y negativo del 91%. En este estudio se encontraron niveles de 3-nitrotirosina (3-NT) libre muy aumentados en suero de pacientes cirróticos con EH mínima (EHM) comparados con los pacientes sin EHM. Estos resultados indican presencia de estrés oxidativo/nitrosativo en pacientes con EHM, ya que la 3-NT es un indicador de estrés oxidativo/nitrosativo por que se forma por reacción de la tirosina con peroxinitrito, que es muy reactivo y es capaz de nitrar residuos tirosina (libres o de proteínas), dando lugar a 3-NT (Figura 13). El peroxinitrito se forma por reacción del anión superóxido y el óxido nítrico. Por tanto, el aumento de 3-NT refleja un aumento de estrés oxidativo y nitrosativo en pacientes con EHM (Montoliu et al, 2011).



**Figura 13. Formación de la nitrotirosina, por nitración de un residuo tirosina por peroxinitrito**

En otro estudio realizado por nuestro grupo, se evaluó la capacidad para conducir vehículos, utilizando un simulador de conducción y una batería de tests psicométricos en pacientes con cirrosis hepática con y sin EHM. Se comprobó que los pacientes con EHM muestran enlentecimiento psicomotor, tiempos de reacción más largos y deterioro de la coordinación bimanual y visuomotora, disminución de la atención y de la velocidad de anticipación. En estos pacientes hay un aumento de la 3-NT (marcador de estrés oxidativo/nitrosativo) en suero que correlaciona con la mala conducción de vehículos, lo cual sugiere que el estrés oxidativo/nitrosativo podría contribuir a las alteraciones cerebrales que finalmente conducen al deterioro de la capacidad para conducir correctamente en pacientes con EHM (Felipo et al, 2013).





## **II. OBJETIVOS**



Los pacientes cirróticos con Encefalopatía Hepática Mínima (EHM) presentan alteraciones neurológicas, tanto cognitivas como motoras. Las principales causas que conducen estas alteraciones en EHM son la hiperamonemia y la inflamación, que actúan sinérgicamente.

Los niveles de 3-nitrotirosina (3-NT) en suero son mucho mayores en los pacientes con EHM que en los pacientes sin EHM. La determinación de 3-NT es un buen marcador para el diagnóstico de la EHM, con alta sensibilidad y especificidad. La 3-NT es un marcador de la presencia de estrés oxidativo/nitrosativo. Estos datos sugieren que el estrés oxidativo/nitrosativo contribuye al deterioro cognitivo y motor en EHM. Teniendo en cuenta esta hipótesis, los objetivos de esta tesis han sido:

1. Caracterizar diferentes alteraciones neurológicas mediante tests psicométricos que evalúan funciones cognitivas y motoras específicas en pacientes con y sin EHM:
  - 1.1. Alteraciones en la atención: selectiva, selectiva-sostenida, velocidad de procesamiento mental, concentración...
  - 1.2. Alteraciones en la memoria de trabajo
  - 1.3. Alteraciones en la coordinación bimanual y visuoespacial
2. Determinar la capacidad predictiva de EHM de los tests psicométricos utilizados
3. Estudiar el estrés oxidativo/nitrosativo en pacientes cirróticos sin y con EHM en comparación a los sujetos control
  - 3.1. Evaluación del daño oxidativo/nitrosativo en las principales biomoléculas (proteínas, lípidos y ácidos nucleicos) en sangre
  - 3.2. Estudio de los mecanismos antioxidantes en sangre
    - 3.2.1. Actividad de las enzimas antioxidantes en eritrocitos y células mononucleares
    - 3.2.2. Mecanismo antioxidante no enzimático: Glutación en sangre total
  - 3.3. Análisis de las especies reactivas del oxígeno/nitrógeno (ROS/RNS) en distintas poblaciones celulares de la serie blanca mediante citometría de flujo
    - 3.3.1. Niveles basales de ROS/RNS
    - 3.3.2. Niveles de ROS/RNS en respuesta a un aumento del estrés oxidativo

## ***II. Objetivos***

---

4. Correlacionar las diferentes alteraciones neurológicas con los parámetros medidos en sangre indicadores de inflamación, hiperamonemia y estrés oxidativo, para evaluar su posible papel en el deterioro neurológico en EHM.

### **III. MATERIAL Y MÉTODOS**



## 1. PACIENTES Y CONTROLES

En el presente estudio se seleccionaron 80 pacientes con cirrosis hepática diagnosticada por biopsia hepática o por combinación de criterios clínicos, analíticos y radiológicos, y que eran controlados en el Servicio de Digestivo del Hospital Clínico Universitario de Valencia y del Hospital Arnau de Vilanova de Valencia. En el estudio también participaron 42 sujetos sanos, como grupo control. Todos los individuos participaron en el estudio después de dar su consentimiento informado. El proyecto fue aprobado por los Comités Éticos de ambos hospitales, y se desarrolló de acuerdo con la Declaración de Helsinki (1975).

Los criterios de exclusión para los pacientes fueron:

- deterioro cognitivo resultante de otra patología neuropsiquiátrica
- consumo de alcohol en los últimos 6 meses
- insuficiencia hepática avanzada (índice MELD > 25)
- encefalopatía hepática clínica (escala de West-Haven  $\geq 1$ )
- hepatocarcinoma u otra patología con una supervivencia estimada menor a 3 meses
- derivación porto-sistémica intrahepática transyugular o shunt porto-sistémico quirúrgico ó peritonitis bacteriana espontánea

En el grupo de sujetos sanos se descartó cualquier enfermedad hepática mediante análisis clínico, serológico y ecográfico.

- Protocolo del estudio:

En primer lugar, se revisó la historia clínica de los pacientes y, se analizaron y registraron las siguientes variables:

- datos demográficos: edad, género y nivel de formación
- etiología de la cirrosis (alcohol, virus de la hepatitis C, etc)
- presencia de otras patologías (cáncer, diabetes, EPOC, insuficiencia renal, hipertensión arterial, etc)
- descompensaciones: presencia de varices esofágicas, episodios anteriores de encefalopatía hepática, presencia de ascitis, hipertensión portal.
- parámetros séricos de laboratorio (enzimas indicadoras de la función hepática, bilirrubina, albúmina, hemograma, marcadores tumorales...)
- cálculo de los índices de función hepática Child-Pugh y MELD (ver página 4)

- tratamiento farmacológico del paciente
- hábitos dietéticos (restricción protéica, etc)

Se citó a los pacientes y los controles para que acudieran en ayunas, se les tomó una muestra de sangre y realizaron, el mismo día, la batería de tests psicométricos descrita a continuación.

#### **1.1. EXTRACCIÓN DE LA SANGRE**

Las muestras de plasma (5 ml) se extrajeron en tubos BD Vacutainer con EDTA como agente anticoagulante. Dichas muestras se centrifugaron a 3000 x g, 10 minutos a temperatura ambiente. Se recogió el sobrenadante y se conservó a -80°C en alícuotas de 200 µl.

Las muestras de suero (5 ml) se extrajeron con tubos BD Vacutainer sin EDTA y se centrifugaron a 3000 x g, 10 minutos a temperatura ambiente. Se recogió el sobrenadante y se conservó a -80°C en alícuotas de 200 µl.

Otra muestra de sangre (5 ml) se tomó en tubos BD Vacutainer con EDTA y no se centrifugó, para la posterior obtención células mononucleares, medición instantánea del amonio (como se describirá más adelante) y toma de una alícuota para medir el GSH.

Finalmente, obtuvimos otros dos tubos de sangre (2-2,5 ml) con citrato como agente anticoagulante: uno para el aislamiento de eritrocitos y otro para el estudio parámetros de estrés oxidativo mediante citometría de flujo.

#### **1.2. REALIZACIÓN DE LOS TESTS PSICOMÉTRICOS**

Los tests psicométricos se realizaron el mismo día de la extracción de la sangre, en una habitación tranquila y con la luz adecuada para favorecer la concentración de los sujetos.



## 2. DIAGNÓSTICO DE ENCEFALOPATÍA HEPÁTICA MÍNIMA (EHM)

### 2.1. PHES

Para el diagnóstico de la EHM se utilizó la batería de tests psicométricos PHES (Psychometric Hepatic Encephalopathy Score), considerada como 'gold standard' para el diagnóstico de la EHM (Weissenborn et al, 2001; Ferenci et al , 2002). Esta batería está compuesta por cinco tests psicométricos (Figura 14):

1. **Test de Dígitos y Símbolos (DST):** evalúa la velocidad de procesamiento y la memoria de trabajo. Consiste en una serie de números (1-9) cada uno de los cuales lleva asociado un símbolo diferente (Figura 14A). El sujeto debe escribir debajo de cada número, el símbolo que le corresponde, en un tiempo de 90 segundos. El test se puntúa con el número de aciertos realizados en dicho tiempo.

2. **Test de conexión numérica A (NCT-A):** evalúa la velocidad de procesamiento y la atención. Consiste en un conjunto de números (1-25) colocados de forma desordenada y el sujeto los tiene que unir trazando líneas en orden ascendente (1-2-3...-25) (Figura 14B). Se puntúa con el tiempo, en segundos, que se tarda en realizar la tarea.

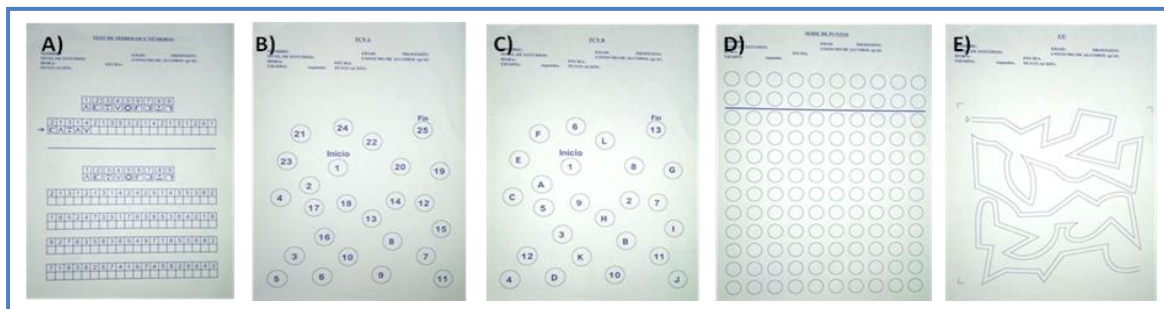


Figura 14. Batería de tests psicométricos PHES: DST (A), NCT-A (B), NCT-B (C), SD (D), LTT (E)

3. **Test de conexión numérica B (NCT-B):** evalúa la velocidad de procesamiento y la atención. Consiste en un conjunto de números (1-13) y letras (A-L), colocados de forma desordenada y el sujeto tiene que unir con líneas los números y las letras de forma alterna por orden ascendente (1-A-2-B-3...-L-13) (Figura 14C). Se puntúa con el tiempo (segundos) que se tarda en realizar la tarea.

4. **Test de puntos seriados (SD):** evalúa la coordinación visuoespacial. Consiste en un conjunto de círculos en donde el sujeto tiene que marcar con el rotulador un punto en el centro (Figura 14D). Se puntúa con el tiempo (segundos) que se tarda en realizar la tarea.

5. **Test de línea quebrada (LTT):** evalúa la coordinación visuoespacial. Consiste en realizar un recorrido con un rotulador entre dos líneas con tramos rectos y curvos, que el sujeto debe evitar tocar y salirse de ellas (Figura 14E). Se puntúa con el tiempo que se tarda en realizar la tarea. Para su corrección se utiliza una plantilla con el tramo recorrido dividido en cuadros para penalizar con segundos de más el número de cuadros en los que el sujeto toca o se sale del recorrido.

- Cálculo del PHES:

Para el cálculo numérico del PHES se utiliza una aplicación informática que calcula el PHES utilizando los valores de referencia obtenidos para la población española por la Red Española de Encefalopatía Hepática (Romero-Gómez et al, 2006). La aplicación se encuentra en la página web <http://www.redeh.org>. Se introducen los siguientes parámetros:

- edad del sujeto
- nivel de estudios (años estudiados)
- puntuación de cada subtest: número de aciertos en el DST y tiempo de realización de la tarea en el resto de subtests.

Una vez introducidos estos datos, el programa mediante un ajuste con la edad y el nivel de estudios, puntúa cada subtest con un valor numérico (número entero) positivo o negativo dependiendo de si el sujeto ha realizado la tarea mejor o peor de lo esperado respectivamente y, suma todos los subtests, puntuando de manera global el PHES. Se considera que un paciente tiene EHM cuando la puntuación global es -4 o menor.

## 2.2. FRECUENCIA CRÍTICA DE PARPADEO (FCP)

La frecuencia crítica de parpadeo ha sido propuesta como método alternativo para el diagnóstico de EHM en pacientes cirróticos (Kircheis et al, 2002).

Se determina la frecuencia de parpadeo máxima a la que el sujeto es capaz de identificar visualmente el parpadeo de la luz.

Se realiza en una habitación tranquila y con poca luz utilizando el aparato Hepatonorm™ Analyzer (R&R Medi-Business Freiburg GmbH, Freiburg, Germany). Consiste en unas 'gafas' en las que se muestra al sujeto un estímulo visual que consiste en un punto de luz roja sobre un fondo blanco a una distancia virtual de 12 metros (Figura 15). Este punto comienza a parpadear a una frecuencia máxima de 60 Hz (parece una luz fija) que va disminuyendo con el tiempo hasta que el sujeto indica que percibe el parpadeo mediante un control remoto que da por finalizado el ensayo. Primero se realiza una prueba sin paro manual para que el sujeto perciba la disminución de la frecuencia de parpadeo sin interferencia, y luego se procede a realizar 3 o 4 ensayos de prueba para que se familiarice con la prueba. Para la realización del test se efectúan 10 ensayos seguidos por sujeto apuntando los valores. El valor de FCP corresponde al valor medio de los 10 ensayos, expresado en Hz.



Figura 15. HepatoNorm: equipo y estímulo visual

### 3. ESTUDIO DE LAS ALTERACIONES COGNITIVAS EN PACIENTES CON EHM

#### 3.1. TEST STROOP DE COLORES Y PALABRAS

- Fundamento:

El test de Stroop de Colores y Palabras (Stroop, 1935) es una prueba de velocidad psicomotora y flexibilidad cognitiva que evalúa el funcionamiento del sistema de atención anterior. Este test ha sido utilizado para el estudio de múltiples patologías relacionadas con procesos cognitivos, como la dislexia, esquizofrenia, lesiones cerebrales, etc (Golden, 2001).

Se ha utilizado este test en esta tesis porque existen estudios que indican que los pacientes con EHM muestran déficits de atención (Amodio et al, 2005; Felipe et al, 2012; Bajaj et al, 2013).

### III. Material y Métodos

- Realización del test:

La prueba consta de tres hojas (Figura 16), en las cuales se muestran diferentes estímulos:

- En la primera hoja hay una matriz de 10 filas de cinco palabras cada una con nombres de cuatro colores (AZUL, ROJO, AMARILLO, VERDE) impresos en tinta de color negro: tarea congruente (Figura 16A).
- En la segunda hoja hay una matriz de 10 filas de cinco círculos impresos en diferentes colores (AZUL, ROJO, AMARILLO o VERDE): tarea neutra (Figura 16B).
- En la tercera hoja hay una matriz de 10 filas de cinco palabras cada una con nombres de los cuatro colores utilizados en las anteriores (AZUL, ROJO, AMARILLO, VERDE) impresas en tinta de diferente color al correspondiente a la palabra escrita: tarea incongruente (Figura 16C).

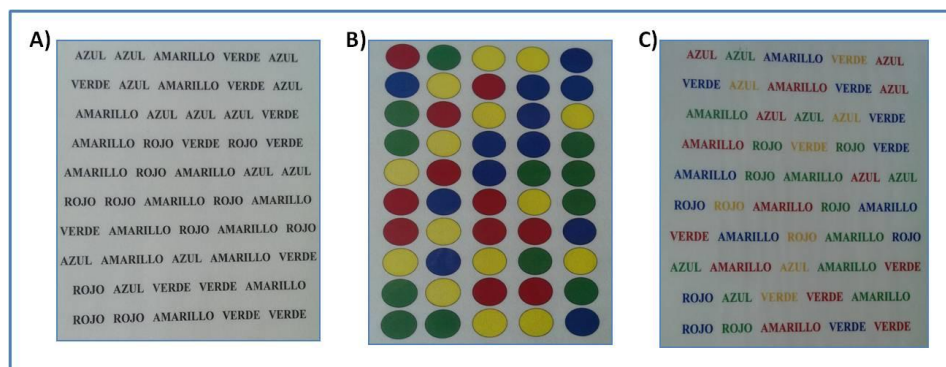


Figura 16. Test de Stroop: tarea congruente (A), neutra (B) e incongruente (C)

El individuo dispone de 45 segundos para leer las palabras de la hoja 1, otros 45 segundos para nombrar los colores de la hoja 2 y otros 45 para nombrar el color de la tinta en la que están escritas las palabras de la hoja 3. Si cuando acaba la matriz aún no ha finalizado el tiempo, la vuelve a empezar hasta que se cumplan los 45 segundos, nombrando el número máximo de ítems.

- Puntuación:

En este test obtenemos tres puntuaciones directas principales: número de palabras (P), número de colores (C) y número de palabras-colores (PC). Los errores no se tienen en cuenta pero producen una puntuación directa menor, ya que el sujeto es detenido para que repita el

elemento. Una vez obtenidos los valores de P, C y PC, se corrigen según la edad del individuo si ésta supera los 44 años (Golden, 2001):

Parámetro corregido	Adultos de 45-64 años	Adultos de 65-80 años
<b>PALABRAS (P)</b>	<b>P + 8</b>	<b>P + 14</b>
<b>COLORES (C)</b>	<b>C + 4</b>	<b>C + 11</b>
<b>PAL-COL (PC)</b>	<b>PC + 5</b>	<b>PC +15</b>

A partir de estos parámetros corregidos (P, C, PC) se calcula un parámetro denominado Interferencia, que mide básicamente la capacidad del individuo para separar los estímulos de nombrar colores y palabras, suprimiendo la respuesta de lectura y concentrándose en la tarea de nombrar los colores. Para determinar la puntuación de la interferencia pura se calcula la diferencia entre PC y la PC estimada (PC').

$$PC' = (C \times P) / (C + P)$$

$$INTERFERENCIA = PC - PC'$$

Una vez tenemos la puntuación directa (corregida) de P, C, PC y el valor de la INTERFERENCIA, la interpolamos en una tabla normalizada para la población española (Golden, 2001) con los valores correspondientes a la puntuación definitiva del test (puntuación T).

### 3.2. TEST d2:

- Fundamento:

El test d2 proporciona una medida concisa de la atención selectiva/sostenida y de la concentración mental, ya que evalúa la capacidad de atender selectivamente a ciertos aspectos relevantes de la tarea mientras se ignoran los irrelevantes de una forma rápida y precisa. Requiere una actividad de concentración en estímulos visuales.

En este test se reflejan tres componentes de la conducta atencional: velocidad o cantidad de trabajo realizado en un determinado tiempo; calidad de dicho trabajo (precisión) y relación entre velocidad y precisión (Brickenkamp, 2009).

### III. Material y Métodos

- Realización del test:

El test consiste en una hoja compuesta por 14 líneas con 47 caracteres cada una, las cuales contienen como estímulo visual las letras 'd' y 'p' acompañadas de una o dos pequeñas rallitas en la parte superior de cada letra, en la inferior, o en ambas. El individuo tiene 20 segundos por línea para revisar atentamente, de izquierda a derecha, el contenido y marcar sólo las 'd' que contengan dos rallitas en total (las dos arriba, las dos debajo o una arriba y otra debajo), siendo éstos los estímulos correctos o *relevantes*. Las demás combinaciones ('p' con o sin rallitas y 'd' con una, tres o cuatro rallitas) se consideran *irrelevantes* y no deben ser marcadas (Figura 17).

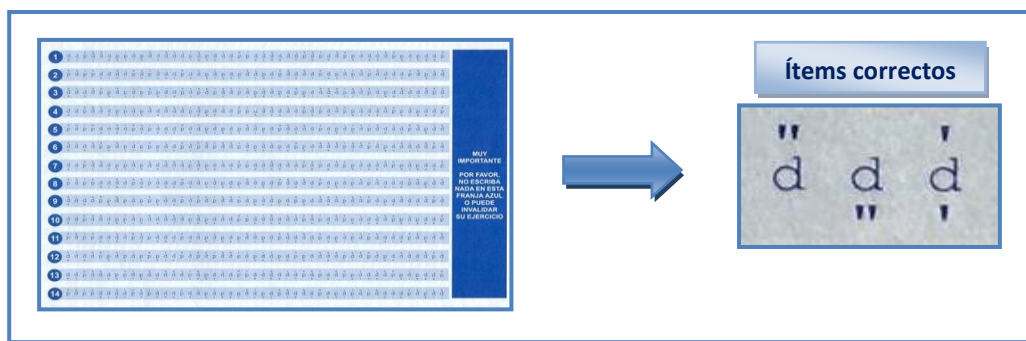


Figura 17. Test d2

- Puntuación:

Las puntuaciones que podemos obtener de este test son múltiples:

- Total de respuestas (TR): es el número de casilla al que corresponde la última marca de cada línea. La suma de la TR de las 14 líneas nos proporciona una medida de la velocidad de procesamiento y cantidad de trabajo realizado
- Total de aciertos (TA): es el número de elementos *relevantes* que han sido marcados. La suma de la TA de las 14 líneas es una medida de la precisión del procesamiento.
- ERRORES:
  - Omisiones (O): número de errores por omisión, es decir, elementos *relevantes* no marcados hasta el último elemento marcado. Se suman las O de las 14 líneas.
  - Comisiones (C): número de errores por comisión, es decir, elementos irrelevantes marcados hasta el último elemento marcado. La suma de C de las 14 líneas nos proporciona una medida de la precisión del procesamiento y del control inhibitorio.

- Efectividad total en la prueba (TOT): Se calcula como la diferencia de TR total y los errores totales de las 14 líneas (TOT = TR – (O+C)).
- Índice de concentración (CON): Se calcula como la diferencia de total de aciertos y errores por comisión (CON = TA – C) de las 14 líneas. Este parámetro es una medida de concentración.

Una vez obtenidos todos los parámetros descritos, consultamos en los baremos (según el grupo de edad del sujeto) para anotar la puntuación centil (indica el tanto por ciento de sujetos de la población normativa a que dicho sujeto es superior en el test) que corresponde a cada variable.

### 3.3. TEST ORAL DE CLAVES:

Esta prueba mide la velocidad de procesamiento y atención selectiva y activa el área fronto-parietal del cerebro.

La tarea es muy similar al subtest de ‘Símbolos y Dígitos’ de la batería PHES, pero en este caso, se le muestran al sujeto símbolos asociados a números y éste tiene que, verbalmente, relacionar en 90 segundos todos los símbolos posibles con sus números correspondientes (Figura 18A).

La puntuación de la prueba es el número de aciertos que el sujeto realiza.

**A) CLAVE**

1	2	3	4	5	6	7	8	9
(	)	+	-	*	/	>	<	=

**EJEMPLOS**

( ) + ( ) - ( ) \* ( ) / ( ) > ( ) < ( ) = ( )

( ) > ( ) + ( ) - ( ) \* ( ) / ( ) > ( ) < ( ) = ( )

( ) + ( ) ( ) + ( ) ( ) - ( ) + ( ) ( ) + ( )

( ) + ( ) ( ) + ( ) ( ) + ( ) + ( ) + ( )

( ) + ( ) ( ) + ( ) ( ) + ( ) + ( ) + ( )

( ) + ( ) ( ) + ( ) + ( ) + ( ) + ( ) + ( )

( ) + ( ) ( ) + ( ) + ( ) + ( ) + ( ) + ( ) + ( )

**B) ORDEN DIRECTO**

Elemento/Intento	Punt. Intento	Puntuación elemento
1 1-7	0 1	0 1 2
2 6-3	0 1	0 1 2
1 5-82	0 1	0 1 2
2 6-94	0 1	0 1 2
1 6-4-9	0 1	0 1 2
2 7-0-96	0 1	0 1 2
1 4-2-7-3-1	0 1	0 1 2
2 7-5-6-3-6	0 1	0 1 2
1 6-1-9-4-7-3	0 1	0 1 2
2 3-9-2-4-8-7	0 1	0 1 2
1 5-9-1-7-4-2-8	0 1	0 1 2
2 4-1-7-9-3-8-6	0 1	0 1 2
1 5-8-1-9-2-6-4-7	0 1	0 1 2
2 3-8-2-9-5-1-7-4	0 1	0 1 2
1 2-7-0-8-6-2-5-9-4	0 1	0 1 2
2 7-1-3-9-4-2-5-6-8	0 1	0 1 2

Puntuación orden directo (máximo=16)

**C) ORDEN INVERSO**

Elemento/Intento	Punt. Intento	Puntuación elemento
1 1-2-4	0 1	0 1 2
2 3-7	0 1	0 1 2
1 6-2-9	0 1	0 1 2
2 4-1-5	0 1	0 1 2
1 3-2-9	0 1	0 1 2
2 4-9-8	0 1	0 1 2
1 1-5-5-8-6	0 1	0 1 2
2 6-1-8-4-3	0 1	0 1 2
1 5-3-9-4-1-8	0 1	0 1 2
2 7-3-4-8-5-6	0 1	0 1 2
1 8-1-2-9-3-6-5	0 1	0 1 2
2 4-7-3-9-1-2-8	0 1	0 1 2
1 9-4-3-7-6-2-5-8	0 1	0 1 2
2 7-2-8-1-9-6-5-3	0 1	0 1 2

Puntuación orden inverso (máximo=14)

Puntuación orden directo + Puntuación orden inverso = Total (máximo=30)

**D) Letras y Números**

Intento	Elemento	Respuesta correcta	Punt. Intento	Puntuación elemento
1	LQJL	0 1	0 1	0 1 2 3
2	BPFP	0 1	0 1	0 1 2 3
3	9656	0 1	0 1	0 1 2 3
1	FZLZFL	0 1	0 1	0 1 2 3
2	R4040R	0 1	0 1	0 1 2 3
3	94449	0 1	0 1	0 1 2 3
1	V888V888	0 1	0 1	0 1 2 3
2	V844V844	0 1	0 1	0 1 2 3
3	78447LW	0 1	0 1	0 1 2 3
1	3066116600	0 1	0 1	0 1 2 3
2	9000020000	0 1	0 1	0 1 2 3
3	606600206600	0 1	0 1	0 1 2 3
1	W46700247000	0 1	0 1	0 1 2 3
2	W88800358800	0 1	0 1	0 1 2 3
3	606600206600	0 1	0 1	0 1 2 3
1	R38421C1348CR2	0 1	0 1	0 1 2 3
2	578200735700TX	0 1	0 1	0 1 2 3
3	008884014000R	0 1	0 1	0 1 2 3
1	S45226642500AH05	0 1	0 1	0 1 2 3
2	D1888460134900R	0 1	0 1	0 1 2 3
3	7807461212674M72	0 1	0 1	0 1 2 3

Puntuación directa (máximo=21)

Figura 18. Tests orales: Claves (A), Dígitos Directo (B), Dígitos Inverso (C), Letras y Números (D)

#### 3.4. TEST ORAL DE DÍGITOS:

Esta tarea es un subtest de la batería Wais y, está compuesta por dos subtests:

**3.4.1. DÍGITOS DIRECTO:** Mide la atención selectiva y activa la zona fronto-parietal del cerebro. La prueba consiste en bloques de dos series de números, empezando primero por series cortas que se van alargando conforme pasamos de bloque (Figura 18B). La tarea se realiza leyéndole al sujeto los números de la serie, los cuáles tiene que repetir seguidamente (p.e 3-7-2 sería 3-7-2). Cuando el sujeto acierta la serie se le puntúa con un '1', y cuando la falla con un '0', de manera que la prueba acaba cuando la puntuación de todas las series del mismo bloque es igual a '0'. La puntuación del test es la suma de series que se ha acertado.

**3.4.2. DÍGITOS INVERSO:** Mide la memoria de trabajo y activa la zona frontal del cerebro. La prueba es similar a la de 'Dígitos Directo', pero en este caso el sujeto tiene que memorizar la serie de números que se le lee y repetirlos ordenadamente de manera inversa (p.e. 1-5-8-4 sería 4-8-5-1) (Figura 18C). Se corrige de la misma manera que la anterior.

Obtenemos una puntuación global del test de Dígitos sumando las dos puntuaciones.

#### 3.5. TEST ORAL DE LETRAS Y NÚMEROS:

Este test mide la memoria de trabajo, teniendo más carga de memoria de trabajo que el de Dígitos, ya que es más complicado. Se basa en bloques de tres series que contienen letras y números mezclados, y que van aumentando el número de elementos conforme avanza la prueba. Leemos al sujeto la serie y éste debe ordenar los elementos de manera que primero diga los números ordenados de forma ascendente y a continuación las letras ordenadas alfabéticamente (p.e W-3-1-J sería 1-3-J-W) (Figura 18D). La corrección se realiza igual que en 'Digitos' (3.4) y la prueba no acaba hasta que no se fallen las tres series de un mismo bloque.



#### 4. ESTUDIO DE ALTERACIONES EN LA COORDINACIÓN MOTORA EN PACIENTES CON EHM

Para el estudio de alteraciones en la coordinación motora, se escogieron dos tests de fácil realización y corta duración.

##### 4.1. TEST DE COORDINACIÓN BIMANUAL:

Este test consiste en un tablero perforado con dos matrices de 4 filas con 10 agujeros cada una (Figura 19A). La prueba consiste en pasar unas clavijas metálicas de una matriz a la otra del tablero. Las clavijas se han de pasar con ambas manos simultánea y simétricamente, por filas, de fuera hacia dentro. Esta tarea se realiza 2 veces en cada dirección y se puntúa con el tiempo que se tarda en pasar las clavijas de una matriz a otra. Se suman las centésimas de minuto de los cuatro intentos y mediante una tabla estandarizada para el test se le da un valor de percentil al tiempo de realización, según el sexo del individuo, puesto que la tipificación del test mostró que las mujeres necesitan más tiempo para realizar la tarea.

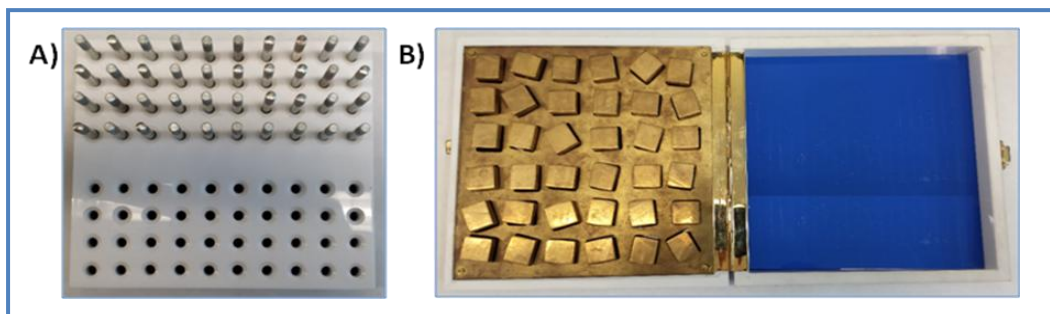


Figura 19. Test de coordinación Bimanual (A) y Visuomotora (B)

##### 4.2. TESTS DE COORDINACIÓN VISUOMOTORA:

Este test consiste en un tablero con una matriz de 6 filas y 6 columnas de perforaciones rectangulares, con diferente orientación, en las cuales se tienen que encajar unas piezas metálicas utilizando solo la mano dominante (Figura 19B). Se realiza por filas, de izquierda a derecha y todas las piezas caben en cualquier agujero, siempre que se coloquen en la orientación correcta. La prueba se realiza dos veces y, se puntúa según el tiempo que se tarda en colocar todas las piezas. Se suma el tiempo en centésimas de minuto de los dos intentos y mediante una tabla estandarizada para el test se le da un valor de percentil al tiempo de realización, según el sexo del individuo, por el mismo motivo que el test anterior.

## 5. DETERMINACIÓN DE AMONIO EN SANGRE

La medición del amonio en sangre se realizó con el aparato Ammonia Checker II (o PocketChem BA; Arkray Factory, Inc) que utiliza como reactivo un kit (Ammonia Test Kit II; Arkray Factory, Inc) que mide los niveles de amonio en la sangre basándose en el método de la micro-difusión. Este método tiene como ventaja respecto a otros, una medición simple, rápida y exacta, requiriendo un volumen pequeño de muestra (20 µl de sangre entera). La rapidez de este ensayo es muy importante ya que la concentración de amonio en la muestra aumenta conforme aumenta el tiempo transcurrido desde la extracción de la muestra.

El kit de reactivo consiste en unas tiras que contienen una capa receptora de muestra compuesta de ácido bórico (42,6 mg) e hidróxido sódico (18,7 mg) y una capa indicadora compuesta de verde de bromocresol (4,0 mg).

- Fundamento:

Cuando se aplica la muestra a la capa receptora de la tira, el agente amortiguador de pH impregnado en ésta (tampón borato) se disuelve volviendo alcalina la muestra. Los iones amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) de la muestra pasan por el pH alcalino a amonio gas ( $\text{NH}_3$ ) que pasa a través de los poros del distanciador al indicador (verde de bromocresol) produciendo color. El grado de coloración es proporcional a la concentración de amonio gas producido, por lo que el aparato determina cuantitativamente el nivel de amonio en la muestra midiendo el color de la tira.

- Protocolo:

Aplicamos 20 µl de sangre entera recién extraída cuidadosamente en el centro de la capa receptora de la tira, sin tocarla con la punta. Después de 180 segundos, quitamos el distanciador de la tira y la colocamos en la unidad óptica del dispositivo de medida, con la mancha de color de la capa indicadora mirando hacia abajo. El nivel de amonio aparece en la pantalla en µmol/L. El rango de detección de éste método es de 7-286 µmol/L. Los niveles esperados en adultos sanos son menores de 54 µmol/L.

## 6. AISLAMIENTO DE CÉLULAS MONONUCLEARES

Las células mononucleares obtenidas son mayoritariamente la mezcla de monocitos y linfocitos.

- Fundamento:

Las células mononucleares se aíslan por centrifugación en un gradiente de densidad en el reactivo Lympho separation medium (MP Biomedicals, LLC, USA). Los eritrocitos quedan en el fondo del tubo, separadas por el reactivo de aislamiento de un halo formado por las células mononucleares. El plasma queda en la parte superior del tubo.

- Reactivos:

- Tampón fosfato salino: PBS (NaCl 123 mM, KCl 2,68 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 6,4 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,47 mM a pH 7, filtrado en campana)
- Lympho separation medium

- Protocolo:

Para el aislamiento de las células mononucleares, se mezclaron los 5 ml de sangre (recogida en tubos heparinizados con EDTA) extraídos para este procedimiento, con la sangre sobrante del tubo extraído para la obtención del plasma después de ser retirado éste. Con este volumen de partida, se realizó el siguiente protocolo:

1. Diluir la sangre en PBS en una proporción 1:1
2. Depositar la sangre diluida sobre Lympho separation medium en tubos corning de 15 ml con 1 volumen de Lympho separation por 1 volumen de sangre
3. Centrifugar a 800 x g, 18 minutos a 16-18°C
4. Recoger la fase blanquecina (halo) y el plasma y pasarlos a un tubo corning de 50 ml y rellenar hasta 45-50 ml con PBS para lavar el exceso de Lympho separation medium que pudiese quedar
5. Centrifugar a 1000 x g, 10 minutos a temperatura ambiente
6. Retirar el sobrenadante y desechar
7. Resuspender el pellet en 6 ml de PBS, y pasarlo a un tubo corning de 15 ml para lavarlo
8. Centrifugar a 1000 x g, 5 minutos a temperatura ambiente

### III. Material y Métodos

#### 9. Retirar el sobrenadante y desechar

- si el pellet queda rojo, significa que contiene eritrocitos, por lo que añadimos un paso de lisado: añadir 1 ml de Ortho-immune Lysing Reagent® (Ortho Diagnostic Systems, Raritan, USA), dejar actuar 30-60 segundos y centrifugar a 1000 x g, 5 minutos a temperatura ambiente (desechar el sobrenadante)

#### 10. Resuspender el pellet en 3 ml de PBS

#### 11. Alicuotar los 3 ml en tubos eppendorf en alicuotas de 200 µl de PBS conteniendo las células mononucleares

#### 12. Centrifugar a 1500 x g, 5 minutos a 4°C

#### 13. Eliminar el PBS y guardar el pellet seco a -80°C

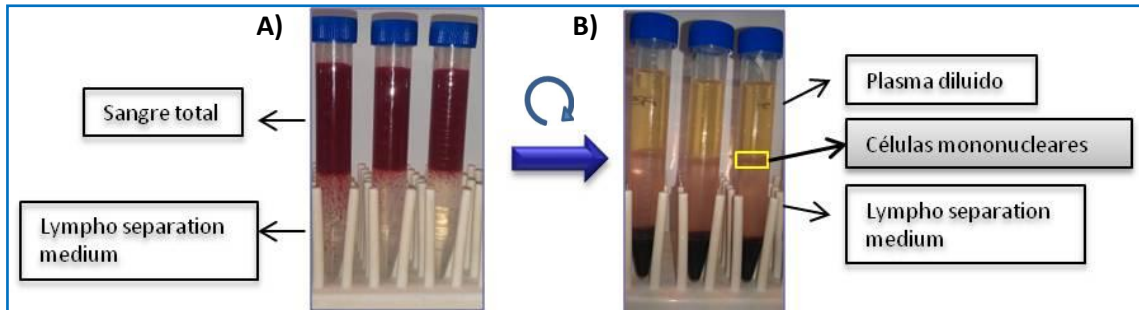


Figura 20. Extracción de células mononucleares (antes (A) y después (B) de centrifugar)

## 7. AISLAMIENTO DE ERITROCITOS

- Fundamento:

El aislamiento de eritrocitos se realizó mediante un método basado en columnas de celulosa que retienen los linfocitos y las plaquetas y, dejan pasar la sangre, plasma y eritrocitos (90%) (Kaminsky et al, 2010).

## 8. DETERMINACIÓN DE CITOCINAS PRO-INFLAMATORIAS

### 8.1 DETERMINACIÓN DE INTERLEUCINA-18 (IL-18) EN SUERO

Los niveles de interleucina-18 en suero se midieron mediante un kit ELISA (Bender MedSystems, Austria) cuyo límite de detección es de 9 pg/ml. Se utilizan 50 µl de suero sin diluir para la realización del ensayo.

El ensayo se realizó según el protocolo proporcionado por el fabricante. El kit consta de una placa tapizada con el anticuerpo frente a la IL-18 humana a la que se añaden 50 µl de muestra (suero) y 50 µl de diluyente de muestra. La curva patrón abarca un rango de concentraciones de 0-5000 pg/ml. Posteriormente se añade el anticuerpo secundario conjugado con biotina a todos los pocillos y se incuba en agitación, 2 h a temperatura ambiente. Una vez finalizada la incubación, se lava y se adiciona estreptavidina marcada con peroxidasa de rábano (HRP) y se vuelve a incubar en agitación, 1 h a temperatura ambiente. Finalmente, se añade el reactivo revelador TMB (tetrametil-bencidina). La reacción se detiene por adición de reactivo 'Stop solution' (ácido) y leemos la absorbancia a 450 nm en un lector de placas.

### 8.2. DETERMINACIÓN DE INTERLEUCINA-6 (IL-6) EN SUERO

La medida de IL-6 en suero también se realizó mediante un kit ELISA (Thermo Scientific, USA) cuyo límite de detección es de 1 pg/ml. La cantidad de suero utilizado para el ensayo es de 50 µl (sin diluir).

El ensayo se realizó siguiendo el protocolo proporcionado por el fabricante del kit. El experimento comienza con la adición del anticuerpo biotinilado a todos los pocillos, seguido de la adición de 50 µl de la curva patrón (0-400 pg/ml) y de muestra a los pocillos correspondientes y se incuba 2 h a temperatura ambiente. Una vez incubada, se añade una solución de estreptavidina marcada con peroxidasa de rábano (HRP) y se incuba de nuevo 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, añadimos la solución de revelado (TMB) incubamos. Finalmente se detiene la reacción por adición de la solución 'Stop' (ácido) y leemos la absorbancia a 450 nm en un lector de placas.

La concentración de IL-18 e IL-6 se calcula a partir de su curva estándar correspondiente.

## **9. DETERMINACIÓN DE NITRATOS Y NITRITOS**

El óxido nítrico (NO) es muy inestable y reacciona rápidamente con el O<sub>2</sub> en solución para formar otros óxidos de nitrógeno: dióxido de nitrógeno (NO<sub>2</sub>), anhídrido nitroso (N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), tetraóxido de nitrógeno (N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>) y, sus productos estables, nitratos (NO<sub>3</sub>) y nitritos (NO<sub>2</sub>). La determinación de nitratos y nitritos en plasma es un método utilizado habitualmente como medida de producción del radical NO.

- **Fundamento:**

El ensayo se basa en la detección colorimétrica de nitrito con el reactivo de Griess, antes y después de la conversión de nitrato a nitrito mediante la enzima nitrato reductasa de *Aspergillus*. El nitrito reacciona con ácido sulfanílico y con naftilamina en medio ácido, formando un compuesto diazoico (p-sulfobenceno-azoalfanaftil-amina) de color rosa, cuya intensidad se mide espectrofotométricamente a una longitud de onda de 540 nm.

La nitrato reductasa requiere FAD y NADPH para su actividad. El exceso de NADPH, que interfiere con la coloración posterior, se elimina mediante la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) que lo utiliza para la conversión de piruvato en lactato.

- **Reactivos:**

- Nitrato de sodio 1 mM y Nitrito de sodio 1 mM
- Tampón fosfato potásico 0,5 M, pH 7,5 (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,5 M y KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,5 M)
- Nitrato Reductasa 10 U/ml
- NADPH 1 mM
- FAD 0,1 mM
- LDH 0,2 mg/ml
- Piruvato sódico 0,2 M
- Sulfato de zinc 300 g/l
- Reactivo de Griess: sulfonilamida 2g/l (en ácido fosfórico 50 g/l) + N-naftiletilamina 0,2 g/l (1:1)

- **Protocolo:**

La medida de nitratos y nitritos se realiza mediante el método de Moshage et al (1995) adaptado a placa de 96 pocillos:

Preparamos en tubos eppendorf 100  $\mu$ l de curva estandar (0-1,5  $\mu$ M) y de muestras. Añadimos 100  $\mu$ l de mezcla de reacción (Nitrato Reductasa 10 U/ml, FAD 0,1 mM, NADPH 1 mM y Tampón fosfato 0,5 M) y dejamos incubar 20 minutos a 37°C. Añadimos 16  $\mu$ l de una mezcla de LDH 0,2 mg/ml y Piruvato sódico 0,2 M e incubamos 5 minutos a 37°C. Entonces añadimos 12  $\mu$ l de Sulfato de zinc 300 g/l (desproteíniza la muestra), dejamos en hielo, 5 minutos y centrifugamos a 20000 x g, 10 minutos a 4°C.

Cargamos en una placa Costar de 96 pocillos, 100  $\mu$ l del sobrenadante obtenido después de precipitar las proteínas y añadimos 100  $\mu$ l de Reactivo de Griess, dejando incubar 15 minutos a temperatura ambiente, y leemos la absorbancia a 540 nm en un espectrofotómetro.

La concentración de nitratos y nitritos se calcula a partir de la curva estandar.

## **10. DETERMINACIÓN DE GUANOSIN MONOFOSFATO CÍCLICO (GMPc)**

- Fundamento:

El GMPc se midió utilizando un kit de enzaimunoensayo (Amersham Biotrak de GE Healthcare). Se emplearon 50  $\mu$ l de las muestras de plasma.

- Protocolo:

El fabricante nos proporciona varios protocolos, según la muestra utilizada. En nuestro caso, seguimos el protocolo de acetilación que consiste en acetilar las muestras y las soluciones estándar (2-512 fmol) con una mezcla de un volumen de anhídrido acético y dos de trietanolamina. Una vez acetiladas las muestras y la curva patrón las cargamos en la placa tapizada con un anticuerpo específico que reconoce el anticuerpo frente a GMPc. A continuación, añadimos el anticuerpo frente a GMPc y después de 2 h de incubación a 4°C, añadimos un conjugado de GMPc marcado con peroxidasa, el cuál competirá con el GMPc por los sitios de unión del GMPc en el anticuerpo. Tras una nueva incubación de 1 h a 4°C, lavamos, y ponemos la solución sustrato (TMB) dejándola actuar unos 30 minutos a temperatura ambiente hasta que la curva estándar desarrolle color y, entonces detenemos la reacción con ácido sulfúrico 1 M y leemos la absorbancia a 450 nm.

La concentración de GMPc se calcula a partir de la curva estandar. Los resultados se expresan en pg/ml.

#### 11. DETERMINACIÓN DE 3-NITROTIROSINA LIBRE (3-NT) POR HPLC

La medida de la concentración de 3-NT libre en suero se realizó mediante cromatografía líquida de alta presión (HPLC) con detector fotodiode.

- Soluciones:
  - Solución Metanol:Cloroformo (1:2)
  - 3-Nitro-L-tirosina 100  $\mu$ M y 1  $\mu$ M (Sigma Aldrich)
  - Tirosina 100  $\mu$ M (Sigma Aldrich)
  
- Preparación de las muestras: (a 4°C)
  1. Mezclar el mismo volumen de suero y de una solución Metanol:Cloroformo (1:2).
  2. Homogenizar con vortex y preservar en hielo (4°C).
  3. Centrifugar a 12000 x g durante 10 min a 4 °C.
  4. Recoger la fase superior en un vial limpio.
  5. Dejar evaporar el cloroformo a temperatura ambiente
  6. Traspasar 50-70  $\mu$ l (volumen de inyección) de cada muestra a tubos con tampón de polipropileno para HPLC (Waters).
  
- Condiciones cromatográficas:
  - Columna Resolve™ C18, 5 $\mu$ m, 90A, 3,9x150mm (WAT085711, Waters).
  - Fase móvil: KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM (pH 3,0) + Metanol (9:1). Filtrada y sonicada
  - Flujo de 1 mL/min. (0,5 mL/min por cada bomba), a flujo isocrático a 15 °C, durante al menos 15 min.
  - Detector Fotodiode
  - Longitud de onda: 280 nm detección tirosina y 366 nm detección nitrotirosina
  - Volumen de inyección: 50-70  $\mu$ L.
  - Tiempo de adquisición 15 minutos, ya que el tiempo de retención oscila entre 3,5-5 minutos.



## 12. ACTIVIDAD DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES

### 12.1. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS:

Se midió la actividad de algunas de las principales enzimas antioxidantes en eritrocitos y en células mononucleares (monocitos y linfocitos). Para ello, se aisló cada una de las poblaciones celulares como se explica en los apartados 6 y 7, y se procedió a la lisis celular en el momento de realizar la medida de la actividad, como se detalla a continuación.

#### 12.1.1. LISIS DE ERITROCITOS

Para las determinaciones en eritrocitos, los lisamos con un Tampón de Lisis, preparado con agua bidestilada a 4°C, saponina 0,2% y trietanolamina (TEA) 50 mM. El protocolo consiste en añadir a los eritrocitos tampón de lisis en una proporción 1:3, de manera que la dilución final es 1:18, ya que estaban diluidos 1:6 con PBS-Glucosa.

1. Mezclar 100 µl de agua bidestilada (4°C), 30 µl de saponina y 70 µl de trietanolamina
2. Añadir 100 µl de eritrocitos y mezclar con vórtex. Mantener en hielo.

#### 12.1.2. LISIS DE CÉLULAS MONONUCLEARES

Para medir las actividades Glutación Peroxidasa (GPx), Glutación Reductasa (GR) y Glutación S-Transferasa (GST) en las células mononucleares, éstas se lisaron con el mismo tampón que los eritrocitos, añadiendo 150 µl de tampón por pellet celular. El pellet se resuspendió mediante vórtex y se sonicó en hielo mediante 2 pulsos de 10 segundos al 30% de potencia del sonicador. Por último, se centrifugó a 14000 x g, 15 minutos a 4°C para precipitar los restos celulares. El sobrenadante obtenido se utilizó para realizar las medidas de actividad enzimática y determinar la concentración de proteína.

En el caso de la actividad Catalasa (CAT) y Superóxido Dismutasa (SOD) se preparó el pellet de manera diferente porque se midieron mediante kits comerciales (Cayman Chemical Company, USA) siguiendo las instrucciones proporcionadas por el fabricante. El pellet celular fue resuspendido en 150 µl de tampón fosfato 50 mM con EDTA 1 mM (pH 7). Se sonicó en hielo mediante 2 pulsos de 10 segundos al 30% de potencia del sonicador y se centrifugó:

- a 10000 x g, 15 minutos a 4°C (para actividad CAT)
- a 1500 x g, 5 minutos a 4°C (para actividad SOD)

Recogemos el sobrenadante, con el cual se realizará el ensayo correspondiente y se medirá la concentración de proteína.

## 12.2. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES

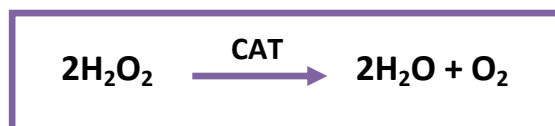
Se determinó la actividad de las enzimas antioxidantes más importantes: Catalasa, Superóxido Dismutasa y Glutación Peroxidasa, Glutación Reductasa y Glutación S-Transferasa.

Las actividades de dichas enzimas se midieron por métodos espectrofotométricos, mediante la monitorización de la formación de productos o consumo de sustratos implicados en las reacciones que catalizan estas enzimas.

### 12.2.1. ACTIVIDAD CATALASA

- Fundamento:

La enzima Catalasa (CAT) cataliza la conversión del peróxido de hidrógeno a agua y oxígeno.



#### 12.2.1.1. ACTIVIDAD CATALASA EN ERITROCITOS

La actividad catalasa en eritrocitos se determinó según el método descrito por Aebi (1984) que monitoriza el descenso en la concentración de peróxido de hidrógeno, midiendo la disminución de absorbancia a 240 nm. Se expresa en  $\text{seg}^{-1}/\text{g Hb}$ .

- Reactivos:
  - Tampón Catalasa (CAT) :  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  50 mM y  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  50 mM (pH 7). Se guarda a temperatura ambiente
  - Peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) concentrado. Se mide la concentración exacta del stock antes de usarlo, por su inestabilidad. Ésto se hace mezclando en una cubeta de cuarzo 2 ml de tampón catalasa y 5  $\mu\text{l}$  del stock de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (dilución 1:401) y leemos la

absorbancia a 240 nm. Sabiendo que el coeficiente de extinción molar de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> es 0,0394 L/mmol/cm, calculamos la concentración del stock.

- Protocolo:

1. Añadir al tampón CAT el volumen necesario de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para que la concentración del peróxido sea 30 mM y la absorbancia a 240 nm del tampón sea 1,2: Blanco de reacción (A<sub>b</sub>).

2. Mezclar en la cubeta de cuarzo 2 ml de Tampón CAT y 5 µl de eritrocitos lisados

3. Leer a 240 nm, durante 30 segundos a intervalos de 5 segundos a temperatura ambiente.

- Cálculo de la actividad CAT en eritrocitos:

Calculamos el incremento de absorbancia en los 30 segundos ( $\Delta_{30} = A_{t0} - A_{t30}$ ). Aplicamos la siguiente fórmula:  $A_b / (A_b - \Delta_{30})$  y la constante de velocidad de la reacción y referimos la actividad a la concentración de hemoglobina en la muestra: Actividad CAT (seg<sup>-1</sup>/g Hb).

Este método no fue lo suficientemente sensible para medir la actividad CAT en células mononucleares, por lo que se utilizó un kit comercial.

#### 12.2.1.2. ACTIVIDAD CATALASA EN CÉLULAS MONONUCLEARES

- Fundamento:

La actividad catalasa en células mononucleares se determinó utilizando un kit comercial (Cayman Chemical Company, USA), que aprovecha la actividad peroxidasa de la enzima, utilizando metanol como dador de electrones, para determinar su actividad. El ensayo se basa en la reacción de la catalasa con metanol en presencia de la concentración óptima de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, produciendo formaldehído que es medido con el cromógeno Purpald (4-amino-3-hidrazino-5-mercapto-1,2,4-triazol). El Purpald forma un intermedio de reacción cuya oxidación por el oxígeno del aire o catalizada con peryodato potásico (KIO<sub>4</sub>) da lugar a un compuesto de color violeta cuya absorbancia se mide a 540 nm.

- Protocolo:

El ensayo se realizó siguiendo el protocolo proporcionado por el fabricante del kit. La cantidad de muestra utilizada fue 20  $\mu\text{l}$  del sobrenadante obtenido como se ha explicado en el apartado 12.1.2. Se construyó una curva patrón de formaldehído (0-75 mM) y se cargaron las muestras. Se añadieron 30  $\mu\text{l}$  de metanol a todos los pocillos. La reacción empezó con la adición de 20  $\mu\text{l}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Se incubó la placa 20 minutos a temperatura ambiente y se detuvo la reacción con 30  $\mu\text{l}$  de hidróxido potásico (KOH). Entonces añadimos 30  $\mu\text{l}$  de Purpald y, 10 minutos después, 10  $\mu\text{l}$  de  $\text{KIO}_4$ . Después de 5 minutos, leemos la absorbancia a 540 nm.

- Cálculo de la actividad catalasa en células mononucleares:

Se representa la curva patrón de formaldehído y se interpolan las absorbancias de las muestras, obteniendo la concentración ( $\mu\text{M}$ ) de formaldehído. Este valor se corrige por el volumen de muestra utilizado y el volumen total del ensayo ( $\mu\text{M} \times 0,17/0,02$ ). La actividad CAT se calcula teniendo en cuenta que 1 unidad de enzima es capaz de formar 1 nmol de formaldehído por minuto a 25°C. La fórmula utilizada es:

$$\text{Actividad CAT} = (\mu\text{M formaldehído}/20\text{min}) \times \text{factor dilución}$$

Este valor de actividad debe corregirse por la cantidad de proteína de cada muestra y, se expresa en nmol/min/mg proteína.

#### 12.2.2. ACTIVIDAD SUPERÓXIDO DISMUTASA

La superóxido dismutasa (SOD) cataliza la dismutación del anión superóxido a oxígeno molecular y peróxido de hidrógeno (especie menos reactiva).



Existen tres isoformas: SOD citosólica (Cu/Zn-SOD), mitocondrial (Mn-SOD) y la extracelular. En nuestros ensayos medimos la actividad SOD intracelular total, es decir la suma de la citosólica y mitocondrial.

### 12.2.2.1. ACTIVIDAD SUPERÓXIDO DISMUTASA EN ERITROCITOS

- Fundamento:

La actividad SOD en eritrocitos se determinó de acuerdo con el método de Beauchamp y Fridovich (1971) utilizando azul de nitrotetrazolio (NBT). El ensayo se basa en la capacidad de la enzima para inhibir la reducción del NBT por los radicales superóxido. Una unidad de la actividad del SOD es equivalente a una disminución del 50% en la tasa de reducción del NBT, traducida en una disminución de la absorbancia a 560 nm. La reacción ocurre a temperatura ambiente.

- Reactivos:

- Tampón SOD:  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  50 mM y EGTA- $\text{K}^+$  (pH 10,2). Se prepara en el momento de usar
- Catalasa 0,5 U/ml (disuelta en agua bidestilada)
- Xantina 10 mM
- Xantina Oxidasa (XO) 1,67 U/ml
- NBT 1,25 mM

- Protocolo:

Mezclar en una cubeta de plástico 2 ml de Tampón SOD, 10  $\mu\text{l}$  de catalasa, 100  $\mu\text{l}$  de NBT y 100  $\mu\text{l}$  de xantina. Mezclamos por inversión y añadimos un volumen de xantina oxidasa (6-10  $\mu\text{l}$ ) que proporcione un incremento en la densidad óptica ( $\Delta\text{DO}$ ) de 0,1 unidades de absorbancia (UA) por minuto, durante 3 minutos a 560 nm. En este punto medimos el  $\Delta\text{DO}$  del Blanco ( $\Delta\text{DO}$  del NBT/min). Para medir la actividad de las muestras, añadimos seguidamente de la XO, 30  $\mu\text{l}$  de lisado de eritrocitos. Mezclamos y medimos la cinética de reacción durante 3 minutos. El  $\Delta\text{DO}$  debe de ser aproximadamente 0,05 UA/min (disminución en la tasa de reducción del NBT).

- Cálculo de la actividad SOD en eritrocitos:

Se calcula el porcentaje de inhibición de la reducción del NBT por la SOD según la siguiente fórmula:

$$\% \text{ inhibición} = [(\Delta\text{DO}/\text{min del NBT} - \text{el } \Delta\text{DO}/\text{min de la muestra}) / \Delta\text{DO}/\text{min del NBT}] \times 100$$

Teniendo en cuenta que una unidad de enzima SOD se corresponde con una inhibición de la reducción del NBT del 50%, se calcula la actividad SOD, expresada en U/min. Finalmente referimos las U/min a la concentración de hemoglobina de la muestra, expresando la actividad como U/min/g Hb.

Este método no fue lo suficientemente sensible para medir la actividad SOD en células mononucleares, por lo que se utilizó un kit comercial.

#### **12.2.2.2. ACTIVIDAD SOD EN CÉLULAS MONONUCLEARES**

La actividad SOD en células mononucleares se determinó utilizando un kit comercial (Cayman Chemical Company, USA). Se basa en el mismo principio que la medida en eritrocitos.

- Protocolo:

El ensayo se realizó siguiendo el protocolo proporcionado por el fabricante del kit. La cantidad de muestra utilizada fue 10  $\mu$ l del sobrenadante obtenido como se ha explicado en el apartado 12.1.2. Se preparó una curva patrón de SOD (0-0,25 U/ml) y se añadió a la placa el mismo volumen de muestra (10  $\mu$ l). Añadimos a todos los pocillos 200  $\mu$ l del reactivo de detección (mezcla que contiene NBT, Tris-HCl, un ácido e hipoxantina). La reacción se inicia con la adición de 20  $\mu$ l de xantina oxidasa y se incubó la placa durante 20 minutos a temperatura ambiente, para posteriormente medir la absorbancia a 450 nm.

- Cálculo de actividad SOD en mononucleares:

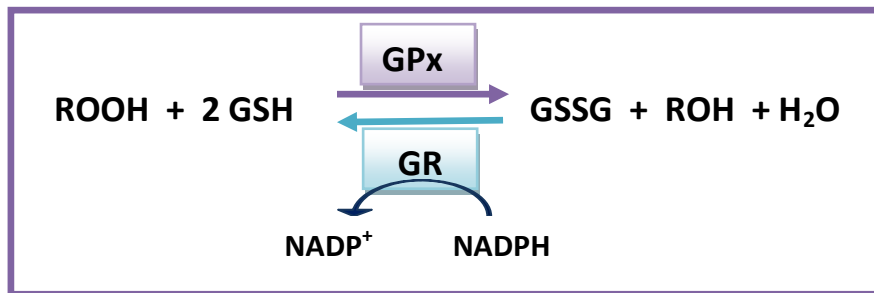
Se divide la absorbancia de cada estándar entre la del blanco para linearizar la curva patrón. Interpolamos las absorbancias de las muestras (divididas por la del blanco) en la recta. Este valor se corrige por el volumen de muestra utilizado y el volumen total del ensayo (U/ml x 0,23/0,01), por la concentración de proteína en la muestra (U/ml/mg prot). Si se diluye la muestra se tendrá en cuenta el factor de dilución.

### 12.2.3. ACTIVIDAD GLUTATIÓN PEROXIDASA (GPx)

La Glutatión Peroxidasa (GPx) cataliza la reducción de  $H_2O_2$  ó peróxidos orgánicos (ROOH) a agua o su correspondiente alcohol estable (ROH), respectivamente utilizando glutatión reducido (GSH) como agente reductor, que se oxida a GSSG.

- Fundamento:

La actividad GPx se determinó siguiendo el protocolo descrito por Lawrence y Burck (1976) mediante un ensayo indirecto de la actividad de ésta enzima, acoplado la reacción de reducción del GSSG a GSH por la glutatión reductasa (GR) que utiliza como sustrato NADPH. El ensayo se basa en la monitorización de la disminución en la absorbancia a 340 nm debida al consumo de NADPH que se oxida a  $NADP^+$ .



- Reactivos:

- Tampón GPx: tampón catalasa ( $KH_2PO_4$  50 mM y  $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$  50 mM) con azida sódica ( $KN_3$ ) 1 mM, GSH 5 mM y GR 0,4 U/ml. Ajustar a pH 7
- NADPH 15 mM
- $H_2O_2$  15 mM

- Protocolo:

El ensayo es el mismo tanto en eritrocitos como en células mononucleares, variando el volumen de muestra en la reacción. Las muestras se prepararon como se indica en el apartado 12.1.

Mezclamos en una cubeta de cuarzo 1 ml de tampón GPx, 15  $\mu$ l de NADPH y medimos la absorbancia a 340 nm durante 3 minutos, siendo éste el blanco de la reacción. La reacción empieza con la adición a la mezcla anterior de 12,5  $\mu$ l de  $H_2O_2$  y el volumen de muestra

### III. Material y Métodos

---

correspondiente: 5  $\mu\text{l}$  en eritrocitos y, 10-20  $\mu\text{l}$  en células mononucleares. Mezclamos y medimos en las mismas condiciones.

- Cálculo de la actividad GPx en eritrocitos y mononucleares:

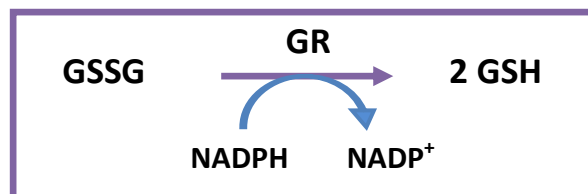
La actividad GPx se calcula como la diferencia entre el  $\Delta\text{DO}/\text{min}$  de la muestra y el  $\Delta\text{DO}/\text{min}$  del blanco y, multiplicando este valor por el coeficiente de extinción molar del NADPH ( $\epsilon_{340} = 6,22 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ). Si corregimos por el volumen total de reacción obtenemos la actividad en nmol/min. Por último, referiremos la actividad a la concentración de hemoglobina en el caso de los eritrocitos ( $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g Hb}$ ) y a la de proteína en el caso de las células mononucleares (nmol/min/mg prot).

#### 12.2.4. ACTIVIDAD GLUTATIÓN REDUCTASA (GR)

La glutatión reductasa (GR) cataliza la reducción de GSSG a su forma reducida y activa (GSH). El glutatión oxidado es reducido por una reacción de múltiples pasos en la que la GR es inicialmente reducida por NADPH formando una semiquinona de FAD, un radical sulfuro y un grupo tiol. La GR reducida (GR red) reacciona con una molécula de GSSG, resultando un intercambio disulfuro que produce una molécula de GSH y el complejo GR red-SG. Un electrón del complejo GSR red-SG cambia de sitio en un segundo intercambio disulfuro, de manera que se recupera la segunda molécula de GSH y se restaura la forma oxidada de la GR.

- Fundamento :

El principio del ensayo se basa en la oxidación de NADPH a  $\text{NADP}^+$  catalizada por una concentración limitante de GR, monitorizando la disminución de la absorbancia a 340 nm. La reacción se produce a 30°C.





- Reactivos:

- Tampón GR:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  50 mM,  $\text{EDTA-Na}^+$  0,5 mM, GSSG 2,2 mM (pH 7,2). Calentar a 30°C
- NADPH 15 mM

- Protocolo :

El ensayo se basa en el método descrito por Goldberg (1984) y consiste en mezclar en una cubeta de cuarzo 1 ml de tampón GR (a 30°C) y 10  $\mu\text{l}$  de NADPH y, leer la absorbancia a 340 nm durante 3min, siendo éste el blanco de la reacción. Para medir la actividad GR en las muestras se añade a la mezcla anterior el volumen correspondiente de muestra (80  $\mu\text{l}$  de lisado de eritrocitos o 70  $\mu\text{l}$  del lisado de células mononucleares) y se lee la absorbancia a 340 nm durante 3 minutos.

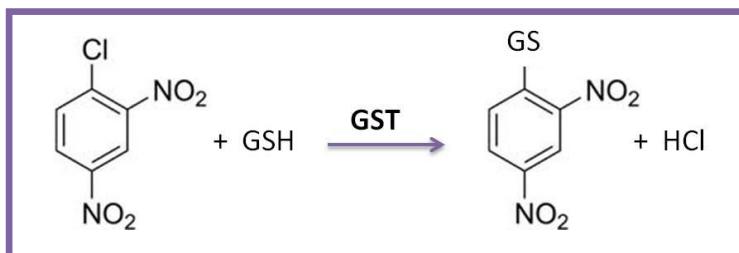
El cálculo de la actividad GR es el mismo que en la actividad GPx (ver 12.2.4)

### 12.2.5. ACTIVIDAD GLUTATIÓN S-TRANSFERASA (GST)

La Glutati6n S-Transferasa (GST) est1 implicada en el metabolismo de los xenobi6ticos y protecci6n frente al da1o causado por per6xidos, mediante la conjugaci6n de 6stos con GSH por ataque nucleof6lico, aumentando la solubilidad de estos productos y facilitando su excreci6n por parte de la c6lula.

- Fundamento:

La actividad GST se determin6 seg6n el m6todo descrito por Habig y Jacoby (1981) cuyo fundamento se basa en la formaci6n de un complejo tio6ter glutati6n dinitrobenz6no (GS-DNB) por reacci6n del GSH con 1-cloro-2,4-dinitrobenz6no (CDNB) lo que produce un aumento de absorbancia a 340 nm. La reacci6n tiene lugar a 37°C.



### III. Material y Métodos

---

- Reactivos:

- Tampón GST:  $\text{Na}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  100 mM, GSH 1 mM, EDTA-Na 100 mM (pH 6,5)
- Tampón de lisis de las muestras (saponina 0,2%, TEA 50 mM y agua a 4°C)
- CDNB 40 mM disuelto en Etanol 96%

- Protocolo:

Para hacer el blanco de la reacción, se mezclaron en una cubeta de cuarzo 875  $\mu\text{l}$  de Tampón GST, 25  $\mu\text{l}$  de CDNB y 100  $\mu\text{l}$  de Tampón de lisis y, se midió la absorbancia a 340 nm, durante 3 minutos a 37°C. Para medir la actividad de la muestra se sustituye el volumen de Tampón de lisis por 50  $\mu\text{l}$  de muestra + 50  $\mu\text{l}$  del tampón (tanto en eritrocitos como en células mononucleares), midiendo la absorbancia a 340 nm en las mismas condiciones que para el blanco.

- Cálculo de la actividad GST en eritrocitos y células mononucleares:

Restamos el  $\Delta\text{DO}/\text{min}$  del blanco al de las muestras y este valor lo dividimos por el coeficiente de extinción molar del complejo GSH-CDNB ( $\epsilon_{340} = 9,6 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ). El valor de actividad obtenido lo referimos al volumen de reacción utilizado y a la concentración de hemoglobina (en eritrocitos) o de proteína (en mononucleares), expresando la actividad en  $\text{umol}/\text{min} \cdot \text{g Hb}$  o  $\text{umol}/\text{min} \cdot \text{g prot}$  respectivamente.

### 13. MEDIDA DE HEMOGLOBINA EN ERITROCITOS

- Fundamento:

El método utilizado para la determinación de la hemoglobina (Hb) es el de cianometahemoglobina, cuyo principio consiste en diluir sangre total en reactivo de Drabkin, que es una solución que contiene ferricianuro de potasio ( $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ ), y cianuro de potasio (KCN). La cianometahemoglobina es un producto coloreado muy estable.

- Protocolo:

Construir una curva patrón a partir de hemoglobina bovina (0-180 mg/ml) (Sigma Aldrich). Mezclar en tubos eppendorf opacos 1250  $\mu\text{l}$  de reactivo Drabkin y 5  $\mu\text{l}$  de los

estándares ó de las muestras (eritrocitos lisados). Incubar 15 minutos a temperatura ambiente, cargar 200 µl en una placa Costar y leer la absorbancia a 540 nm.

- Cálculo de la concentración de hemoglobina:

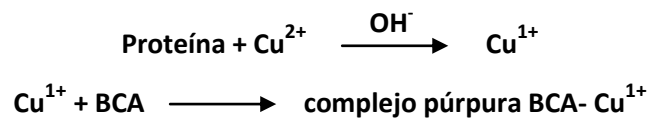
Representamos la curva patrón e interpolamos las absorbancias de las muestras en ésta, obteniendo así la concentración de hemoglobina en la muestra. Este valor se multiplicará por el factor de dilución de la muestra (1:18).

#### 14. MEDIDA DE PROTEINA EN CÉLULAS MONONUCLEARES

La concentración de proteína se determinó mediante el método colorimétrico del ácido bicincónico (BCA).

- Fundamento:

El ácido bicincónico (BCA) forma un complejo púrpura intenso con iones  $\text{Cu}^{1+}$  en medio alcalino. El método monitoriza el ión cuproso producido por reacción de las proteínas con  $\text{Cu}^{2+}$  en medio alcalino (reacción de Biuret) permitiendo la cuantificación de proteínas de forma sencilla, rápida, muy sensible, y con gran tolerancia a compuestos que afectan a otros métodos.



- Reactivos:
  - Reactivo A (Sigma Aldrich): BCA 1%,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  2%, tartrato sódico 0,16%, NaOH 0,4% y  $\text{NaHCO}_3$  0,95% (pH 11,25)
  - Reactivo B (Sigma Aldrich):  $\text{CuSO}_4$  al 4%
  - Reactivo de trabajo: mezclar 100 volúmenes de A con 2 volúmenes de B.
  - Albúmina sérica bovina 'BSA' (Sigma Aldrich)

- Protocolo:

Construimos una curva estandar con BSA de 0-30  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  y le añadimos 2,5  $\mu\text{l}$  del tampón utilizado para la lisis de células mononucleares (ver apartado 12.1.2), ajustando con agua bidestilada a 20  $\mu\text{l}$  en una placa Costar de 96 pocillos. Añadimos a los pocillos de muestra 2,5  $\mu\text{l}$  del lisado de células y 17,5  $\mu\text{l}$  de agua bidestilada. Una vez cargada toda la placa, añadimos a todos los pocillos 200  $\mu\text{l}$  del Reactivo de trabajo, dejando incubar 30 min a 37°C. Leemos la absorbancia a 560 nm.

La concentración de proteína se calcula a partir de la curva estandar.

## 15. DETERMINACIÓN DE ANTIOXIDANTES NO ENZIMÁTICOS: GLUTATIÓN

La determinación de los niveles de glutatión se realizó en sangre total mediante el kit DetectX<sup>®</sup> Glutathione (Arbor Assays, USA). Este kit nos proporciona una medida cuantitativa de los niveles de glutatión reducido (GSH) y oxidado (GSSG) presentes en diferentes tipos de muestras. Este kit es capaz de detectar el glutatión libre y el oxidado en el mismo pocillo de la placa, sin necesidad de separación ni lavados. El GSH total es la suma del GSSG más el GSH libre. Las concentraciones de GSH libre y GSH total se calculan por inclusión de una curva patrón de concentraciones conocidas.

- Fundamento:

El ensayo se basa en la detección del GSH reducido de la muestra mediante la adición de la enzima Glutatión Reductasa (GR) y NADPH como sustrato de la enzima. La GR es la encargada de devolver a la forma reducida (GSH) al glutatión desde su forma oxidada (GSSG) mediante un ciclo redox, oxidando el NADPH a NADP<sup>+</sup>. La detección del glutatión se hace mediante la medida de la fluorescencia emitida al reaccionar con el fluorocromo Thiostar<sup>®</sup>.

El kit proporciona un protocolo alternativo para cuando los niveles de GSH libre y glutatión total son similares. En este caso se bloquea el GSH libre tratando una alícuota de la muestra con 2-vinilpiridina (2VP), de manera que en esta alícuota de la muestra todo el GSH detectado provendrá de la reducción del GSSG. Nosotros, utilizamos este procedimiento para todas las muestras, por lo que tenemos que analizar la misma muestra con 2VP (para la medida del GSSG) y sin 2VP (para la medida del GSH libre).

- Preparación de la muestra:

La muestra utilizada para el ensayo fue sangre total, recogida en el momento de la extracción de los tubos Vacutainer utilizados para el plasma antes de ser centrifugados. Esta sangre se trata con ácido sulfosalicílico (SSA) al 5% en una proporción 1:1. Se incuba 10 minutos a 4°C y se centrifuga a 10000 x g, 10 minutos a 4°C. Recogemos el sobrenadante, el cual tiene una concentración de SSA al 2,5% y hacemos varias alícuotas, para tratar una de ellas con 2VP.

- Tratamiento con 2VP: la 2VP se prepara mezclando 27 µl de 2VP con 98 µl de etanol. Añadimos 5 µl de esta solución etanólica de 2VP a 250 µl de la alícuota de sobrenadante obtenido anteriormente, mezclamos con vórtex y se incuba durante 1 h, a temperatura ambiente, en campana de extracción.

Guardar ambas alícuotas a -80°C hasta que realicemos el ensayo.

Se diluye el sobrenadante 1:2,5 con Assay Buffer, siendo la concentración del SSA del 1%. Posteriormente, se realiza una segunda dilución con Sample Diluent que, en el caso de sangre entera es 1:20, siendo la dilución total de la muestra 1:100.

- Protocolo:

Añadimos la curva patrón y las muestras (con y sin 2VP) y el reactivo ThioStar, dejándolo incubar 15 minutos. Leemos la fluorescencia a una longitud de onda de emisión de 510 nm y una longitud de onda de excitación de 390 nm. En este punto determinamos el GSH libre (en las muestras sin 2VP). Posteriormente añadimos la mezcla de reacción (Glutatión Reductasa y NADPH), y después de incubar otros 15 minutos leemos la fluorescencia en las mismas condiciones que anteriormente. En este punto se determina la concentración de GSH proveniente del GSSG (en las muestras con 2VP).

- Cálculos:

- GSH LIBRE (µM): representamos la curva patrón proporcionada en la primera lectura de fluorescencia e interpolamos la fluorescencia de las muestras sin tratar con 2VP, obteniendo la concentración de GSH libre en la muestra. Multiplicamos por el factor de dilución (100).

- GSSG ( $\mu\text{M}$ ): representamos la curva patrón proporcionada en la segunda lectura de fluorescencia e interpolamos la fluorescencia de las muestras tratadas con 2VP, obteniendo la concentración de GSH proveniente de la reducción del GSSG en la muestra. Como son necesarias dos moléculas de GSH para sintetizar el GSSG, dividimos el valor obtenido de la interpolación entre 2, y obtenemos la concentración de GSSG en la muestra. Multiplicamos por el factor de dilución (100).

- Ratio GSSG/GSH (%): dividimos la concentración de GSSG entre la de GSH libre de la muestra correspondiente (sin 2VP). Multiplicamos este valor para expresarlo en forma de porcentaje.

## **16. MARCADORES DE DAÑO OXIDATIVO/NITROSATIVO EN LAS BIOMOLÉCULAS**

### **16.1. DETERMINACIÓN DE LA CARBONILACIÓN DE PROTEÍNAS**

- Fundamento:

Las proteínas carboniladas se forman por diversos mecanismos oxidativos y son indicadores sensibles de daño oxidativo. La cuantificación de proteínas carboniladas en muestras biológicas puede ser determinada por derivatización con DNP (dinitrofenilhidrazina) y determinación colorimétrica o mediante anticuerpos. El método ELISA (Biocell Corporation LTD) permite la medida cuantitativa de carbonilación desde  $\mu\text{g}$  de proteínas (Buss et al, 1997).

- Protocolo:

Las muestras que contienen proteínas reaccionan con el DNP derivatizándose. Las proteínas se adsorben inespecíficamente a la placa ELISA dejándolas incubar a  $4^{\circ}\text{C}$  toda la noche. El DNP no conjugado y los constituyentes no proteicos se lavan. Las proteínas adsorbidas se incuban con un anticuerpo anti-DNP-biotina y completa el complejo la estreptavidina unida a peroxidasa de rábano (HRP). Se añade el reactivo cromóforo que contiene peróxido y que cataliza la oxidación de TMB. La reacción se detiene por adición de una solución ácida proporcionada en el kit y se mide la absorbancia a 450 nm.

- Cálculo de la concentración de proteínas carboniladas:

Las absorbancias de las muestras son interpoladas en la curva estándar de proteínas oxidadas (0-0,95 nmol/mg), con cantidades crecientes de ácido hipocloroso (que oxida proteínas) y calibrada colorimétricamente. El resultado se expresa en nmol/ml.

## 16.2. DETERMINACIÓN DE MALONDIALDEHÍDO (MDA) POR HPLC

Para el estudio de la oxidación de lípidos (peroxidación lipídica) se midió el Malondialdehído (MDA) en plasma mediante de cromatografía líquida de alta presión (HPLC) (Oltra et al, 2001).

- Soluciones:
  - Tampón 1: acetato sódico 2 M (AcONa) a pH 3,5 + ácido tiobarbitúrico 0,2 % (TBA)
  - Tampón 2:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  50 mM (pH 6,8)
  - Tampón 3:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  50 mM (pH 3,5)
  - Patrones de MDA: 0,63-5 nmol/ml
- Preparación de las muestras:
  1. Añadir 200  $\mu\text{l}$  de Tampón 1 a 50  $\mu\text{l}$  de muestra/patrones. Incubar 60 minutos a 95°C y guardarlas en hielo.
  2. Añadir 200  $\mu\text{l}$  de Tampón 2 a cada muestra/patrón, agitar y centrifugar 5 minutos a 3000 x g a 4°C.
  3. Recoger 200  $\mu\text{l}$  del sobrenadante y añadir 200  $\mu\text{l}$  de tampón 3 y centrifugar 5 minutos a 3000 x g a 4°C.
  4. Recoger 200-300  $\mu\text{l}$  del sobrenadante de las muestras/patrones y colocarlos en un vial para realizar el análisis por HPLC.
- Condiciones cromatográficas:
  - Fase móvil:
  - Columna C-18 Spherisorb de 12 cm de longitud y 5  $\mu\text{m}$  de diámetro.
  - Flujo 1 ml/min
  - Detección mediante detector UV-visible a 532 nm.

### **16.3. DETERMINACIÓN DE 8-HIDROXIDEOXIGUANOSINA (8-OHdG)**

- Fundamento:

El daño causado por el estrés oxidativo sobre el ADN se evalúa midiendo la formación de 8-hidroxideoxiguanosina (8-OHdG). Utilizando un kit ELISA comercial (OxiSelect™; Cell Biolabs, INC), cuya sensibilidad es de 100 pg/ml a 20 ng/ml.

- Protocolo:

Las muestras utilizadas en el ensayo fueron sueros diluidos 1:20 con el diluyente proporcionado con el kit. La cantidad de muestra utilizada fueron 50 µl de suero diluido.

El ensayo comienza con el tapizado de la placa con un conjugado de 8-OHdG/BSA, dejándola incubar a 4°C toda la noche. Se lava la placa y añadimos un tampón de bloqueo dejando que actúe durante 1 h a temperatura ambiente, y después de lavar la placa, añadimos las muestras y la curva estandar (0-20 ng/ml), incubando 10 minutos a temperatura ambiente en agitación. Seguidamente añadimos el anticuerpo frente a 8-OHdG e incubamos 1 h en las mismas condiciones que anteriormente. Lavamos, añadimos el anticuerpo secundario conjugado con estreptavidina-HRP e incubamos de nuevo 1 h a temperatura ambiente. Después de esta incubación añadimos la solución sustrato (TMB) e incubamos entre 2-30 minutos hasta que la curva y las muestras adquieran color. Entonces paramos la reacción con el reactivo 'Stop' (ácido) y leemos la absorbancia a 450 nm.

La concentración 8-OHdG en las muestras problema se calculó a partir de la curva estandar.



## 17. ESTUDIO DEL ESTRÉS OXIDATIVO/NITROSATIVO MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO

- Fundamento:

La citometría de flujo es un proceso mediante el cual células aisladas u otras partículas biológicas pasan, de una en una en el interior de una corriente líquida, a través de un sensor, el cual mide sus características físicas o químicas” (Shapiro, 1988).

La medida de la cantidad de un determinado componente celular o parámetro biológico, se realiza a través de la excitación de fluorocromos naturales o incorporados a la célula, específicos para el parámetro a valorar, que se acumulan selectivamente en compartimentos celulares o que modifican sus propiedades a través de reacciones bioquímicas específicas. Permite seleccionar electrónicamente (análisis acotado) la población de interés sin necesidad de separación física de las células.

En un histograma típico de una muestra de leucocitos en un citómetro convencional, los neutrófilos se diferencian claramente por su morfología (granularidad), mientras que para las otras subpoblaciones leucocitarias, se utilizan anticuerpos específicos.

- ❖ Los anticuerpos utilizados fueron:

- **CD45**: marca todos los leucocitos
- **CD14**: marca específicamente los monocitos
- **CD3**: marca específicamente los linfocitos T maduros ( $CD8^+$  y  $CD8^-$ )
- **CD8**: marca los linfocitos  $CD8^+$ . Al enfrentar en el histograma CD3 (eje Y) frente a CD8 (eje X), podemos diferenciar los linfocitos  $CD8^+$  de los  $CD8^-$ .

Para el estudio del estrés oxidativo en las células, se analiza el estado redox celular basal y tras la adición de compuestos inductores de ROS/RNS. Los radicales libres que se analizaron en este estudio fueron:

- Superóxido celular y superóxido mitocondrial
- Peróxidos orgánicos y peroxinitritos
- Tioles reducidos
- Óxido nítrico
- También se analizó el potencial de membrana mitocondrial

### III. Material y Métodos

---

- ❖ Para ello se emplearon los siguientes fluorocromos:
  - Hidroetidina (HE): detecta niveles de superóxido celular
  - MitoSox (MTX): detecta superóxido mitocondrial
  - Dihidrorodamina (DHR): detecta peroxinitritos
  - Diclorofluoresceína (DCF): detecta peróxidos en general
  - 5-clorometilfluoresceína (CMF): detecta tioles reducidos
  - Diaminofluoresceína (DAF): detecta óxido nítrico
  - TMRM: mide el potencial de membrana mitocondrial.
  
- ❖ Los inductores de radicales libres utilizados fueron:
  - Plumbagina (Pb): es un productor de anión superóxido
  - FCCP (Carbonyl cyanide 4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazone): es un inhibidor reversible de la fosforilación oxidativa. Despolariza el potencial de la membrana mitocondrial.
  - NOR-1 (FK409): donante de NO (Aiba et al, 2001)

- Protocolo:

1. Marcaje de la sangre con la mezcla de los anticuerpos (30  $\mu$ l de la mezcla por 300  $\mu$ l de sangre entera):

MEZCLA DE ANTICUERPOS	
Anticuerpo (Ac)	Volumen de (Ac)
CD8	100 $\mu$ L
CD3	100 $\mu$ L
CD14	50 $\mu$ L
CD45	50 $\mu$ L

2. Incubar 20 minutos a TA
3. Resuspender en 6 ml de PBS
4. Dispensar 500  $\mu$ L por tubo.

5. Tratar la sangre con los inductores de estrés:

CONDICIONES DEL TRATAMIENTO		
Inductor	Concentración final	Incubación
Plumbagina	10 µg/mL	30 min a 37°C
FCCP	25 µM	30 min a 37°C
NOR	250 µM	30 min a 37°C

6. Tinción con los fluorocromos: (algunos se utilizan conjuntamente porque emiten a diferentes longitudes de onda)

CONDICIONES DEL TRATAMIENTO		
FLUOROCROMO	Concentración final	Incubación
DHR	0,1 µg/mL	30 min a 37°C
HE	0,5 µg/mL	30 min a 37°C
CMF	0,05 µM	30 min a 37°C
TMRM	12 µM	30 min a 37°C
DCF	5 µg/mL	30 min a 37°C
MITOSOX	1,25 µM	30 min a 37°C
DAF	2 µM	30 min a 37°C

7. Se pasa la muestra por el citómetro

8. Se cuantifica la fluorescencia con el software del citómetro

## 18. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS

Los resultados se expresan como media  $\pm$  SEM (error estándar de las medias) del número de sujetos indicados en cada caso. Se realiza un análisis ANOVA de una vía seguido de test de Tukey o comparaciones utilizando el test de Student según el caso. Los análisis estadísticos se realizaron con los programas estadísticos Graphpad Prism 6 y SPSS 9.0.



## **IV. RESULTADOS**

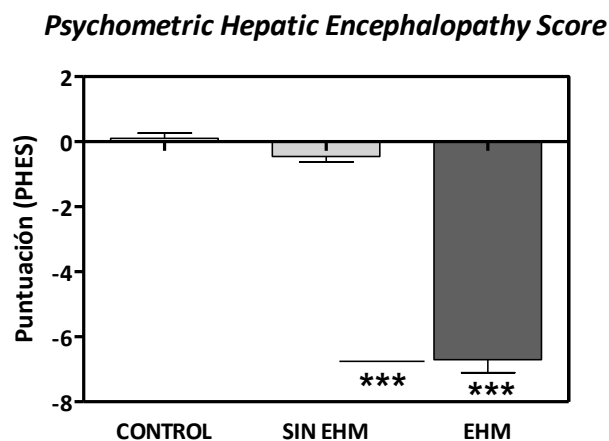


## 1. Estudio de alteraciones neurológicas en pacientes con encefalopatía hepática mínima (EHM)

### 1.1. Diagnóstico de la EHM en pacientes cirróticos

Para identificar los pacientes cirróticos que presentaban EHM se utilizó la batería de cinco tests psicométricos PHES (Psychometric Hepatic Encephalopathy Score). Para obtener una puntuación global del PHES se introduce la puntuación de cada test, la edad y nivel de estudios del sujeto en una aplicación informática disponible en [www.redeh.org](http://www.redeh.org), que proporciona una puntuación global del PHES. Se consideran pacientes con EHM los que obtienen una puntuación menor o igual a -4. Los pacientes con EHM presentan una puntuación significativamente menor en el PHES ( $-6,71 \pm 0,40$ ) que los pacientes sin EHM ( $-0,46 \pm 0,16$ ;  $p \leq 0,001$ ) y que los controles ( $0,10 \pm 0,16$ ;  $p \leq 0,001$ ). No hay diferencias entre los pacientes sin EHM y los controles (Figura 21).

En base a los resultados obtenidos en la batería PHES, clasificamos los pacientes cirróticos en dos grupos: sin EHM (PHES > -4) y con EHM (PHES  $\leq$  -4). A lo largo de la tesis vamos a presentar los resultados de estos pacientes y los de los controles sanos sin enfermedad hepática.



**Figura 21.** Puntuación global en la batería de tests psicométricos PHES para el diagnóstico de EHM. Los valores son la media  $\pm$  SEM del número de sujetos estudiados (controles  $n=34$ , sin EHM  $n=46$ , EHM  $n=34$ ). Los valores significativamente diferentes entre grupos se indican con asteriscos (\*\*\*) ( $p \leq 0,001$ ).

Hemos incluido en el estudio 80 pacientes y 34 controles. El 42% de los pacientes cirróticos (34 de los 80 pacientes cirróticos) presentan EHM. Algunas características clínicas de los controles y pacientes incluidos en el estudio se muestran en la Tabla 6.

#### IV. Resultados

En cada uno de los tests de la batería PHES, obtuvieron peores resultados los pacientes con EHM que los cirróticos sin EHM y los controles. También observamos que en el test de ‘Símbolos y Dígitos’ los pacientes cirróticos sin EHM realizan un menor número de ítems que los controles ( $p \leq 0,05$ ) (Tabla 5).

Tabla 5. Puntuación desglosada de cada uno de los tests de la batería PHES

GRUPO/TEST	CONTROL	SIN EHM	EHM
SÍMBOLOS Y DÍGITOS	0,16 ± 0,08	-0,17 ± 0,06*	-0,71 ± 0,11***, <sup>c</sup>
CONEXIÓN NUMÉRICA A	0,05 ± 0,05	0,11 ± 0,06	-1,09 ± 0,19***, <sup>c</sup>
CONEXIÓN NUMÉRICA B	0,11 ± 0,07	-0,11 ± 0,07	-1,81 ± 0,22***, <sup>c</sup>
PUNTOS SERIADOS	0,00 ± 0,00	-0,13 ± 0,05	-0,94 ± 0,18***, <sup>c</sup>
LÍNEA QUEBRADA	-0,10 ± 0,07	-0,15 ± 0,09	-2,21 ± 0,16***, <sup>c</sup>

Los valores son la media ± SEM de 34 controles, 46 pacientes sin EHM y 34 con EHM. Los valores significativamente diferentes de los controles se indican con asteriscos: \* $p \leq 0,05$ ; \*\*\* $p \leq 0,001$ . Los valores significativamente diferentes entre pacientes con EHM y sin EHM se indican como <sup>c</sup> $p \leq 0,001$ .

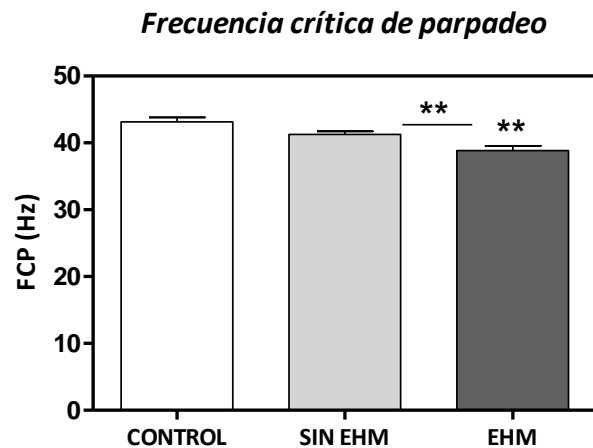
Tabla 6. Características de los controles y pacientes incluidos en el estudio

CARACTERÍSTICAS	CONTROL	SIN EHM	EHM
Total individuos	34	46	34
Hombres	15	41	22
Mujeres	19	5	12
Edad	55 ± 11	58 ± 10	63 ± 11
<b>Etiología</b>			
ALCOHOL		33	18
VHB/VHC/VHB+VHC	-	1/9/1	3/9/0
ALCOHOL + VHB/VHC		1/1	0/3
CRIOGÉNICA		0	1
Child Pugh (A/B/C)	-	33/13/0	21/11/2
MELD	-	8,9 ± 0,7	10 ± 1
Ascitis	-	7	10

Los valores del MELD son la media ± el SEM. (VHB, virus de la hepatitis B; VHC, virus de la hepatitis C; MELD, Model for End Stage Liver Disease)



También se determinó la frecuencia crítica de parpadeo (FCP) con el Hepatonorm®, que mide la frecuencia (Hz) a la que el sujeto detecta el cambio de continua a parpadeante de una luz de frecuencia decreciente. La frecuencia crítica de parpadeo en los pacientes con EHM fue menor ( $38,9 \pm 0,7$ ) que en los pacientes cirróticos ( $41,3 \pm 0,5$ ;  $p \leq 0,01$ ) y en los controles ( $43,2 \pm 0,7$ ;  $p \leq 0,01$ ), lo que indica una mayor dificultad para apreciar dicho parpadeo.



**Figura 22.** Los pacientes con EHM tienen disminuida la Frecuencia Crítica de Parpadeo (Hz). Los valores son la media  $\pm$  SEM del número de sujetos estudiados (controles  $n=34$ , sin EHM  $n=46$ , EHM  $n=34$ ). Los valores significativamente diferentes entre grupos se indican con asteriscos (\*\* $p \leq 0,01$ ).

### **1.2. Alteraciones en coordinación motora en EHM: Coordinación Bimanual y Visuomotora**

Se analizó la coordinación motora en pacientes y sujetos control utilizando los Tests de coordinación Bimanual y de coordinación Visuomotora.

En el test de coordinación Bimanual los pacientes con EHM necesitaron más tiempo, expresado en centésimas de minuto, para completar la tarea ( $265 \pm 8$ ) que los cirróticos sin EHM ( $196 \pm 4$ ;  $p \leq 0,001$ ) y los controles ( $167 \pm 4$ ;  $p \leq 0,001$ ). Los paciente sin EHM también necesitan más tiempo que los controles ( $p \leq 0,05$ ) para completar la tarea (Figura 23A).

Utilizando las tablas normalizadas para cada sexo, asignamos cada individuo a un percentil de la población (indica el tanto por ciento de sujetos de la población al que dicho sujeto es superior en el test. El percentil 50 es la media de la población normal). Los pacientes con EHM están en percentiles mucho menores ( $2,3 \pm 0,5$ ) que el grupo de cirróticos sin EHM ( $31 \pm 5$ ;  $p \leq 0,001$ ) y el grupo control ( $69 \pm 7$ ;  $p \leq 0,001$ ). A su vez, los pacientes sin EHM también están en percentiles menores que los controles ( $p \leq 0,001$ ) como se muestra en la Tabla 7 y la Figura 23B.

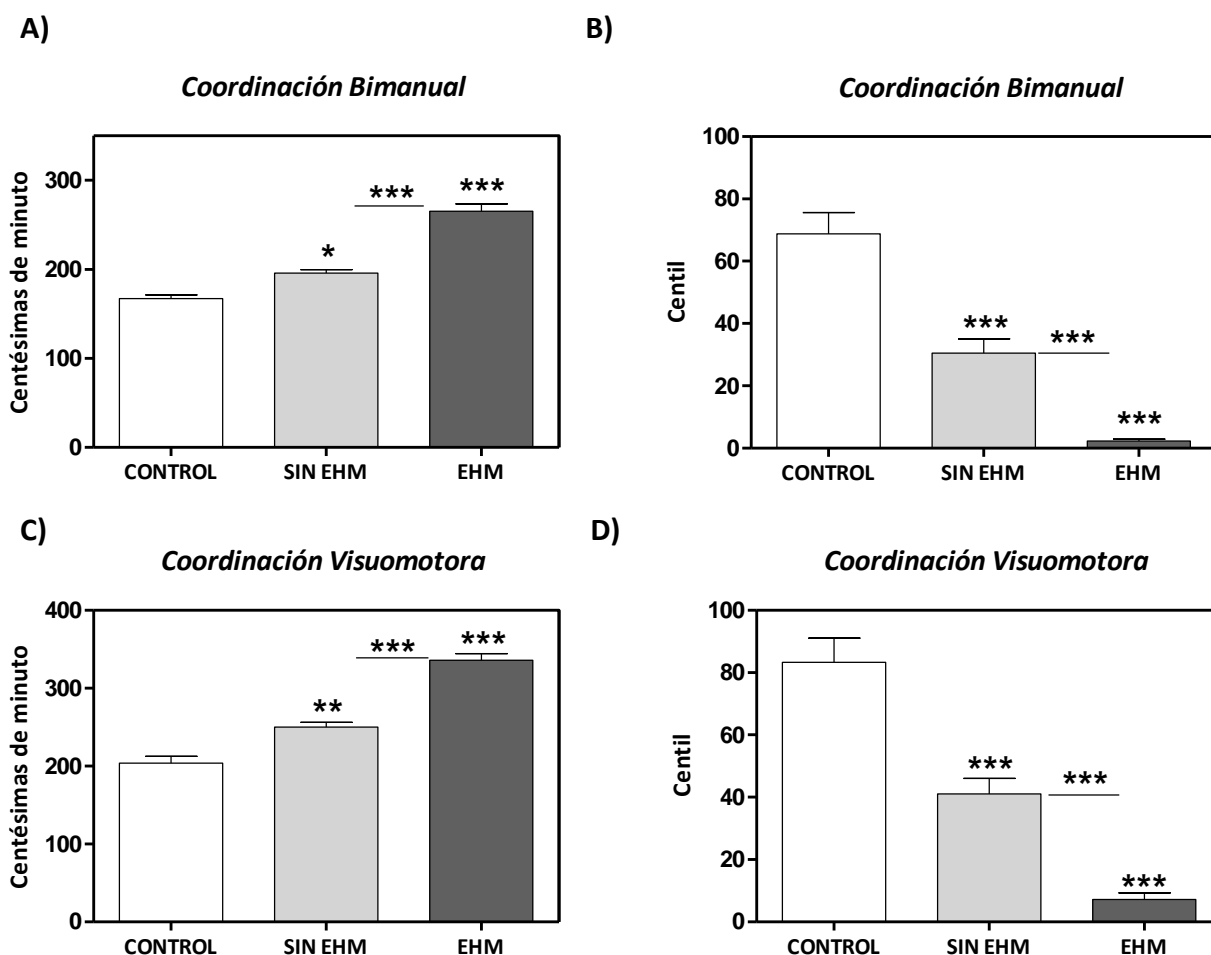
En el test de coordinación Visuomotora los pacientes con EHM necesitaron más tiempo, expresado en centésimas de minuto, para completar la tarea ( $336 \pm 9$ ) que los cirróticos sin EHM ( $250 \pm 6$ ;  $p \leq 0,001$ ) y los controles ( $204 \pm 9$ ;  $p \leq 0,001$ ). Los pacientes sin EHM también necesitan más tiempo para realizar la tarea que los controles ( $p \leq 0,01$ ) (Figura 23C).

Utilizando las tablas normalizadas para cada sexo, asignamos cada individuo a un percentil de la población. Los pacientes con EHM están en percentiles mucho menores ( $7,2 \pm 2,0$ ) que los cirróticos sin EHM ( $41 \pm 5$ ;  $p \leq 0,001$ ) y los controles ( $83 \pm 8$ ;  $p \leq 0,001$ ). Los pacientes sin EHM también están en percentiles menores que los controles ( $p \leq 0,001$ ) como se muestra en la Tabla 7 y la Figura 23D.

Tabla 7. Los pacientes con EHM tienen disminuida la coordinación Bimanual y la Visuomotora

GRUPO DE SUJETOS	COORD. BIMANUAL		COORD. VISUOMOTORA	
	Tiempo (centésimas de min)	Centil	Tiempo (centésimas de min)	Centil
CONTROL	167 ± 4	69 ± 7	204 ± 9	83 ± 8
SIN EHM	196 ± 4*	31 ± 5***	250 ± 6**	41 ± 5***
EHM	265 ± 8***, C	2,3 ± 0,5***, C	336 ± 9***, C	7,2 ± 2,0***, C

Los valores son la media ± SEM de 34 controles, 46 pacientes sin EHM y 34 con EHM en los tests de coordinación Bimanual y Visuomotora. Los valores significativamente diferentes de los controles se indican con asteriscos: \* $p \leq 0,05$ ; \*\* $p \leq 0,01$ ; \*\*\* $p \leq 0,001$ . Los valores significativamente diferentes entre pacientes con EHM y sin EHM se indican como <sup>C</sup> $p \leq 0,001$ .



**Figura 23.** Los pacientes cirróticos con EHM tienen disminuida la coordinación Bimanual (A, B) y Visuomotora (C, D). Los valores son la media ± SEM del número de sujetos estudiados: 34 controles, 46 cirróticos sin EHM y 34 con EHM. Los valores significativamente diferentes entre grupos se indican con asteriscos (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ).

### **1.3. Estudio de alteraciones cognitivas en pacientes con EHM**

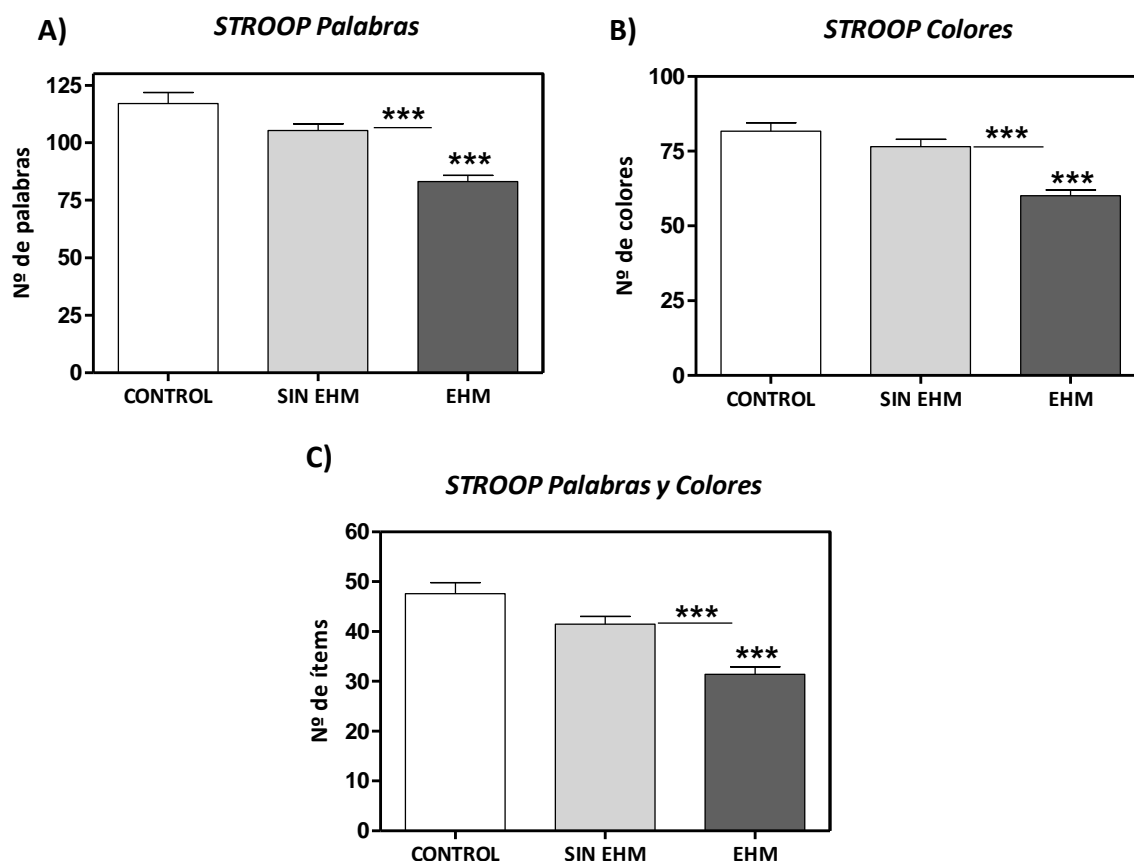
#### **1.3.1. Atención selectiva: Test de STROOP**

En este test se evaluó la atención selectiva de los pacientes y sujetos control. En las tres partes de las que se compone el test, pudimos observar una menor capacidad de los pacientes cirróticos con EHM para la realización de la tarea respecto a los cirróticos sin EHM y a los sujetos sanos.

En la tarea congruente, los pacientes con EHM realizaron peor la tarea, leyendo menos palabras ( $83 \pm 3$ ) que los pacientes sin EHM ( $105 \pm 3$ ;  $p \leq 0,001$ ) y que los controles ( $117 \pm 5$ ;  $p \leq 0,001$ ), no habiendo diferencias significativas entre pacientes sin EHM y controles (Figura 24A). En la tarea neutra el resultado fue similar, siendo los pacientes con EHM los que menos número de colores leyeron ( $60 \pm 2$ ) comparado con los pacientes sin EHM ( $77 \pm 2$ ;  $p \leq 0,001$ ) y los controles ( $82 \pm 3$ ;  $p \leq 0,001$ ). Entre controles y pacientes sin EHM no hubo diferencias (Figura 24B).

Finalmente, en la tarea incongruente se evaluó la capacidad de inhibir la respuesta inmediata del cerebro de leer la palabra. Los pacientes con EHM realizan peor la tarea, leyendo un menor número de ítems ( $31 \pm 2$ ) que los pacientes sin EHM ( $41 \pm 2$ ;  $p \leq 0,001$ ) y los controles ( $48 \pm 2$ ;  $p \leq 0,001$ ). No hubo diferencias significativas entre los controles y los pacientes sin EHM (Figura 24C).

En los pacientes cirróticos sin EHM se aprecia una tendencia a presentar un ligero déficit de atención en las tres tareas evaluadas en el test, aunque las diferencias no son significativas en comparación con los controles (Figura 24).



**Figura 24.** Los pacientes con EHM presentan un déficit de atención selectiva evaluada mediante la realización del test Stroop en las tareas de lectura de palabras (A), de nombrar colores (B) y en la inhibición de la respuesta involuntaria (C). Los valores son la media  $\pm$  SEM del número de sujetos estudiados (controles  $n=34$ , sin EHM  $n=46$ , EHM  $n=34$ ). Los valores significativamente diferentes entre grupos se indican con asteriscos (\* $p<0,05$ ; \*\*\* $p<0,001$ ).

### 1.3.2. Atención selectiva/sostenida y concentración: Test d2

El test d2 evalúa la atención selectiva y sostenida y el grado de concentración y flexibilidad mental de un sujeto.

En todos los parámetros analizados el resultado fue similar: una peor ejecución de la tarea por los pacientes con EHM que por los sin EHM, que a su vez la realizaron peor que los controles. Ésto se ve reflejado en el hecho de que los pacientes con EHM se encuentran en percentiles menores que los pacientes sin EHM y éstos a su vez, en percentiles menores que los controles (Figura 25).

En el total de respuestas (TR) los pacientes con EHM marcan menos ítems por lo que se encuentran en percentiles muy inferiores ( $25 \pm 2$ ) que los pacientes sin EHM ( $50 \pm 3$ ;  $p \leq 0,001$ )

#### **IV. Resultados**

---

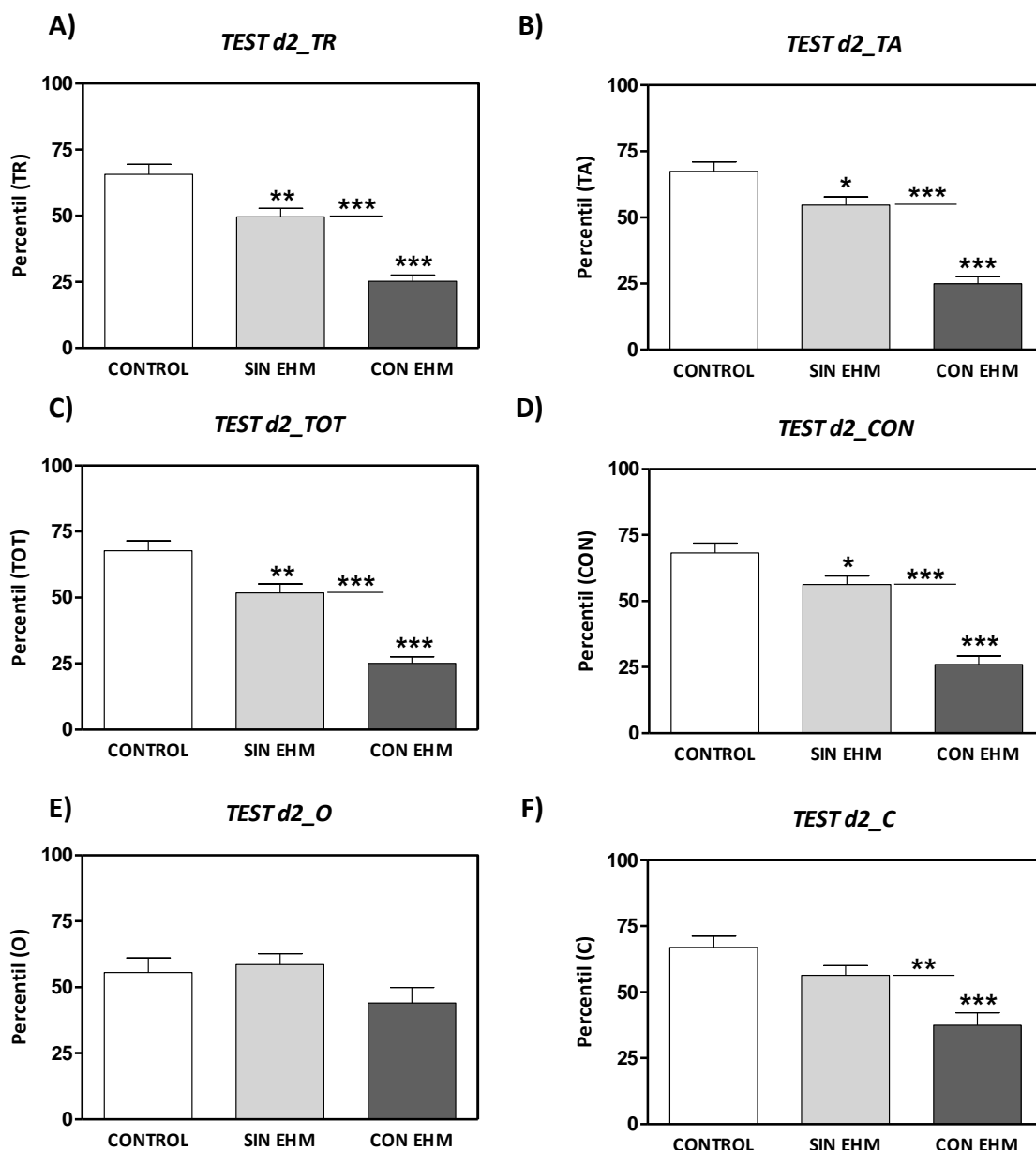
y que los controles ( $66 \pm 4$ ;  $p \leq 0,001$ ). Los pacientes sin EHM también se encuentran en percentiles menores que los controles ( $p \leq 0,01$ ) (Figura 25A).

Los pacientes con EHM realizan un menor número de aciertos (TA), por lo que se encuentran en percentiles menores ( $25 \pm 3$ ) que los pacientes sin EHM ( $55 \pm 3$ ;  $p \leq 0,001$ ) y los controles ( $68 \pm 4$ ;  $p \leq 0,001$ ). Los pacientes sin EHM también se diferencian significativamente de los controles ( $p \leq 0,05$ ) (Figura 25B).

En cuanto a la efectividad de la tarea (TOT) los pacientes con EHM son los menos efectivos, encontrándose en percentiles inferiores ( $25 \pm 2$ ) que los pacientes sin EHM ( $52 \pm 3$ ;  $p \leq 0,001$ ) y los controles ( $68 \pm 4$ ;  $p \leq 0,001$ ). Los pacientes sin EHM también se diferencian significativamente de los controles ( $p \leq 0,01$ ) (Figura 25C).

Los pacientes con EHM muestran un déficit de concentración como refleja la disminución del parámetro CON, por lo que se encuentran en percentiles menores ( $26 \pm 3$ ) que los pacientes sin EHM ( $56 \pm 3$ ;  $p \leq 0,001$ ) y los controles ( $68 \pm 4$ ;  $p \leq 0,001$ ). Los pacientes sin EHM también presentan menor concentración que los controles ( $p \leq 0,05$ ) (Figura 25D).

Los pacientes con EHM realizan un mayor número de errores que los pacientes sin EHM y los controles, encontrándose en percentiles inferiores. En los errores por omisión no se encontraron diferencias significativas (EHM:  $44 \pm 6$ ; sin EHM:  $59 \pm 4$ ; controles:  $56 \pm 3$ ) (Figura 25E). Sin embargo sí se observaron diferencias en los errores por comisión, encontrándose los pacientes con EHM en un percentil inferior ( $37 \pm 5$ ) que los sin EHM ( $56 \pm 4$ ;  $p \leq 0,01$ ) y los controles ( $67 \pm 4$ ;  $p \leq 0,001$ ) (Figura 25F).



**Figura 25. Los pacientes con EHM presentan un déficit en la atención sostenida y concentración evaluadas mediante la realización del test d2.** Los pacientes con EHM presentan un menor número de respuestas realizadas (A: TR), menor número de aciertos (B: TA), una menor efectividad total en la tarea (C: TOT), una menor capacidad de concentración (D: CON) y mayor número de errores (F) que los pacientes sin EHM y controles. Los valores son la media  $\pm$  SEM del número de sujetos estudiados (CONTROL  $n=34$ , SIN EHM  $n=46$ , EHM  $n=34$ ). Los valores significativamente diferentes entre grupos se indican con asteriscos (\* $p<0,05$ ; \*\* $p<0,01$ ; \*\*\* $p<0,001$ ).

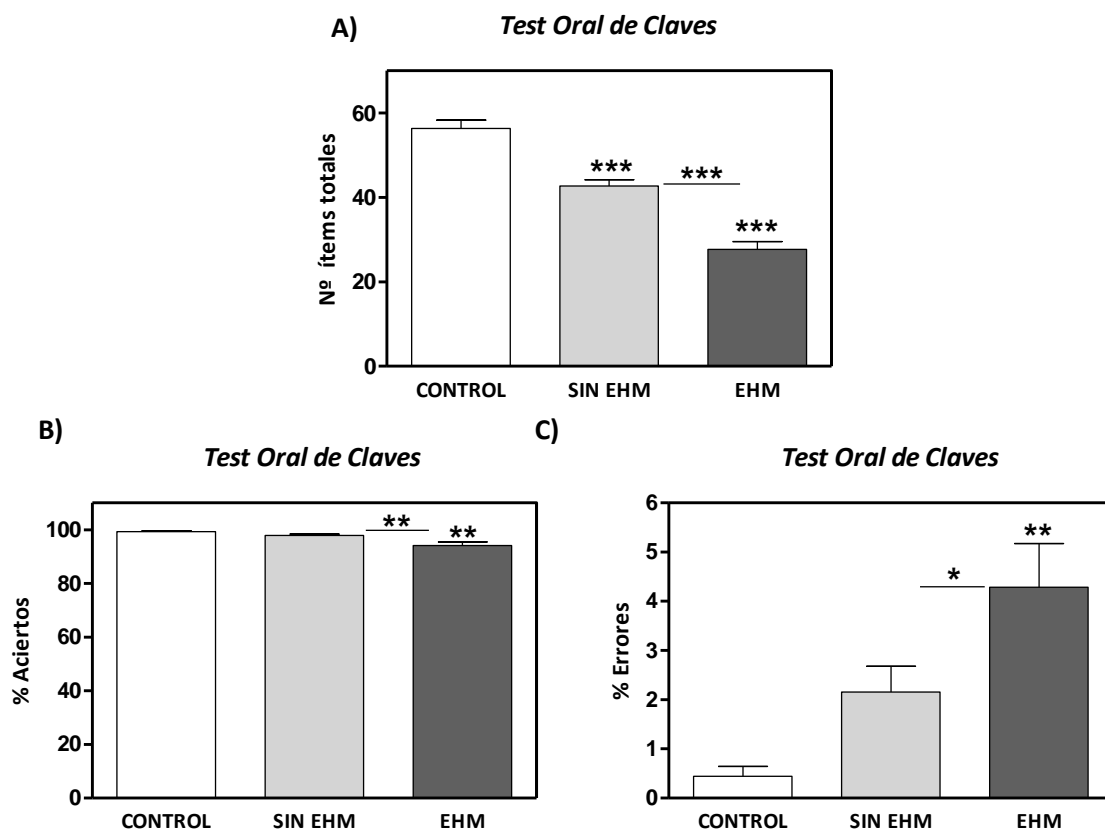
TR (Total de respuestas marcadas) es una medida de la velocidad de procesamiento y cantidad de trabajo realizado; TA (Total de aciertos); TOT (Total de ítems realizados menos los errores) mide la efectividad en la realización de la tarea; CON es una medida de la concentración; O: errores por omisión; C: errores por comisión.

### 1.3.3. Test Oral de Claves

En este test se evaluó la capacidad de asociar un símbolo a un número, requiriendo funciones cognitivas como atención y, en menor medida, memoria. Los pacientes con EHM realizaron un menor número de ítems de la prueba ( $28 \pm 2$ ) que los cirróticos sin EHM ( $43 \pm 1$ ;  $p \leq 0,001$ ) y los controles ( $56 \pm 2$ ;  $p \leq 0,001$ ). Los cirróticos sin EHM a su vez, también se diferencian significativamente de los controles ( $p \leq 0,001$ ) (Figura 26A).

En cuanto a la efectividad en la tarea, los pacientes con EHM realizaron menor porcentaje de aciertos ( $94,1 \pm 1,4$ ) que los cirróticos sin EHM ( $97,8 \pm 0,5$ ;  $p \leq 0,01$ ) y que los controles ( $99,3 \pm 0,3$ ;  $p \leq 0,01$ ). Los cirróticos sin EHM no se diferencian de los controles (Figura 26B). El porcentaje de errores fue mayor en los cirróticos con EHM ( $4,3 \pm 0,9$ ) que en los cirróticos sin EHM ( $2,2 \pm 0,5$ ;  $p \leq 0,05$ ) y que los controles ( $0,4 \pm 0,2$ ;  $p \leq 0,01$ ). No hay diferencias entre los pacientes sin EHM y los controles (Figura 26C).

El número de sujetos de cada grupo en los tests orales es menor al del resto de pruebas realizadas por que éstos se incluyeron con posterioridad al inicio del estudio (Figuras 26-28).



**Figura 26. Los pacientes con EHM muestran un déficit de atención y memoria evaluados con el Test Oral de Claves.** Los pacientes cirróticos con EHM presentan un menor número de ítems realizados (A), un menor porcentaje de aciertos (B), y un mayor porcentaje de errores (C). Los valores son la media  $\pm$  SEM del número de sujetos estudiados (CONTROL  $n=17$ , SIN EHM  $n=35$ , EHM  $n=29$ ). Los valores significativamente diferentes entre grupos se indican con asteriscos (\* $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ).

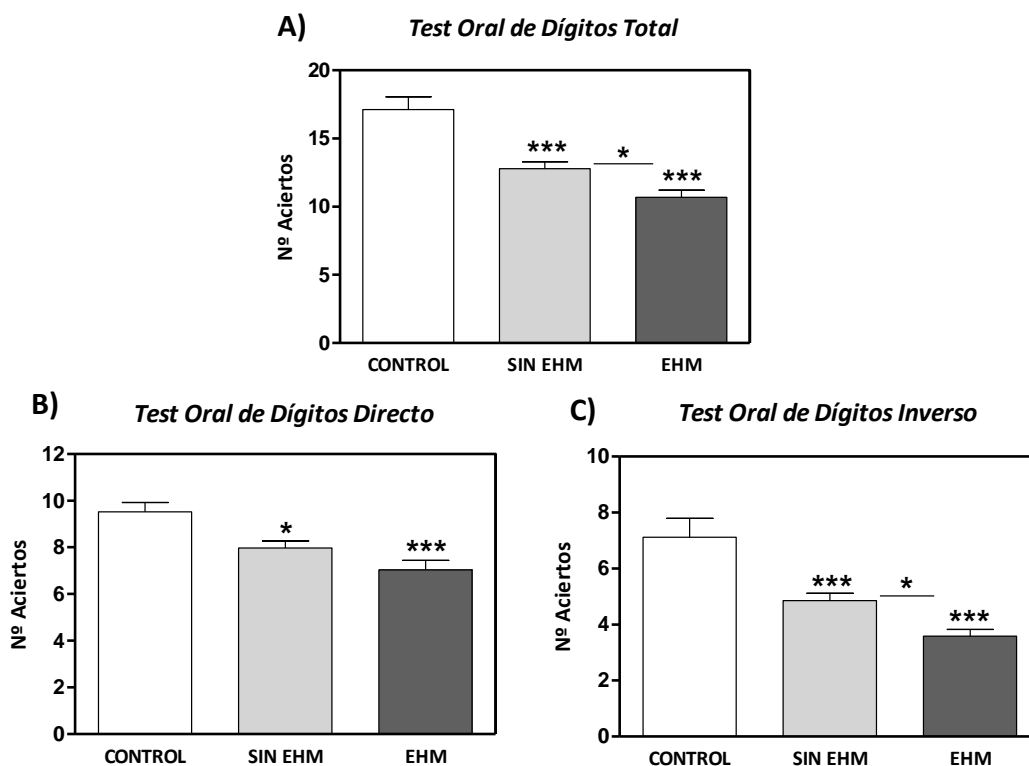


### 1.3.4. Test Oral de Dígitos (Directo e Inverso)

Esta prueba mide la memoria a corto plazo. Se basa en la memorización de una serie de números y su posterior repetición, por lo que también requiere atención.

El resultado global del test es la suma de series completadas en las dos pruebas (Dígitos Directos e Inversos) y mostró una disminución del número de series totales memorizadas correctamente en los pacientes cirróticos con EHM ( $10,7 \pm 0,5$ ) en comparación con los pacientes sin EHM ( $12,8 \pm 0,5$ ;  $p \leq 0,05$ ) y los controles ( $17,1 \pm 0,9$ ;  $p \leq 0,001$ ). Los cirróticos sin EHM y los controles también se diferenciaron significativamente ( $p \leq 0,001$ ) (Figura 27A).

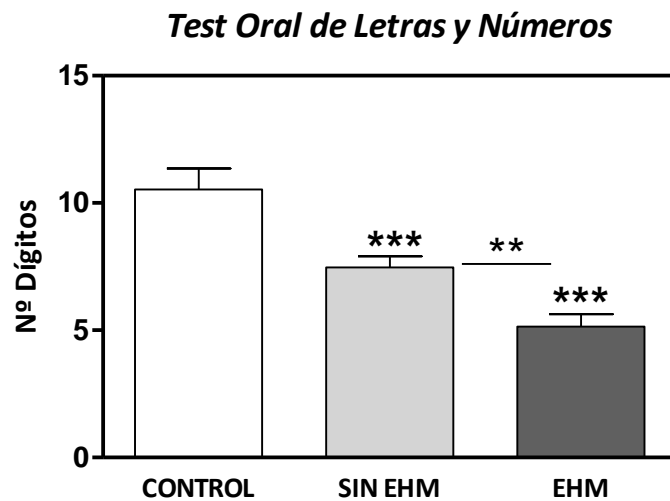
En la prueba de Dígitos Directos hubo una disminución en el número de series que los pacientes con EHM ( $7,0 \pm 0,4$ ) fueron capaces de memorizar y repetir correctamente comparado con los pacientes sin EHM ( $8,0 \pm 0,3$ ) y los controles ( $9,5 \pm 0,4$ ;  $p \leq 0,001$ ), siendo no significativas las diferencias entre los dos grupos de pacientes (Figura 27B). Por el contrario, en la prueba de Dígitos Inversos, que presenta un mayor grado de dificultad, los pacientes cirróticos con EHM memorizaron un menor número de series ( $3,6 \pm 0,2$ ) que los cirróticos sin EHM ( $4,9 \pm 0,3$ ;  $p \leq 0,05$ ) y que los controles ( $7,1 \pm 0,7$ ;  $p \leq 0,001$ ). Los cirróticos sin EHM también memorizaron menos series que los controles ( $p \leq 0,001$ ) (Figura 27C).



**Figura 27. Los pacientes con EHM presentan un déficit en la memoria a corto plazo evaluada con el Test Oral de Dígitos.** Los pacientes con EHM memorizan un menor número de series numéricas, tanto en la prueba directa (B) como en la inversa (C) que los controles. Ambos grupos de pacientes se diferencian en el test de Dígitos Inverso (C) y en el resultado global del test (A). Los valores son la media  $\pm$  SEM del número de sujetos estudiados (controles  $n=17$ , sin EHM  $n=35$ , EHM  $n=29$ ). Los valores significativamente diferentes entre grupos se indican con asteriscos (\* $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ).

### 1.3.5. Test Oral de Letras y Números

Esta prueba es una variante del test Oral de Dígitos, en la que aumenta el nivel de complejidad, ya que las series contienen números y letras, que se deben memorizar y a su vez ordenar las letras por orden alfabético y los números de menor a mayor, requiriendo mayor atención y concentración. El resultado fue un menor número de series memorizadas correctamente por los pacientes con EHM ( $5,1 \pm 0,5$ ) comparado con los pacientes sin EHM ( $7,5 \pm 0,4$ ;  $p \leq 0,01$ ) y los controles ( $10,5 \pm 0,8$ ;  $p \leq 0,001$ ). Los cirróticos sin EHM también memorizaron menos series que los controles ( $p \leq 0,001$ ) (Figura 28).



**Figura 28.** Los pacientes con EHM presentan un déficit en atención y concentración evaluada con el Test Oral de Letras y Números. Los valores son la media  $\pm$  SEM del número de sujetos estudiados (controles  $n=17$ , sin EHM  $n=35$ , EHM  $n=29$ ). Los valores significativamente diferentes entre grupos se indican con asteriscos (\*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ).

#### 1.4. Capacidad de los tests de coordinación, atención y memoria para detectar la EHM

Para determinar la capacidad de cada test utilizado en la tesis para predecir la EHM se realizó un análisis de regresión logística, utilizando la presencia de EHM (diagnosticada según el PHES) como variable dependiente y los parámetros analizados en cada test como variable independiente. Para los tests de Coordinación Bimanual y Visuomotora, y los tests orales de Claves, Dígitos y Letras y Números se introdujo la edad como covariable en el análisis de regresión logística.

También calculamos las curvas ROC (*Receiver Operating Characteristic*) para determinar el punto de corte de los parámetros predictivos, el área bajo la curva (ABC), la especificidad y sensibilidad y el valor predictivo positivo (VPP) y negativo (VPN) de cada parámetro que analizan los tests.

##### 1.4.1. Coordinación motora: Bimanual y Visuomotora

El test de coordinación bimanual mostró un Odds ratio (OR) de 1,074 (intervalo de confianza 95% (IC): 1,038-1,111;  $p < 0,001$ ) y el de coordinación visuomotora, un OR de 1,041 (IC: 1,023-1,059;  $p < 0,001$ ).

Las curvas ROC de los test de coordinación bimanual y visuomotora se muestran en la Figura 29, presentando un ABC de 0,925 ( $p < 0,0001$ ) y 0,905 ( $p < 0,0001$ ) respectivamente. Para un punto de corte de 223,3 centésimas de minuto, el test de coordinación bimanual muestra una sensibilidad del 79% y una especificidad del 86%, con un VPP de 81% y un VPN de 84%.

El test de coordinación visuomotora, para un punto de corte de 298,5 centésimas de minuto presenta una sensibilidad del 85% y especificidad del 91%, con un VPP de 88% y VPN de 89%.

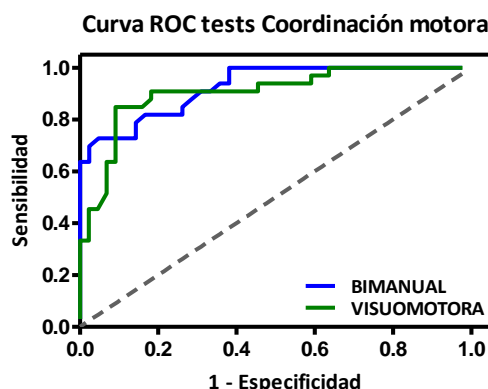


Figura 29. Curva ROC de los tests de coordinación motora bimanual (azul) y visuomotora (verde)

Por tanto ambos tests tienen una buena capacidad para detectar la presencia de EHM.

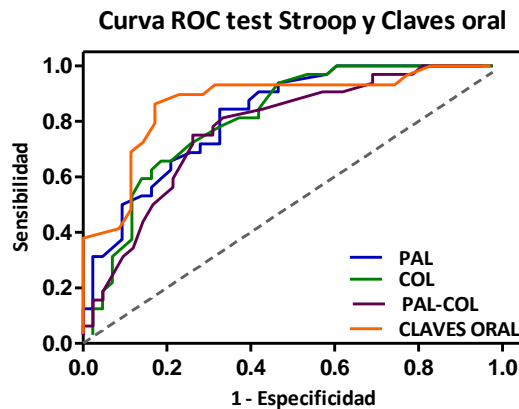
**1.4.2. Atención selectiva: test Stroop y test oral de Claves**

Los tests que evalúan la atención selectiva, en concreto la velocidad de procesamiento mental utilizados son el test Stroop y el oral de Claves. El análisis de regresión logística (OR) y de la curva ROC (ABC, sensibilidad, especificidad, VPP, VPN) se muestra en la Tabla 8 y Figura 30.

**Tabla 8. Análisis de regresión logística y de la curva ROC del test Stroop y de Claves oral**

REGRESIÓN LOGÍSTICA				
	PAL	COL	PAL-COL	CLAVES ORAL
OR	0,922	0,913	0,893	0,824
IC 95% del OR	0,886-0,959	0,873-0,955	0,841-0,948	0,749-0,907
Valor 'p'	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001
CURVA ROC				
ABC	0,822	0,811	0,776	0,870
Valor 'p'	p<0,0001	p<0,0001	p<0,0001	p<0,0001
Punto corte (nº ítems)	< 96	< 68	< 36,5	< 34,5
Sensibilidad (%)	84	72	75	86
Especificidad (%)	68	75	74	83
VPN (%)	86	79	80	88
VPP (%)	66	68	69	81

OR (Odds ratio); ABC (área bajo la curva); VPN (valor predictivo negativo); VPP (valor predictivo positivo)



**Figura 30. Curva ROC del test Stroop (PAL: tarea congruente; COL: tarea neutral; PAL-COL: tarea incongruente) y test de Claves oral**

Los datos muestran que ambos tests tienen buena capacidad predictiva de EHM, siendo el test de Claves oral el que mejor sensibilidad y especificidad presenta.

**1.4.3. Atención selectiva/sostenida y concentración: test d2**

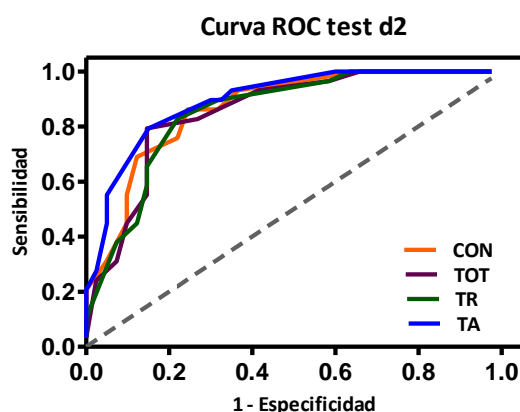
El test d2 evalúa la atención selectiva/sostenida y la concentración mental mediante el cálculo de diversos parámetros (percentiles: Pc): CON (índice de concentración mental), TOT (efectividad de la tarea), TR (velocidad de procesamiento y cantidad de trabajo realizado) y TA

(total de aciertos). El análisis de regresión logística (OR) de los diferentes parámetros y de la curva ROC (ABC, sensibilidad, especificidad, VPP, VPN) se muestra en la Tabla 9 y Figura 31.

**Tabla 9. Análisis de regresión logística y de la curva ROC del test d2**

REGRESIÓN LOGÍSTICA				
	CON (Pc)	TOT (Pc)	TR (Pc)	TA (Pc)
OR	0,925	0,918	0,912	0,902
IC 95% del OR	0,893-0,958	0,881-0,957	0,872-0,954	0,860-0,946
Valor 'p'	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001
CURVA ROC				
ABC	0,868	0,853	0,852	0,896
Valor 'p'	p<0,0001	p<0,0001	p<0,0001	p<0,0001
Punto corte (Pc)	< 42,5	< 37,5	< 37,5	< 37,5
Sensibilidad (%)	86	83	83	86
Especificidad (%)	76	73	78	75
VPN (%)	89	86	87	88
VPP (%)	71	69	73	71

OR (Odds ratio); ABC (área bajo la curva); VPN (valor predictivo negativo); VPP (valor predictivo positivo)



**Figura 31. Curva ROC del test d2 (CON: concentración; TOT: efectividad; TR: velocidad de procesamiento mental; TA (aciertos))**

Por tanto, el test d2 tiene una buena capacidad para predecir la EHM.

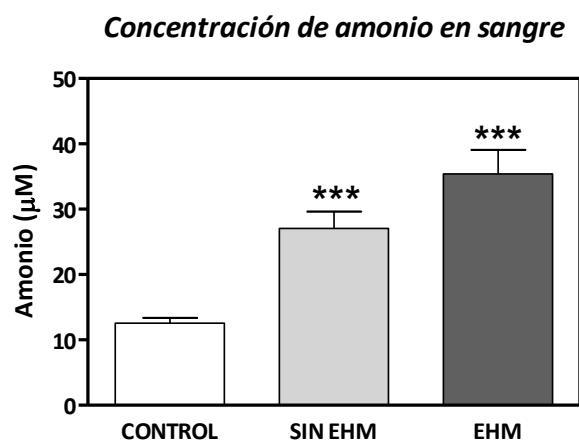
#### 1.4.4. Memoria de trabajo: test oral de Dígitos y test oral de Letras y Números

La memoria de trabajo se evaluó mediante los tests orales de Dígitos y Letras y Números, cuyo análisis mediante regresión logística mostró un OR de 0,811 (IC: 0,666-0,987; p=0,037) y 0,697 (IC: 0,544-0,894; p=0,005) respectivamente. Las curvas ROC dieron unas ABCs bajas: 0,701 (p=0,006) y 0,795 (p<0,0001) respectivamente. Para un punto de corte de 11,5 ítems (Dígitos) y 6,5 ítems (Letras y Números) tienen una sensibilidad de 59% y 68% respectivamente, y una especificidad de 76% y 68%, con un VPP de 61 y 67% y un VPN de 66% y 77% respectivamente, no siendo buenos predictores de EHM.

## 2. Análisis de las alteraciones bioquímicas en pacientes con encefalopatía hepática mínima (EHM)

### 2.1. Alteraciones en la concentración de amonio en sangre: Hiperamonemia

Los pacientes cirróticos sin o con EHM presentan hiperamonemia. La concentración de amonio en sangre venosa está aumentada en pacientes cirróticos sin EHM ( $27 \pm 3 \mu\text{M}$ ;  $p \leq 0,001$ ) y con EHM ( $35 \pm 4 \mu\text{M}$ ;  $p \leq 0,001$ ) respecto al grupo control ( $13 \pm 1 \mu\text{M}$ ). Las diferencias entre ambos grupos de pacientes no son significativas (Figura 32).



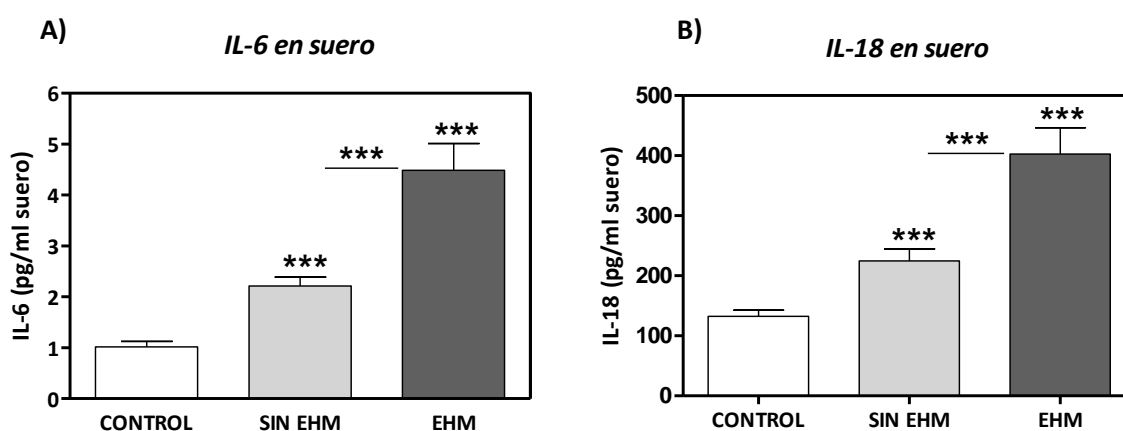
**Figura 32. Los pacientes cirróticos con y sin EHM presentan hiperamonemia.** Se midió la concentración de amonio en sangre con el aparato Ammonia Checker II<sup>®</sup>. Los valores son la media  $\pm$  SEM del número de sujetos estudiados (controles  $n=34$ ; sin EHM  $n=46$ ; EHM  $n=34$ ). Los valores significativamente diferentes entre grupos se indican con asteriscos (\*\*\*) ( $p < 0.001$ ).

### 2.2. Inflamación:

Para analizar la inflamación periférica se midieron los niveles séricos de dos citoquinas pro-inflamatorias: IL-6 y IL-18. Ambas aumentan tanto en pacientes cirróticos sin EHM como con EHM frente al grupo control. Además los pacientes con EHM muestran un aumento significativo respecto al grupo de pacientes sin EHM, reflejando una mayor inflamación periférica.

Los niveles séricos de IL-6 están aumentados en los pacientes con EHM ( $4,5 \pm 0,5$  pg/ml) en comparación con los pacientes sin EHM ( $2,2 \pm 0,2$  pg/ml;  $p \leq 0,001$ ) y los controles ( $1,0 \pm 0,1$  pg/ml;  $p \leq 0,001$ ). Los pacientes sin EHM también tienen aumentada la IL-6 significativamente en comparación con los controles ( $p \leq 0,001$ ) (Figura 33A).

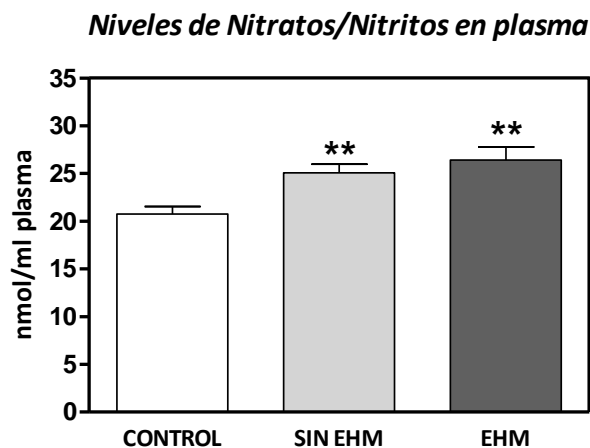
Los niveles de IL-18 en suero se encuentran aumentados en los pacientes con EHM ( $403 \pm 44$  pg/ml) en comparación con los pacientes sin EHM ( $225 \pm 20$  pg/ml;  $p \leq 0,001$ ) y los controles ( $133 \pm 10$  pg/ml;  $p \leq 0,001$ ). Los pacientes sin EHM tienen la IL-18 aumentada significativamente en comparación con los controles ( $p \leq 0,001$ ) (Figura 33B).



**Figura 33.** Los pacientes con EHM tienen aumentados los niveles en suero de IL-6 (A) y de IL-18 (B). Los valores son la media  $\pm$  SEM del número de sujetos estudiados (controles n=34; sin EHM n=46; EHM n=34). Los valores significativamente diferentes entre grupos se indican con asteriscos (\*\*\*) ( $p < 0,001$ ).

### 2.3. Nitratos/Nitritos en plasma

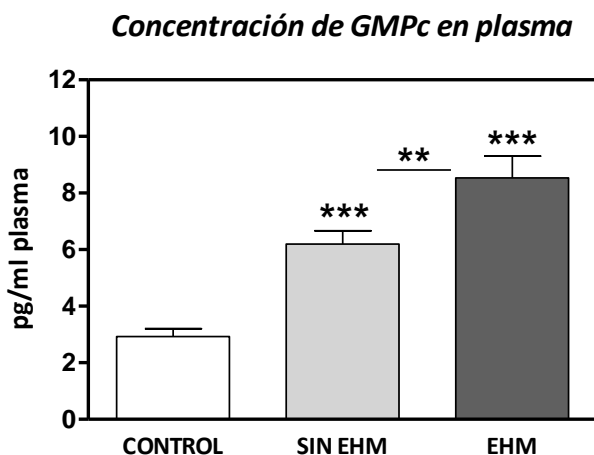
Los niveles de Nitratos/Nitritos en plasma, están aumentados marcadamente en los pacientes con EHM ( $26 \pm 1$  nmol/ml;  $p \leq 0,01$ ) y sin EHM ( $25 \pm 1$  nmol/ml;  $p \leq 0,01$ ), frente a los controles ( $21 \pm 1$  nmol/ml). La diferencia en los pacientes con EHM frente a los sin EHM no es estadísticamente significativa (Figura 34).



**Figura 34.** Los niveles de Nitratos/Nitritos en plasma están aumentados en los pacientes con o sin EHM. Los valores son la media  $\pm$  SEM del número de sujetos estudiados (controles n=34; sin EHM n=46; EHM n=34). Los valores significativamente diferentes entre grupos se indican con asteriscos (\*\* $p < 0.01$ ).

#### 2.4. GMPc plasmático

Los niveles de GMPc en plasma están aumentados en pacientes con EHM ( $8,5 \pm 0,5$  pg/ml) en comparación con los pacientes sin EHM ( $6,2 \pm 0,5$  pg/ml;  $p \leq 0,01$ ) y los controles ( $2,9 \pm 0,3$  pg/ml;  $p \leq 0,001$ ). A su vez, en los pacientes sin EHM también hay un aumento significativo del GMPc en plasma en comparación con los controles ( $p \leq 0,001$ ) (Figura 35).



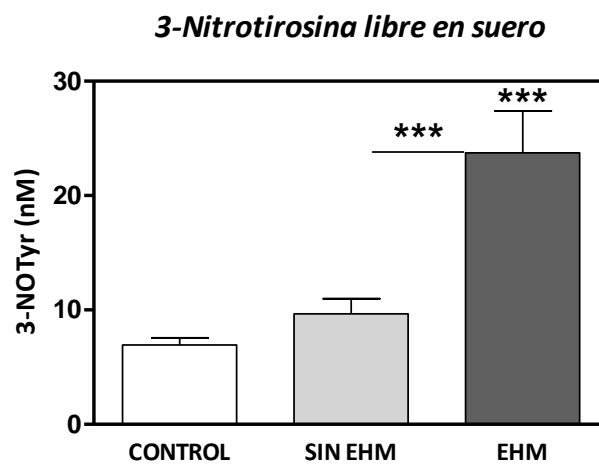
**Figura 35.** Los niveles de GMPc en plasma están aumentados en los pacientes con EHM. Los valores son la media  $\pm$  SEM del número de sujetos estudiados (controles n=34; sin EHM n=46; EHM n=34). Los valores significativamente diferentes entre grupos se indican con asteriscos (\*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ).



### 3. Análisis del estrés oxidativo/nitrosativo en EHM

#### 3.1. 3-Nitrotirosina (3-NT) como indicador de estrés oxidativo/nitrosativo:

Los niveles de 3-nitrotirosina (3-NT) libre en suero, es decir, de residuos de tirosina libre nitrados están muy aumentados en los pacientes cirróticos con EHM ( $24 \pm 4$  nM) comparado con los pacientes cirróticos sin EHM ( $10 \pm 1$  nM;  $p \leq 0,001$ ) y los controles ( $6,9 \pm 0,6$  nM;  $p \leq 0,001$ ). Entre los pacientes sin EHM y los controles no existen diferencias significativas (Figura 36).



**Figura 36.** Los niveles de 3-Nitrotirosina en suero están muy aumentados en pacientes con EHM. Los valores son la media  $\pm$  SEM del número de sujetos estudiados (controles  $n=34$ ; sin EHM  $n=46$ ; EHM  $n=34$ ). Los valores significativamente diferentes entre grupos se indican con asteriscos (\*\*\*) $p < 0,001$ .

### 3.2. Mecanismos antioxidantes:

#### 3.2.1. Actividades de enzimas antioxidantes

Se midió la actividad catalasa, superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GPx), glutatión reductasa (GR) y glutatión *S*-transferasa (GST), en eritrocitos y en células blancas mononucleares. Este estudio se realizó con un número de sujetos menor al resto de medidas debido a que no se pudo conseguir suficiente muestra de algunos controles y pacientes.

##### 3.2.1.1. Actividad Catalasa

La catalasa elimina peróxido de hidrógeno. En eritrocitos, los pacientes cirróticos, tanto con EHM ( $84 \pm 3 \text{ seg}^{-1}/\text{g Hb}$ ) como sin EHM ( $83 \pm 3 \text{ seg}^{-1}/\text{g Hb}$ ) tienen aumentada la actividad catalasa (18% y 17% respectivamente) respecto a los controles ( $71 \pm 3 \text{ seg}^{-1}/\text{g Hb}$ ;  $p \leq 0,05$  en ambos casos). Entre ambos grupos de pacientes cirróticos no hay diferencias (Figura 37A).

En células mononucleares (linfocitos y monocitos), los pacientes con EHM ( $89 \pm 8 \text{ seg}^{-1}/\text{g Hb}$ ;  $p \leq 0,05$ ) y los pacientes sin EHM ( $91 \pm 5 \text{ seg}^{-1}/\text{g Hb}$ ;  $p \leq 0,01$ ) tienen aumentada la actividad catalasa (41% y 44% respectivamente) comparada con los controles ( $63 \pm 5 \text{ seg}^{-1}/\text{g Hb}$ ). No hay diferencias entre pacientes con y sin EHM (Figura 37B).

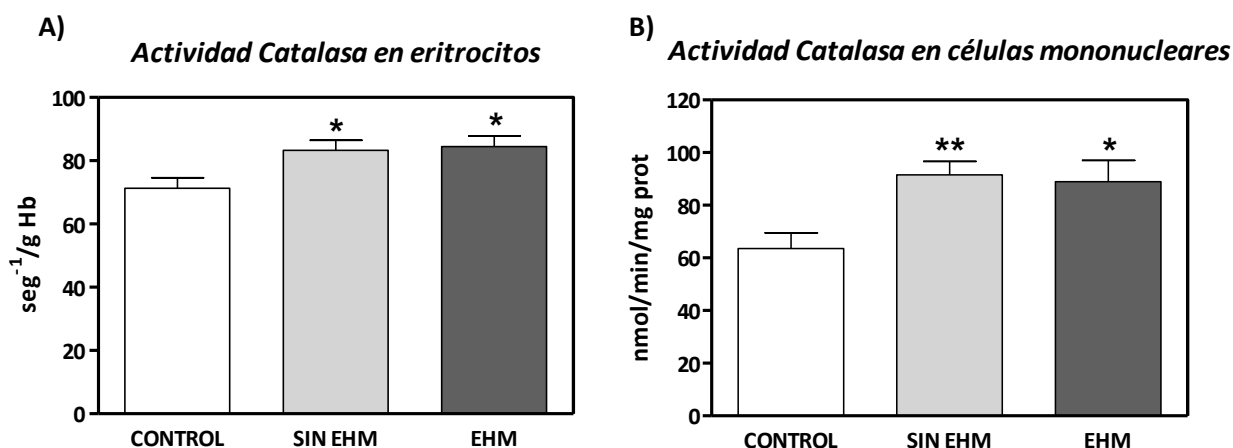


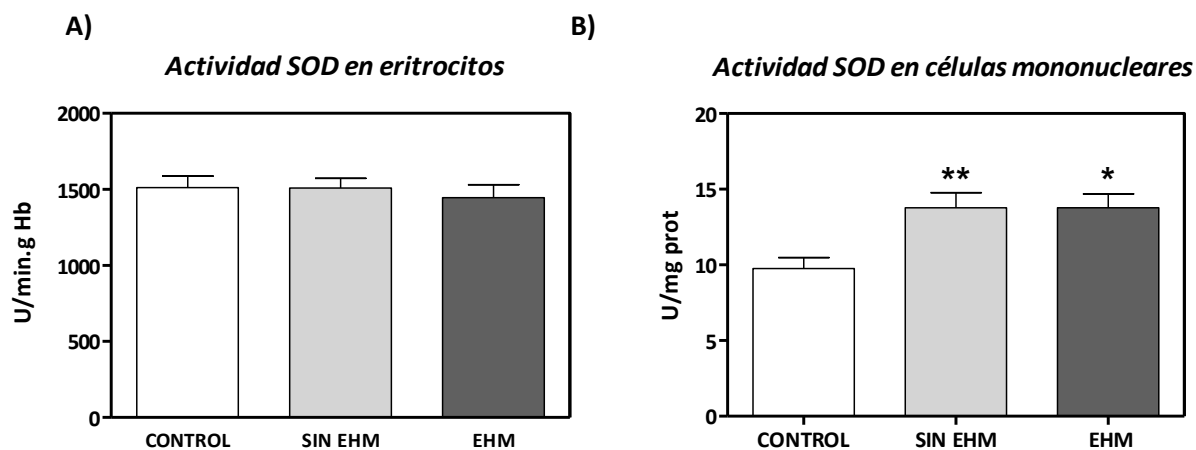
Figura 37. La actividad catalasa está aumentada en pacientes con o sin EHM en eritrocitos (A) y células mononucleares (B). Los valores son la media  $\pm$  SEM del número de sujetos estudiados (controles n=27; sin EHM n=30; EHM n=19). Los valores significativamente diferentes entre grupos se indican con asteriscos (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ).

### 3.2.1.2. Actividad Superóxido Dismutasa (SOD)

La superóxido dismutasa elimina el radical superóxido.

En eritrocitos, no se aprecian diferencias en la actividad SOD entre los controles ( $1513 \pm 14$  U/min.g Hb) y los pacientes cirróticos, sin EHM ( $1510 \pm 63$  U/min.g Hb) ó con EHM ( $1446 \pm 85$  U/min.g Hb) (Figura 38A).

En células mononucleares la actividad SOD está aumentada un 41% tanto en los pacientes con EHM ( $13,8 \pm 0,9$  U/mg prot;  $p \leq 0,05$ ) como en los sin EHM ( $13,8 \pm 1,0$  U/mg prot;  $p \leq 0,01$ ) respecto a los controles ( $9,8 \pm 0,7$  U/mg prot). Entre los pacientes con y sin EHM no hay diferencias (Figura 38B).



**Figura 38.** La actividad SOD no muestra diferencias en eritrocitos (A) pero está aumentada en células mononucleares (B) en los pacientes con o sin EHM. Los valores son la media  $\pm$  SEM del número de sujetos estudiados (controles n=27; sin EHM n=30; EHM n=19). Los valores significativamente diferentes entre grupos se indican con asteriscos (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ).

### 3.2.1.3. Actividad Glutación Peroxidasa (GPx)

La glutación peroxidasa oxida el GSH a GSSG eliminando peróxido de hidrógeno y lipoperóxidos.

En eritrocitos, los pacientes cirróticos con EHM tienen aumentada la actividad GPx ( $27 \pm 2 \mu\text{mol}/\text{min.g Hb}$ ) un 23% respecto a los cirróticos sin EHM ( $22 \pm 1 \mu\text{mol}/\text{min.g Hb}$ ;  $p \leq 0,05$ ) y un 50% respecto a los controles ( $18 \pm 1 \mu\text{mol}/\text{min.g Hb}$ ;  $p \leq 0,01$ ). Los pacientes sin EHM también tienen aumentada la actividad GPx un 22% en comparación con los controles ( $p \leq 0,05$ ). (Figura 39A).

En células mononucleares, también apreciamos un aumento de la actividad GPx un 28% en los pacientes cirróticos con EHM ( $133 \pm 14 \mu\text{mol}/\text{min.g prot}$ ) respecto a los cirróticos sin EHM ( $104 \pm 3 \mu\text{mol}/\text{min.g prot}$ ;  $p \leq 0,05$ ) y un 58% respecto a los controles ( $84 \pm 6 \mu\text{mol}/\text{min.g prot}$ ;  $p \leq 0,001$ ). En los pacientes sin EHM también está aumentada la actividad GPx un 24% en comparación con los controles ( $p \leq 0,01$ ). (Figura 39B).

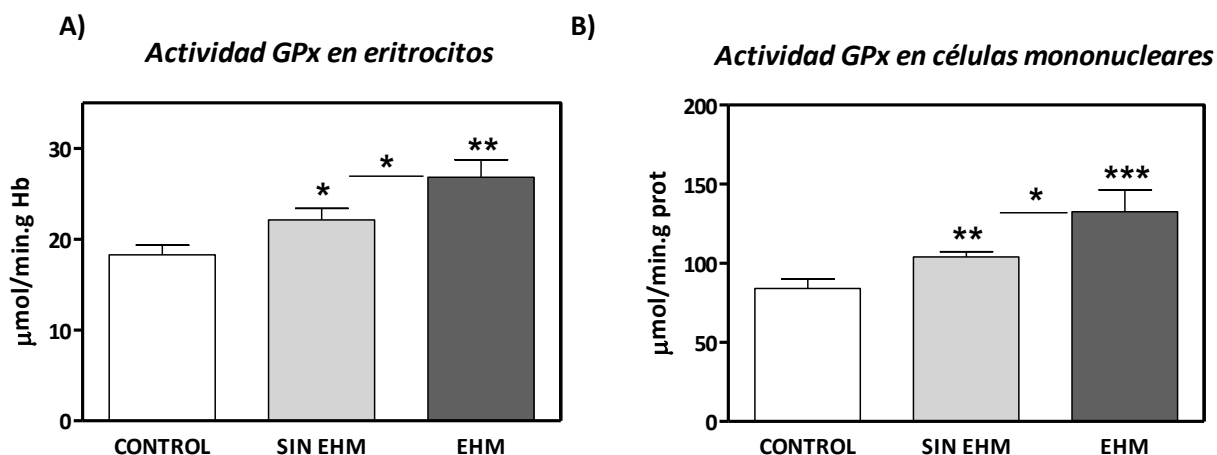


Figura 39. La actividad Glutación peroxidasa (GPx) está aumentada en los pacientes con EHM en eritrocitos (A) y en células mononucleares (B). Los valores son la media  $\pm$  SEM del número de sujetos estudiados (controles n=27; sin EHM n=30; con EHM n=19). Los valores significativamente diferentes entre grupos se indican con asteriscos (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ).

### 3.2.1.4. Actividad Glutación Reductasa (GR)

La Glutación reductasa recicla el GSSG (forma oxidada del glutación) a su forma reducida (GSH).

En eritrocitos, la actividad GR está aumentada en los pacientes cirróticos con EHM ( $2,51 \pm 0,15 \mu\text{mol}/\text{min.g Hb}$ ) un 25% respecto a los cirróticos sin EHM ( $2,00 \pm 0,08 \mu\text{mol}/\text{min.g Hb}$ ;  $p \leq 0,01$ ) y un 24% respecto a los controles ( $2,02 \pm 0,09 \mu\text{mol}/\text{min.g Hb}$ ;  $p \leq 0,01$ ). No hay diferencias entre controles y cirróticos sin EHM (Figura 40A).

En células mononucleares, la actividad GR está aumentada un 38% en los pacientes con EHM ( $38 \pm 2 \mu\text{mol}/\text{min.g prot}$ ;  $p \leq 0,01$ ) y un 25% en los pacientes sin EHM ( $35 \pm 2 \mu\text{mol}/\text{min.g prot}$ ;  $p \leq 0,05$ ) respecto a los controles ( $28 \pm 2 \mu\text{mol}/\text{min.g prot}$ ), no habiendo diferencias entre ambos grupos de pacientes (Figura 40B).

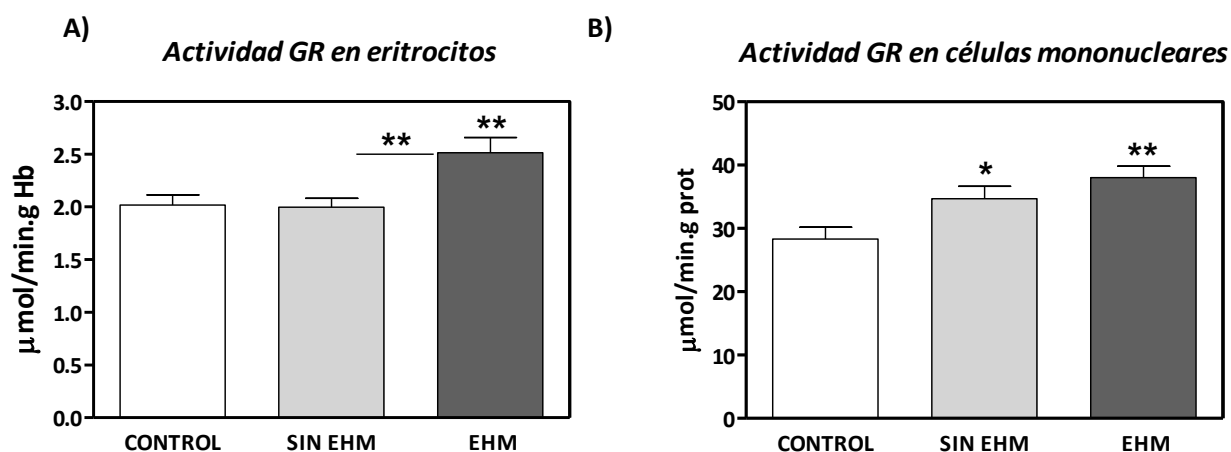


Figura 40. La actividad Glutación reductasa (GR) está aumentada en eritrocitos (A) y células mononucleares (B) en los pacientes con EHM. Los valores son la media  $\pm$  SEM del número de sujetos estudiados (controles  $n=27$ , sin EHM  $n=30$ , EHM  $n=19$ ). Los valores significativamente diferentes entre grupos se indican con asteriscos (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ).

### 3.2.1.5. Actividad Glutatión S-Transferasa (GST)

La glutatión S-transferasa conjuga el glutatión con otras biomoléculas dañinas para facilitar su eliminación.

En eritrocitos la actividad GST está aumentada un 25% en los pacientes cirróticos con EHM ( $3,5 \pm 0,2 \mu\text{mol}/\text{min.g Hb}$ ;  $p \leq 0,05$ ) y un 32% en los sin EHM ( $3,7 \pm 0,2 \mu\text{mol}/\text{min.g Hb}$ ;  $p \leq 0,01$ ) respecto a los controles ( $2,8 \pm 0,1 \mu\text{mol}/\text{min.g Hb}$ ). No existen diferencias entre cirróticos con y sin EHM (Figura 41A).

En células mononucleares, hay un aumento de la actividad GST de un 29% en pacientes con EHM ( $71 \pm 7 \mu\text{mol}/\text{min.g prot}$ ;  $p \leq 0,05$ ) y de un 31% en los sin EHM ( $72 \pm 4 \mu\text{mol}/\text{min.g prot}$ ;  $p \leq 0,01$ ) en comparación con los controles ( $55 \pm 2 \mu\text{mol}/\text{min.g prot}$ ). No existen diferencias entre pacientes con y sin EHM (Figura 41B).

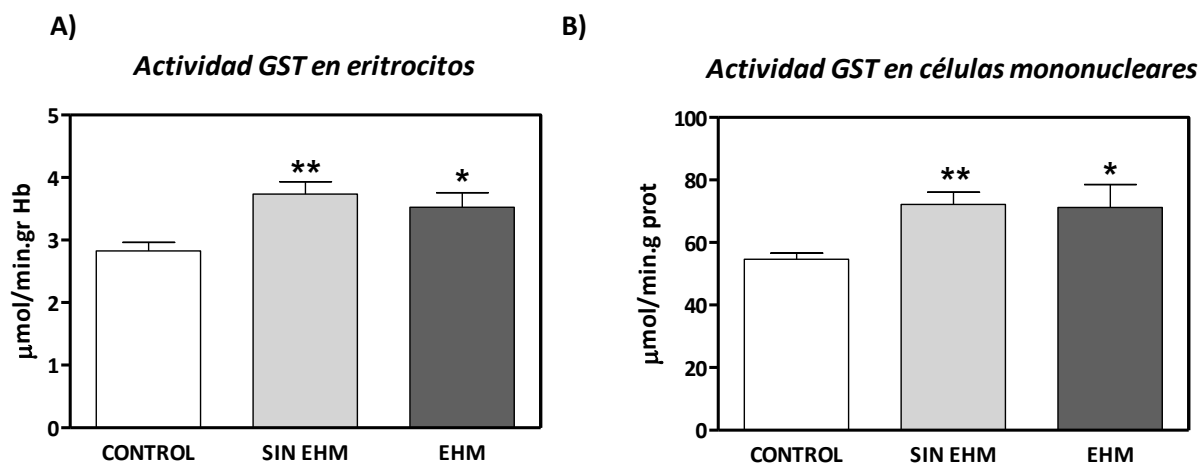


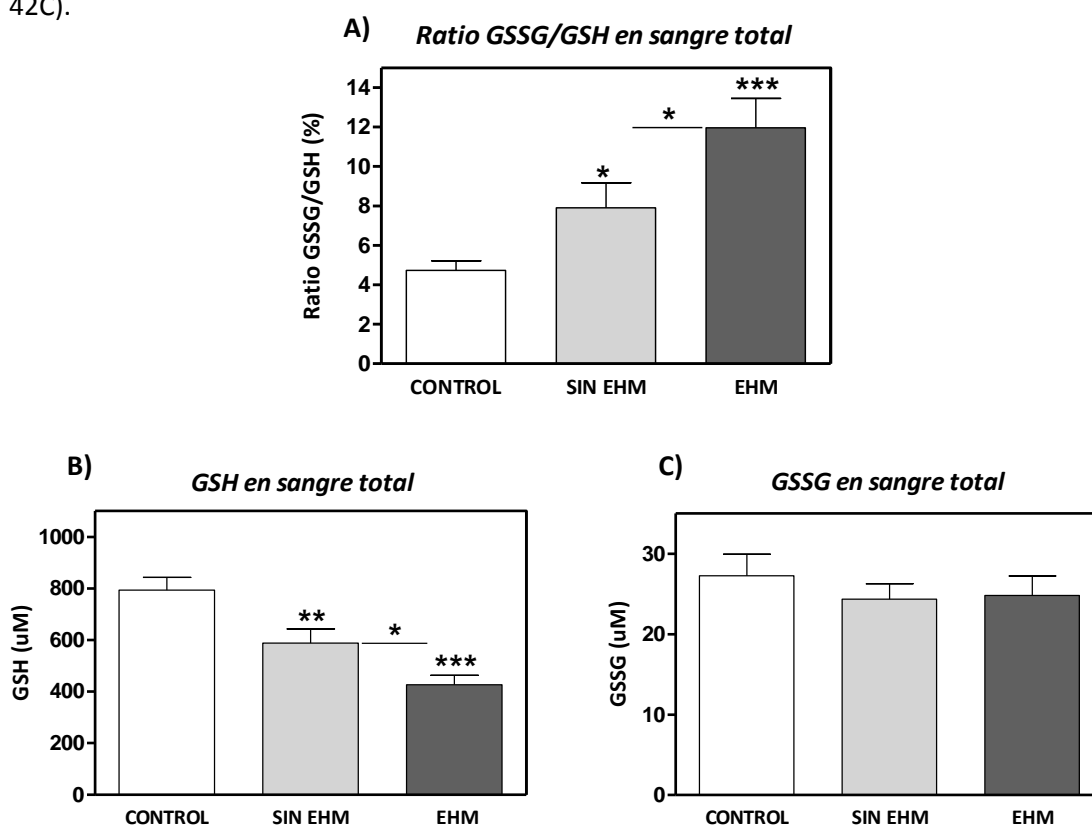
Figura 41. La actividad GST está aumentada en eritrocitos (A) y células mononucleares (B) en cirróticos con o sin EHM. Los valores son la media  $\pm$  SEM del número de sujetos estudiados (controles n=27, sin EHM n=30, EHM n=19). Los valores significativamente diferentes entre grupos se indican con asteriscos (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ).

### 3.2.2. Análisis del GSH: mecanismo antioxidante no enzimáticos

En condiciones fisiológicas la proporción de GSSG y GSH es del 10% y 90% respectivamente. En situaciones de estrés oxidativo esta proporción se altera, aumentando el GSSG y disminuyendo el GSH, por lo que el ratio GSSG/GSH es un buen indicador del estado redox del organismo.

Se midió el GSH y el GSSG en sangre total, y se calculó el ratio GSSG/GSH. Este ratio se da multiplicado por cien. El ratio GSSG/GSH está aumentado significativamente en los pacientes cirróticos con EHM ( $12,0 \pm 1,5$ ) comparado con los pacientes sin EHM ( $7,9 \pm 1,3$ ;  $p \leq 0,05$ ) y los controles ( $4,7 \pm 0,5$ ;  $p \leq 0,001$ ). Los pacientes sin EHM también muestran un aumento significativo frente a los controles ( $p \leq 0,05$ ) (Figura 42A).

En cuanto al GSH libre, hay una disminución en los pacientes con EHM ( $427 \pm 36 \mu\text{M}$ ) comparado con los pacientes sin EHM ( $588 \pm 55 \mu\text{M}$ ;  $p \leq 0,05$ ) y los controles ( $794 \pm 49 \mu\text{M}$ ;  $p \leq 0,001$ ). Entre los pacientes sin EHM y los controles también hay una disminución significativa ( $p \leq 0,01$ ) (Figura 42B). En el contenido de GSSG no encontramos diferencias significativas entre pacientes cirróticos con EHM ( $25 \pm 2 \mu\text{M}$ ), sin EHM ( $24 \pm 2 \mu\text{M}$ ) y controles ( $27 \pm 3 \mu\text{M}$ ) (Figura 42C).



**Figura 42. Los pacientes con EHM tienen el ratio GSSG/GSH aumentado y los niveles de GSH en sangre total disminuidos.** Los valores son la media  $\pm$  SEM del número de sujetos estudiados (controles  $n=23$ , SIN EHM  $n=23$ , EHM  $n=24$ ). Los valores significativamente diferentes entre grupos se indican con asteriscos (\* $p \leq 0,05$ ; \*\* $p \leq 0,01$ ; \*\*\* $p \leq 0,001$ ). El número de sujetos difiere del resto de medidas por disponibilidad de la muestra.

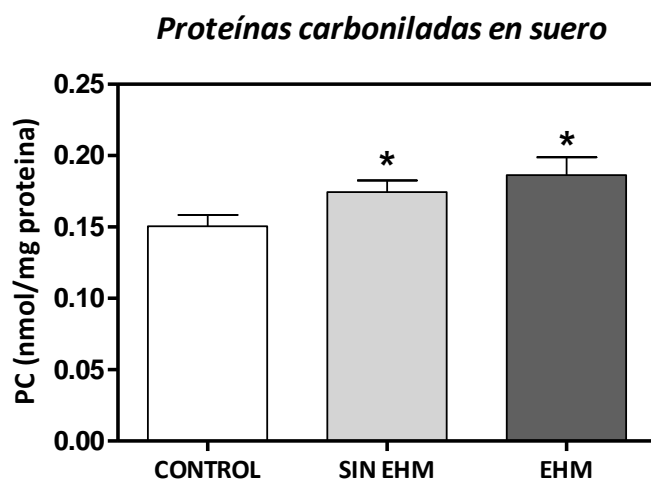
### 3.3. Daño oxidativo/nitrosativo en biomoléculas

El daño por estrés oxidativo/nitrosativo se puede producir en cualquiera de los principales tipos de biomoléculas: proteínas, ADN y lípidos.

#### 3.3.1. Carbonilación de proteínas

Una modificación de las proteínas producida por el estrés oxidativo es la carbonilación.

Existe un aumento significativo de las proteínas carboniladas (PC) en suero en los pacientes cirróticos con EHM ( $0,18 \pm 0,01$  nmol/mg prot;  $p \leq 0,05$ ) y sin EHM ( $0,174 \pm 0,008$  nmol/mg prot;  $p \leq 0,05$ ) respecto a los controles ( $0,150 \pm 0,008$ ), no habiendo diferencias de carbonilación entre pacientes sin y con EHM (Figura 43).



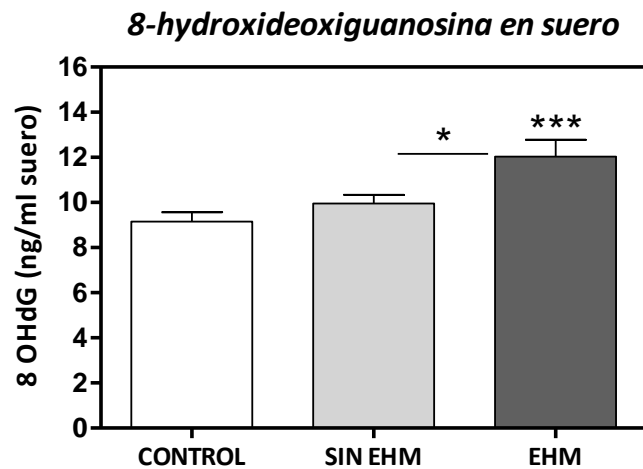
**Figura 43.** Los pacientes con o sin EHM tienen aumentada la carbonilación de las proteínas en suero. Los valores son la media  $\pm$  SEM del número de sujetos estudiados (controles  $n=34$ , sin EHM  $n=46$ , EHM  $n=34$ ). Los valores significativamente diferentes entre grupos se indican con asteriscos (\* $p < 0,05$ ).



### 3.3.2. Oxidación del ADN: 8-OHdG

Para analizar la oxidación del ADN utilizamos como marcador la 8-hidroxideoxiguanosina (8 OH-dG o 8-oxo-dG) en suero.

En los pacientes cirróticos con EHM hay un aumento significativo de 8 OH-dG ( $12 \pm 0,7$  ng/ml) respecto a los cirróticos sin EHM ( $9,9 \pm 0,4$  ng/ml;  $p \leq 0.05$ ) y, más marcado, respecto al grupo control ( $9,2 \pm 0,4$  ng/ml;  $p \leq 0.001$ ). Entre los pacientes sin EHM y los controles no existen diferencias (Figura 44).

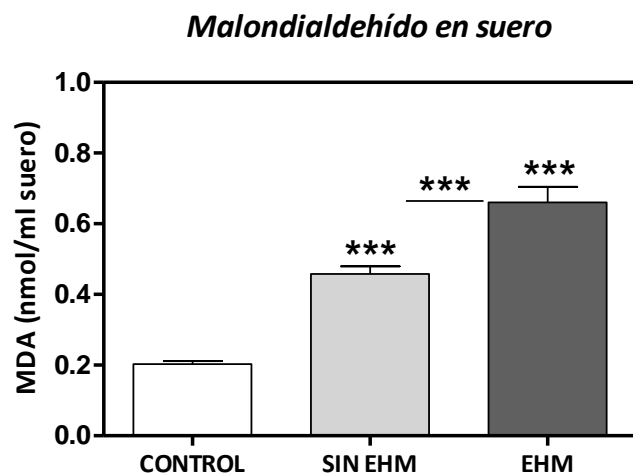


**Figura 44.** En los pacientes con EHM hay un aumento de 8-hidroxideoxiguanosina en suero. Los valores son la media  $\pm$  SEM del número de sujetos estudiados (controles  $n=34$ , sin EHM  $n=46$ , EHM  $n=34$ ). Los valores significativamente diferentes entre grupos se indican con asteriscos (\* $p < 0.05$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ).

### 3.3.3. Oxidación de lípidos: MDA

Para medir la oxidación de los lípidos se utilizó como marcador el malondialdehído (MDA) en suero.

En los pacientes con EHM hay un aumento marcado de los niveles de MDA en suero ( $0,66 \pm 0,04$  nmol/ml) en comparación con los pacientes sin EHM ( $0,46 \pm 0,02$  nmol/ml;  $p \leq 0,001$ ) y los controles ( $0,203 \pm 0,008$  nmol/ml;  $p \leq 0,001$ ). Los pacientes sin EHM también tienen niveles aumentados significativamente respecto a los controles ( $p \leq 0,001$ ) (Figura 45).



**Figura 45. En los pacientes con EHM hay un aumento en la oxidación de lípidos en suero.** Los valores son la media  $\pm$  SEM del número de sujetos estudiados (controles n=34, sin EHM n=46, EHM n=34). Los valores significativamente diferentes entre grupos se indican con asteriscos (\*\*\*) ( $p < 0,001$ ).

## 4. Correlación entre inflamación, estrés oxidativo y alteraciones neurológicas en pacientes con EHM

### 4.1. Inflamación (IL-6 e IL-18) e Hiperamonemia

Los niveles séricos de las citocinas proinflamatorias IL-6 e IL-18 y los niveles de amonio en sangre en los pacientes cirróticos se correlación con algunas alteraciones cognitivas y/o motoras en los pacientes con EHM (Tabla 10).

Los pacientes con niveles más elevados de IL-6 e IL-18 y amonio, muestran una menor puntuación global en la batería de tests *PHES*, que es la que determina si un paciente con cirrosis hepática tiene EHM. De los 5 tests que componen la batería *PHES*, los niveles de IL-6, IL-18 y amonio correlacionan especialmente con los resultados en el test *NCT-B*, que evalúa la velocidad de procesamiento mental y la atención. El aumento de la IL-6 e IL-18 también se correlaciona con una disminución de: 1) la velocidad de procesamiento y la flexibilidad cognitiva evaluadas mediante el test *Stroop* (tarea congruente); 2) la atención selectiva/sostenida y la concentración mental evaluadas mediante el test *d2*, y 3) la capacidad de realización del test *oral de Claves* que evalúa velocidad de procesamiento y atención selectiva.

Por otra parte, el aumento en la IL-18 correlaciona con una disminución en la memoria de trabajo estudiada con el test *oral de Letras y Números* y, los niveles aumentados de amonio, con un déficit en la atención selectiva y memoria de trabajo evaluadas mediante el test *oral de Dígitos* (Tabla 10).

A nivel motor, el aumento de IL-6 e IL-18 correlaciona con una disminución de la coordinación bimanual y visuomotora, aumentando el tiempo de ejecución de la tarea. La hiperamonemia correlaciona únicamente con la visuomotora (Tabla 9). Por otra parte, sólo el aumento de IL-6 y de amonio correlaciona con una disminución de la coordinación visuoespacial medida con el test *SD* de la batería *PHES* (Tabla 10).

Tabla 10. Correlaciones entre inflamación ó hiperamonemia y alteraciones neurológicas

TEST	IL-6 (pg/ml)	IL-18 (pg/ml)	AMONIO (μM)
<b>PHES</b>	r = -0,501 p < 0,001	r = -0,424 p < 0,001	r = -0,400 p < 0,001
<b>NCT-B</b>	r = -0,411 p < 0,001	r = -0,444 p < 0,001	r = -0,404 p < 0,001
<b>SD</b>	r = -0,437 p < 0,001	Ns	r = -0,323 p = 0,004
<b>Test Stroop (tarea congruente)</b>	r = -0,371 p = 0,001	r = -0,391 p = 0,002	ns
<b>Test d2_TR (Pc)</b>	r = -0,461 p < 0,001	r = -0,596 p < 0,001	ns
<b>TA (Pc)</b>	r = -0,390 p < 0,001	r = -0,529 p < 0,001	ns
<b>TOT (Pc)</b>	r = -0,412 p < 0,001	r = -0,547 p < 0,001	ns
<b>CON (Pc)</b>	r = -0,354 p = 0,001	r = -0,493 p < 0,001	ns
<b>Test oral de Claves (Nº Total)</b>	ns	r = -0,530 p < 0,001	ns
<b>Test oral de Dígitos Total</b>	ns	Ns	r = -0,384 p = 0,002
<b>Test oral de Letras y Números</b>	ns	r = -0,378 p = 0,007	ns
<b>Coordinación Bimanual (centésimas minuto)</b>	r = 0,458 p < 0,001	r = 0,487 p < 0,001	ns
<b>Coordinación Visuomotora (centésimas minuto)</b>	r = 0,534 p < 0,001	r = 0,535 p < 0,001	r = 0,390 p < 0,001

El número de sujetos incluido en el análisis de correlación (test de correlación de Perason) es de 34 controles, 46 cirróticos sin EHM y 34 con EHM para todos los tests excepto en el test oral de Claves, Dígitos y Letras y Números, en el que se incluyen 17 controles, 35 cirróticos sin EHM y 29 EHM. (PHES, 'Psychometric Hepatic Encephalopathy Score'; NCT-B, test de conexión numérica B; SD, puntos seriados; TR, total de respuestas; TA, total de aciertos; CON, concentración; Pc, percentil).

## 4.2. Daño oxidativo/nitrosativo de biomoléculas

Algunos marcadores de daño oxidativo/nitrosativo en sangre, se correlacionan con déficits cognitivos (Tabla 11) y motores en los pacientes.

Tanto la disminución del Glutatió reducido (GSH) como el aumento de la 3-nitrotirosina (3-NT), del ratio GSSG/GSH y del malondealdehído (MDA) se correlacionan con:

- 1) Una disminución en la puntuación total en la batería *PHES*
- 2) Una disminución de la velocidad de procesamiento y la flexibilidad cognitiva evaluadas mediante el *test Stroop*
- 3) Una disminución en la atención selectiva/sostenida y la concentración mental evaluadas mediante el *test d2*
- 4) Una peor realización del *test oral de Claves* que evalúa velocidad de procesamiento y atención selectiva
- 5) Una disminución en la memoria de trabajo analizada con el *test oral de Letras y Números* y un déficit en la atención selectiva y memoria de trabajo evaluadas mediante el *test oral de Dígitos* (Tabla 11).

El aumento de 3-Nitrotirosina, del ratio GSSG/GSH y del MDA se correlacionan con una disminución en la velocidad de procesamiento y en la atención (*tests NCT-A y NCT-B*).

La disminución de la coordinación bimanual y de la visuomotora se correlaciona con el aumento de la 3-Nitrotirosina y del MDA. La disminución del GSH y el aumento del ratio GSSG/GSH correlacionan con una disminución en el percentil de la población en el que se encuentran los sujetos en las tareas de coordinación bimanual y visuomotora. Por otra parte, la disminución de la coordinación visuoespacial (*test LTT* de la batería *PHES*) se correlaciona con un aumento de la 3-Nitrotirosina, del ratio GSSG/GSH y del MDA y, una disminución del GSH (Tabla 11).

También existe una correlación entre (Tabla 12):

- 1) el aumento de 3-NT y el aumento de IL-6 e IL-18;
- 2) la disminución del GSH y el aumento de IL-6, IL-18 y la hiperamonemia
- 3) el aumento del ratio GSSG/GSH y el de IL-6, del amonio y del GMPc
- 4) el aumento de MDA y el aumento de IL-6, IL-18, del amonio y del GMPc .

Tabla 11. Correlaciones entre daño oxidativo de biomoléculas y alteraciones neurológicas

TEST	3-NT ( $\mu\text{M}$ )	GSH ( $\mu\text{M}$ )	GSSG/GSH(%)	MDA (nmol/ml)
<b>PHES</b>	r=-0,518 p<0,001	r= 0,428 p=0,001	r= -0,419 p=0,001	r=-0,566 p<0,001
<b>NCT-A</b>	ns	ns	r=-0,396 p=0,002	r=-0,453 p<0,001
<b>NCT-B</b>	r=-0,421 p<0,001	ns	Ns	r=-0,539 p<0,001
<b>LTT</b>	r=-0,559 p<0,001	r=0,438 p<0,001	r=-0,374 p=0,003	r=-0,419 p<0,001
<b>Stroop (congruente)</b>	r=-0,358 p=0,002	r= 0,437 p=0,001	r=-0,510 p<0,001	r=-0,493 p<0,001
<b>Stroop (incongruente)</b>	ns	ns	Ns	r=-0,405 p<0,001
<b>Test d2_TR (Pc)</b>	r=-0,378 p=0,001	r=0,484 p<0,001	r= -0,461 p=0,001	r=-0,536 p<0,001
<b>TA (Pc)</b>	r=-0,385 p=0,001	r=0,444 p=0,001	r= -0,471 p=0,001	r=-0,541 p<0,001
<b>TOT (Pc)</b>	r=-0,392 p=0,001	r=0,474 p<0,001	r=-0,477 p<0,001	r=-0,536 p<0,001
<b>CON (Pc)</b>	r=-0,395 p=0,001	r=0,424 p=0,001	r= -0,437 p=0,002	r=-0,530 p<0,001
<b>Claves (oral) Total</b>	r=-0,374 p=0,004	r=0,432 p=0,001	r= -0,336 p=0,012	r=-0,667 p<0,001
<b>Dígitos (oral) Directo</b>	ns	r=0,406 p=0,002	ns	r=-0,395 p=0,001
<b>Dígitos (oral) Inverso</b>	r=-0,360 p=0,006	r=0,454 p<0,001	ns	r=-0,482 p<0,001
<b>Dígitos (oral) Total</b>	r=-0,344 p=0,006	r=0,502 p<0,001	r= -0,356 p=0,008	r=-0,516 p<0,001
<b>Letras y Núm (oral)</b>	ns	r=0,398 p<0,001	ns	r=-0,634 p<0,001
<b>Coord. Bimanual (centésimas minuto)</b>	r=0,362 p=0,002	ns	ns	r=0,633 p<0,001
<b>Coord. Bimanual (Pc poblacional)</b>	ns	r=0,389 p=0,003	r=-0,384 p=0,004	Ns
<b>Coord. Visuomotora (centésimas minuto)</b>	r=0,340 p=0,004	Ns	ns	r=0,706 p<0,001
<b>Coord. Visuomotora (Pc poblacional)</b>	ns	r=0,498 p<0,001	r=-0,395 p=0,003	Ns

El número de sujetos incluido en el análisis de correlación (test de correlación de Perason) es de 34 controles, 46 cirróticos sin EHM y 34 con EHM para todos los tests excepto en el test oral de Claves, Dígitos y Letras y Números, en el que se incluyen 17 controles, 35 cirróticos sin EHM y 29 EHM. (PHES, 'Psychometric Hepatic Encephalopathy Score'; NCT-A/NCT-B, test de conexión numérica A/B; LTT, test de línea quebrada; TR, total de respuestas; TA, total de aciertos; CON, concentración; Pc, percentil).

Los biomarcadores de daño oxidativo/nitrosativo también se correlacionan entre sí. Cuando disminuye el GSH aumenta la 3-Nitrotirosina, el ratio GSSG/GSH, la 8-OH-dG y el MDA. El aumento en el ratio GSSG/GSH también correlaciona con el aumento del GSSG, aunque la correlación con la disminución del GSH es mucho mayor, indicando que la contribución de la disminución de los niveles de GSH al aumento de dicho ratio es mayor. El aumento en la 8-OH-dG correlaciona con una disminución del GSH y un aumento del ratio GSSG/GSH y del MDA. El aumento de MDA también se correlaciona con un aumento de 3-NT, del ratio GSSG/GSH (Tabla 12).

**Tabla 12. Correlaciones entre biomarcadores de daño oxidativo de biomoléculas, inflamación e hiperamonemia**

BIOMARCADOR	3-NT ( $\mu\text{M}$ )	GSH ( $\mu\text{M}$ )	GSSG/GSH(%)	MDA (nmol/ml)
<b>3-NT (<math>\mu\text{M}</math>)</b>	-	-	-	r=0,438 p<0,001
<b>GSH (<math>\mu\text{M}</math>)</b>	r=-0,423 p=0,004	-	r=-0,700 p<0,001	r=-0,437 p=0,001
<b>GSSG (<math>\mu\text{M}</math>)</b>	ns	Ns	r=0,377 p=0,004	ns
<b>GSSG/GSH(%)</b>	ns	-	-	r=0,369 p=0,009
<b>8-OH-dG (ng/ml)</b>	ns	r=-0,492 p<0,001	r=0,384 p=0,003	r=0,378 p<0,001
<b>IL-6 (pg/ml)</b>	r=0,391 p<0,001	r=-0,463 p<0,001	r=0,486 p<0,001	r=0,521 p<0,001
<b>IL-18 (pg/ml)</b>	r=0,389 p=0,002	r=-0,391 p=0,011	ns	r=0,543 p<0,001
<b>Amonio (<math>\mu\text{M}</math>)</b>	ns	r=-0,490 p<0,001	r=0,451 p=0,001	r=0,450 p<0,001
<b>GMPc (pg/ml)</b>	ns		r=0,501 p<0,001	r=0,441 p<0,001

El número de sujetos incluido en el análisis de correlación (test de correlación de Perason) es de 34 controles, 46 cirróticos sin EHM y 34 con EHM para todos los tests excepto en el test oral de Claves, Dígitos y Letras y Números, en el que se incluyen 17 controles, 35 cirróticos sin EHM y 29 EHM. (3-NT, 3-Nitrotirosina; GSH, Glutación reducido; GSSG, Glutación oxidado; 8-OH-dG, 8-hidroxideoxiguanosina)

### 4.3. Correlación de las actividades de las enzimas antioxidantes con las alteraciones neurológicas, inflamación e hiperamonemia

#### 4.3.1. Actividad de las enzimas antioxidantes en eritrocitos

En eritrocitos aislados, las actividades de la Glutación Peroxidasa (GPx) y la Glutación Reductasa (GR) se correlacionan con alteraciones neurológicas en los pacientes. Un aumento en la actividad de estas enzimas correlaciona con: una menor puntuación total en la batería PHEs, el deterioro en la coordinación motora (enlentecimiento motor) y en la atención selectiva/sostenida y la concentración mental evaluadas mediante el *test d2* (Tabla 13).

Las actividades en eritrocitos de las otras enzimas analizadas (Catalasa, Superóxido Dismutasa y Glutación S-Transferasa) no se correlacionan con las alteraciones neurológicas.

**Tabla 13. Correlaciones entre las actividades de la Glutación Reductasa y la Glutación Peroxidasa en eritrocitos y las alteraciones neurológicas, inflamación e hiperamonemia**

PARÁMETROS	Glutación Reductasa ( $\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{gr Hb}$ )	Glutación Peroxidasa ( $\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{gr Hb}$ )
<b>TESTS NEURÓLOGICOS</b>		
<b>PHEs</b>	$r=-0,370$ $p=0,005$	$r=-0,347$ $p=0,009$
<b>Test d2_TR</b>	$r=-0,348$ $p=0,011$	$r=-0,465$ $p<0,001$
<b>TA</b>	ns	$r=-0,457$ $p=0,001$
<b>TOT</b>	$r=-0,329$ $p=0,016$	$r=-0,465$ $p<0,001$
<b>CON</b>	$r=-0,314$ $p=0,022$	$r=-0,440$ $p=0,001$
<b>Coordinación Bimanual (centésimas minuto)</b>	$r=0,436$ $p=0,001$	$r=0,445$ $p=0,001$
<b>Coordinación Visuomotora (centésimas minuto)</b>	$r=0,420$ $p=0,002$	$r=0,533$ $p<0,001$
<b>PARÁMETROS BIOQUÍMICOS</b>		
<b>IL-6 (pg/ml)</b>	$r=0,478$ $p<0,001$	ns
<b>IL-18 (pg/ml)</b>	$r=0,487$ $p<0,001$	$r=0,486$ $p<0,001$
<b>Amonio (<math>\mu\text{M}</math>)</b>	$r=0,420$ $p=0,003$	ns
<b>GMPc (pg/ml)</b>	ns	$r=0,365$ $p=0,003$

El número de sujetos incluido en el análisis de correlación (test de correlación de Pearson) es de 34 controles, 46 cirróticos sin EHM y 34 con EHM. (PHEs, 'Psychometric Hepatic Encephalopathy Score'; TR, total de respuestas; TA, total de aciertos; CON, concentración)



El aumento de la actividad GR en eritrocitos también se correlaciona con la inflamación, medida por el aumento de los niveles séricos de las citocinas proinflamatorias IL-6 e IL-18 y, con la hiperamonemia. El aumento en la actividad GPx se correlaciona con la inflamación, principalmente con el aumento de IL-18, y con el aumento de GMPC plasmático (Tabla 13).

En cuanto a los marcadores de estrés oxidativo/nitrosativo, únicamente encontramos correlación entre el aumento del MDA con el aumento de la actividad GR ( $r=0,371$ ;  $p=0,003$ ) y de la actividad GPx ( $r=0,467$ ;  $p<0,001$ ).

Por otra parte, las actividades de diferentes enzimas antioxidantes se correlacionan entre sí: el aumento en la actividad GR se correlaciona con el aumento de la actividad Catalasa ( $r=0,470$ ;  $p<0,001$ ) y de la SOD ( $r=0,485$ ;  $p=0,002$ ). También existe una correlación entre el aumento de la actividad Catalasa y de la SOD ( $r=0,549$ ;  $p<0,001$ ).

#### 4.3.2. Actividad de las enzimas antioxidantes en células mononucleares

En células mononucleares el aumento de la actividad de la Catalasa, Glutathión Reductasa (GR) y Glutathión Peroxidasa (GPx) se correlaciona con alteraciones neurológicas en los pacientes.

El aumento en la actividad Catalasa se correlaciona con una disminución en la velocidad de procesamiento y atención, medida por la disminución en la puntuación del *test NCT-B* de la batería *PHES* ( $r=-0,365$ ;  $p=0,007$ ), y con alteración de la coordinación motora medida por el enlentecimiento visuomotor (centésimas de minuto:  $r=0,385$ ;  $p=0,005$ ).

El aumento de la actividad GR se correlaciona con una disminución en la memoria de trabajo evaluada con el *test oral de Letras y Números* (nº de aciertos:  $r=-0,466$ ;  $p=0,011$ ).

Por último, el aumento en la actividad GPx se correlaciona con disminuciones en (Tabla 14):

- 1) el procesamiento de señales visuales (alteración cortical) medido con la *Frecuencia Crítica de Parpadeo (FCP)*
- 2) la puntuación total de la batería *PHES*
- 3) una disminución en la velocidad de procesamiento y atención (*test NCT-B*)
- 4) en la coordinación visuoespacial (*tests SD y LTT* de la batería *PHES*)
- 5) en la coordinación motora bimanual y visuomotora
- 6) en la concentración mental evaluadas mediante el *test d2*.

**Tabla 14. Correlaciones entre la actividad Glutación Peroxidasa en células mononucleares y la capacidad para realizar algunos tests**

TESTS	GPx ( $\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{gr Hb}$ )
FCP (Hz)	r=-0,434 p=0,005
PHES	r=-0,509 p<0,001
NCT-B	r=-0,401 p=0,006
SD	r=-0,460 p=0,001
LTT	r=-0,389 p=0,005
Test Bimanual (centésimas minuto)	r=0,513 p<0,001
Test Visuomotor (centésimas minuto)	r=0,549 p<0,001
Test d2_CON	r=-0,365 p=0,013

El número de sujetos incluido en el análisis de correlación (test de correlación de Pearson) es de 34 controles, 46 cirróticos sin EHM y 34 con EHM. (PHES, 'Psychometric Hepatic Encephalopathy Score'; NCT-A/NCT-B, test de conexión numérica B; LTT, test de línea quebrada; SD, puntos seriados; CON, concentración).

En cuanto a los parámetros bioquímicos, el aumento de los nitritos en plasma correlaciona con el aumento de la actividad de la Catalasa ( $r=0,405$ ;  $p=0,001$ ) y de la SOD ( $r=0,342$ ;  $p=0,004$ ). Por otra parte, el aumento de los niveles de GMPC en plasma correlaciona con un aumento de la actividad de la GR ( $r=0,345$ ;  $p=0,010$ ) y de la actividad GPx ( $r=0,384$ ;  $p=0,003$ ).

El aumento en el MDA, indicador de oxidación lipídica correlaciona con el aumento de la actividad Catalasa ( $r=0,387$ ;  $p=0,001$ ) y GPx ( $r=0,444$ ;  $p<0,001$ ) y, en menor medida, con la actividad GR ( $r=0,338$ ;  $p=0,011$ ) y Glutación S-Transferasa ( $r=0,346$ ;  $p=0,011$ ).

Por otra parte, las actividades de diferentes enzimas antioxidantes se correlacionan entre sí: el aumento en la actividad de la GR correlaciona con el de la Catalasa ( $r=0,368$ ;  $p=0,011$ ) y de la Glutación S-Transferasa ( $r=0,456$ ;  $p=0,001$ ) y, el aumento en la actividad GPx correlaciona con el de la Catalasa ( $r=0,382$ ;  $p=0,007$ ) y con la GR ( $r=0,420$ ;  $p=0,003$ ).

## 5. Estudio del estrés oxidativo/nitrosativo mediante citometría de flujo

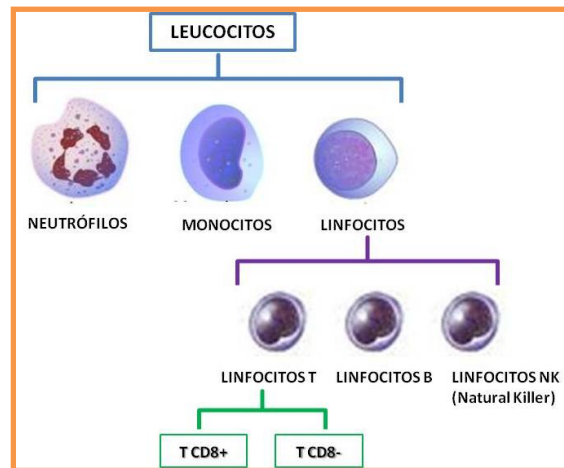
Se realizó un amplio estudio mediante citometría de flujo de las especies reactivas del oxígeno/nitrógeno y otros parámetros indicativos de estrés oxidativo/nitrosativo (como el potencial de membrana mitocondrial) en diversas poblaciones celulares de la serie blanca obtenidas a partir de sangre de los controles y pacientes.

Los parámetros estudiados en los distintos tipos celulares de los sujetos fueron:

- Superóxido celular: con el fluorocromo hidroetidina (HE)
- Superóxido mitocondrial: con el fluorocromo MitoSox (MTX)
- Peróxidos y peroxinitrito: con el fluorocromo dihidrorodamina (DHR)
- Especies reactivas del oxígeno (ROS), principalmente  $H_2O_2$ : con el fluorocromo diclorofluoresceína (DCF)
- Tioles reducidos (esencialmente GSH): con el fluorocromo 5-clorometilfluoresceína (CMF)
- Óxido nítrico: con el fluorocromo diaminofluoresceína (DAF)
- Potencial de membrana mitocondrial: con el fluorocromo tetrametilrodamina (TMRM)

Las subpoblaciones celulares de la serie blanca estudiadas fueron (Figura 46):

- Leucocitos
- Neutrófilos
- Monocitos
- Linfocitos T
- Linfocitos T CD8+
- Linfocitos T CD4+ (CD8-)
- Linfocitos B
- Linfocitos totales (T, B y NK)



**Figura 46. Esquema de las subpoblaciones leucocitarias**

En primer lugar, se analizaron los niveles basales de los parámetros de estrés oxidativo/nitrosativo en cada subpoblación celular. Posteriormente, se indujo la producción de algunos radicales y se analizó la respuesta de la célula a esta inducción, mediante el cálculo del ratio del nivel de cada parámetro tras la inducción respecto a su nivel basal.

##### 5.1. Peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ )

Los niveles de especies reactivas del oxígeno en general (ROS), principalmente  $H_2O_2$  se estudian mediante la fluorescencia emitida al reaccionar con la diclorofluoresceína (DCF) cuando ésta entra en la célula.

Los niveles basales de  $H_2O_2$  se encuentran aumentados significativamente en pacientes con EHM respecto a los controles en Leucocitos, Neutrófilos, Linfocitos T CD8+ y CD4+. En el resto de poblaciones celulares (Monocitos, Linfocitos T, B y totales) existe una tendencia al aumento en pacientes con EHM pero las diferencias no son significativas. Los pacientes con EHM tienen aumentados los niveles basales de  $H_2O_2$  respecto a los pacientes sin EHM en Neutrófilos.

En los pacientes sin EHM existe una tendencia al aumento de  $H_2O_2$  en comparación con los controles en Leucocitos, Neutrófilos, Monocitos, Linfocitos T CD4+, aunque la diferencia no es significativa (Tabla 15 y Figura 47).

La adición de la Plumbagina, que genera un aumento de superóxido, aumenta la fluorescencia en los controles y ambos grupos de pacientes en todas las poblaciones celulares, excepto en los Linfocitos T CD8+ y CD4+, en los cuales solo aumenta en los pacientes con EHM y en los Linfocitos B en los cuales no aumenta en los pacientes sin EHM (Tabla 15 y Figura 47).

Para estudiar la respuesta de los niveles de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) en la célula a un aumento de anión superóxido generado por la Plumbagina, se calculó el ratio entre los niveles de fluorescencia de DCF tras adición de Plumbagina y los basales. Este ratio, que mide el aumento de  $H_2O_2$  inducido como consecuencia del aumento de superóxido inducido por la Plumbagina, está aumentado significativamente en los pacientes con EHM respecto a los controles en Leucocitos, Neutrófilos, Monocitos, Linfocitos T, Linfocitos T CD8+ y CD4+, mientras que en Linfocitos B y totales hay una tendencia al aumento sin diferencias significativas. Existe un aumento significativo en el ratio en pacientes con EHM respecto a los pacientes sin EHM en Leucocitos, Neutrófilos, Monocitos y Linfocitos T CD8+.

En los pacientes sin EHM existe una tendencia al aumento de dicho ratio en comparación con los controles en Neutrófilos, Linfocitos T CD4+, Linfocitos B y totales, aunque las diferencias no son significativas (Tabla 16 y Figura 48).

Tabla 15. Niveles de peróxido de hidrógeno en condiciones basales y tras adición de Plumbagina en las diferentes poblaciones celulares

Población celular		CONTROL	SIN EHM	EHM	SIN EHM vs EHM
		Intensidad de fluorescencia (I.F) de DCF			
Leucocitos	basal	15 ± 2	21 ± 3	24 ± 2 <sup>a</sup>	ns
	Pb	105 ± 19***	147 ± 25***	264 ± 20***, bbb	p<0,001
Neutrófilos	basal	17 ± 2	20 ± 4	33 ± 5 <sup>a</sup>	p<0,05
	Pb	119 ± 19***	160 ± 38***	429 ± 38***, bbb	p<0,001
Monocitos	basal	20 ± 4	29 ± 5	29 ± 5	ns
	Pb	36 ± 7*	55 ± 9*	113 ± 24***, b	ns
Linfocitos T	basal	7 ± 1	8 ± 1	11 ± 2	ns
	Pb	11 ± 1**	14 ± 2**	24 ± 3***, bb	p<0,05
Linfocitos T CD8+	basal	6 ± 1	9 ± 1	12 ± 2 <sup>a</sup>	ns
	Pb	6,6 ± 0,7	12 ± 2	23 ± 3***, bbb	p<0,01
Linfocitos T CD4+	basal	6 ± 1	11 ± 2	12 ± 2 <sup>a</sup>	ns
	Pb	8,4 ± 0,8	23 ± 6 <sup>b</sup>	26 ± 3***, bb	ns
Linfocitos B	basal	13 ± 1	16 ± 2	15 ± 3	ns
	Pb	18 ± 1**	26 ± 6	30 ± 4**	ns
Linfocitos totales	basal	7 ± 1	10 ± 1	12 ± 2	ns
	Pb	13 ± 2*	21 ± 5*	32 ± 5***, b	ns

Se muestra la intensidad de fluorescencia de diclorofluoresceína (DCF) en condiciones basales y tras adición de Plumbagina 10 ng/ml (Pb). Los datos son los mismos representados en la Figura 47. Los valores son la media ± SEM del número de sujetos estudiados (control n=19, sin EHM n=22, EHM n=28). Los valores significativamente diferentes tras la adición de Pb y sus basales se indican con asteriscos (\*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001). Los valores significativamente diferentes entre basales de los grupos de pacientes comparados con los de los controles se indican con 'a' (<sup>a</sup>p<0,05) y las diferencias significativas tras la adición de Pb entre los pacientes y los controles se indican con 'b' (<sup>b</sup>p<0,05; <sup>bb</sup>p<0,01; <sup>bbb</sup>p<0,001).

PERÓXIDO DE HIDRÓGENO

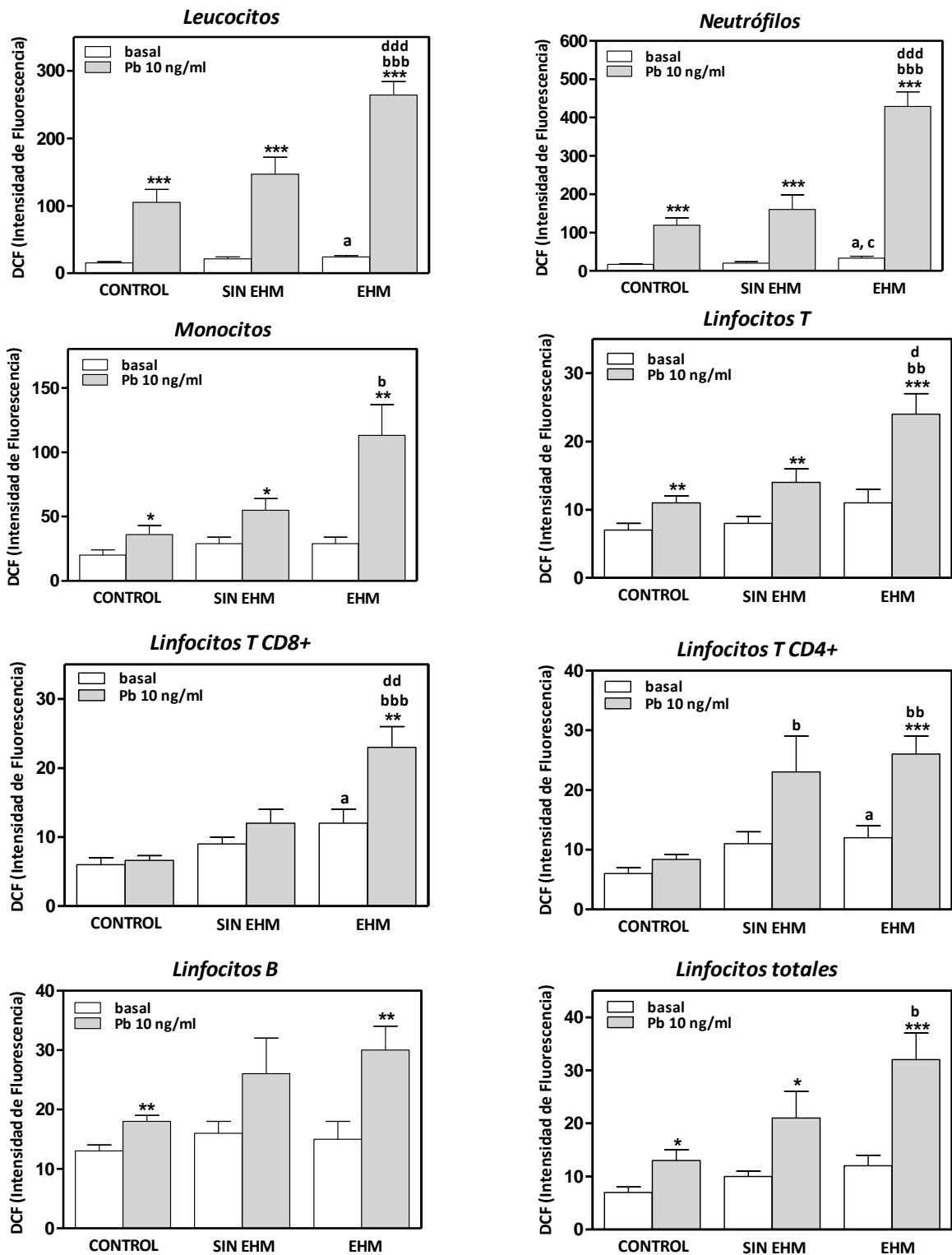


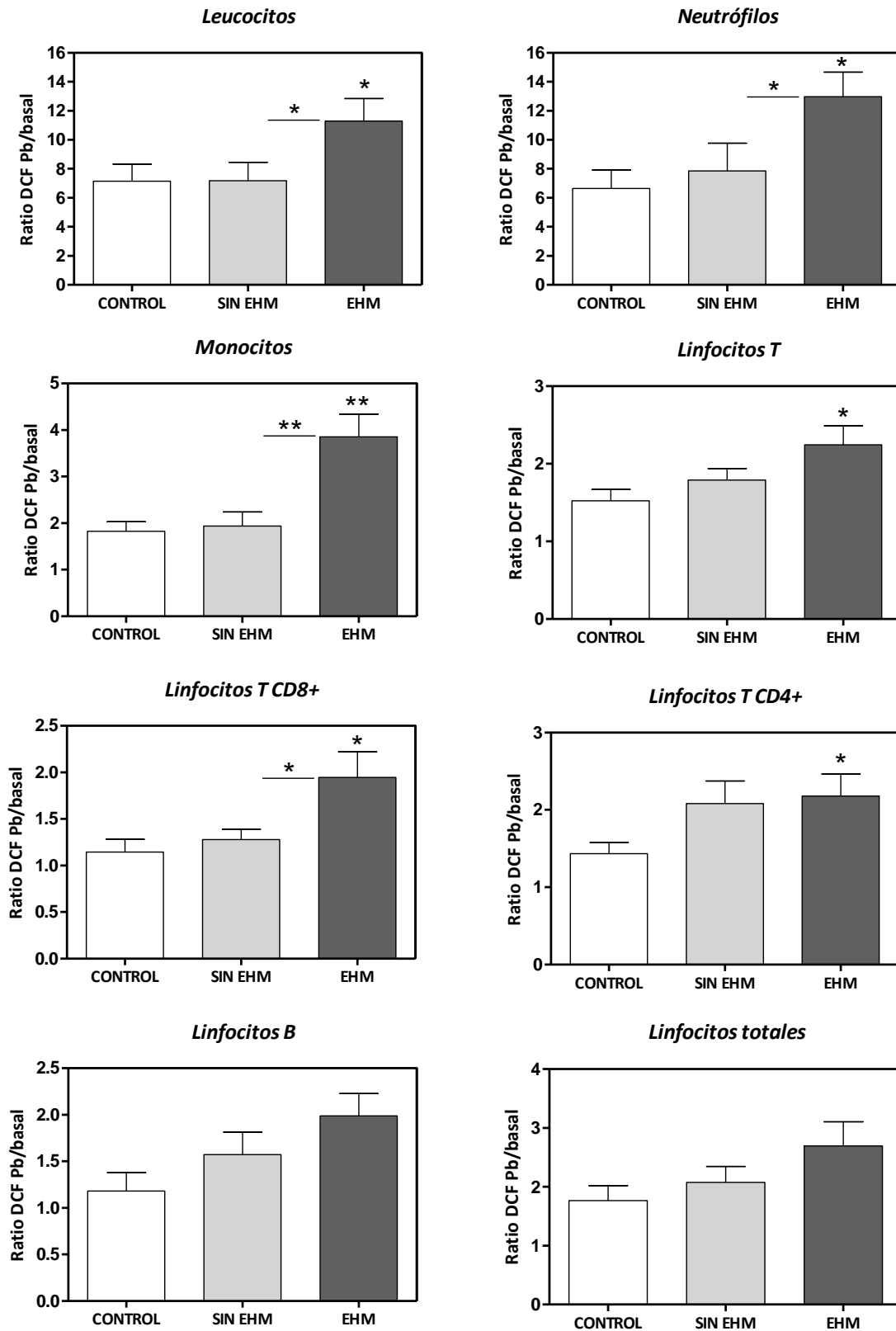
Figura 47. Niveles de peróxido de hidrógeno en condiciones basales y tras adición de Plumbagina en los distintos tipos celulares. Se muestra la intensidad de fluorescencia (I.F.) de diclorofluoresceína (DCF) en condiciones basales (barras blancas) y tras la adición de Pb 10 ng/ml (barras grises) en las poblaciones celulares estudiadas. Los valores son la media  $\pm$  SEM del número de sujetos estudiados (control n=19, sin EHM n=22, EHM n=28). Los valores significativamente diferentes entre I.F. basal y tras adición de Pb en el mismo grupo de sujetos se indican con asteriscos; entre I.F. basal en pacientes respecto a controles con 'a'; entre I.F. y tras adición de Pb en pacientes respecto a controles con 'b'; entre I.F. basal de pacientes con y sin EHM con 'c'; entre I.F. y tras adición de Pb de pacientes con y sin EHM con 'd' (\*,a,b,c,d  $p < 0,05$ ; \*\*,aa,bb,cc,dd  $p < 0,01$ ; \*\*\*,aaa,bbb,ccc,ddd  $p < 0,001$ ).

Tabla 16. Aumento del peróxido de hidrógeno inducido por Plumbagina en las diferentes poblaciones celulares

Población celular	CONTROL	SIN EHM	EHM	SIN EHM vs EHM
	Ratio DCF Pb/basal			
Leucocitos	7 ± 1	7 ± 1	11 ± 2*	p<0,05
Neutrófilos	7 ± 1	8 ± 2	13 ± 2*	p<0,05
Monocitos	1,8 ± 0,2	1,9 ± 0,3	3,9 ± 0,5**	p<0,01
Linfocitos T	1,5 ± 0,1	1,8 ± 0,1	2,2 ± 0,2*	ns
Linfocitos T CD8+	1,1 ± 0,1	1,3 ± 0,1	1,9 ± 0,3*	p<0,05
Linfocitos T CD4+	1,4 ± 0,1	2,1 ± 0,3	2,2 ± 0,3*	ns
Linfocitos B	1,2 ± 0,2	1,6 ± 0,2	2,0 ± 0,2	ns
Linfocitos totales	1,8 ± 0,3	2,1 ± 0,3	2,7 ± 0,4	ns

Se muestra el ratio entre los niveles de fluorescencia de la diclorofluoresceína (DCF) tras adición de plumbagina (Pb) 10 ng/ml y los basales. Los datos son los mismos representados en la Figura 48. Los valores son la media ± SEM del número de sujetos estudiados (control n=19, sin EHM n=22, EHM n=28). Los valores significativamente diferentes de los controles se indican con asteriscos (\*p<0,05; \*\*p<0,01).

PERÓXIDO DE HIDRÓGENO



**Figura 48. Aumento de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> inducido por Plumbagina (Pb) en distintos tipos celulares.** Se muestra el ratio entre la intensidad de fluorescencia de la Diclorofluoresceína (DCF) tras adición de Pb 10 ng/ml y en condiciones basales en las poblaciones celulares estudiadas. Los valores son la media ± SEM del número de sujetos estudiados (control n=19, sin EHM n=22, EHM n=28). Los valores significativamente diferentes entre grupos se indican con asteriscos (\*p<0,05; \*\*p<0,01).



## **5.2. Anión superóxido celular**

El anión superóxido celular se determina mediante su conjugación a la hidroetidina (HE) que emite fluorescencia al entrar en la célula y reaccionar con el superóxido.

Los niveles basales de superóxido celular están disminuidos en los pacientes con EHM respecto a los cirróticos sin EHM y controles en todas las poblaciones celulares estudiadas. Los pacientes sin EHM muestran una disminución significativa respecto a los controles únicamente en los Linfocitos B (Tabla 17 y Figura 49).

Tras la adición de Plumbagina, como era de esperar, aumenta significativamente el superóxido celular (la fluorescencia de la HE) en los controles y en ambos grupos de pacientes en todas las poblaciones celulares, excepto en los Linfocitos T CD8+ en los pacientes con EHM y, en los Linfocitos CD4+ y Linfocitos B en los pacientes sin EHM (Tabla 17 y Figura 49).

Para estudiar la respuesta de la célula a un aumento de anión superóxido, se calculó el ratio entre los niveles de fluorescencia de HE tras la adición de Plumbagina (Pb) y los basales. Es decir, los datos que se muestran en la Tabla 18 son el aumento de superóxido celular inducido por Pb expresados como número de veces del valor basal.

El aumento de superóxido celular tras adición de Pb es significativamente menor en los pacientes con EHM que en los controles en Leucocitos, Neutrófilos, Linfocitos T CD8+ y CD4+ y en los Linfocitos totales, mientras que no es diferente en Monocitos, Linfocitos T y Linfocitos B. En los pacientes con EHM el aumento de superóxido es menor que en los pacientes sin EHM en Leucocitos, Linfocitos T CD8+ y Linfocitos totales (Tabla 18 y Figura 50).

Los pacientes sin EHM tienen el ratio disminuido significativamente respecto a los controles en Neutrófilos (Tabla 18 y Figura 50).

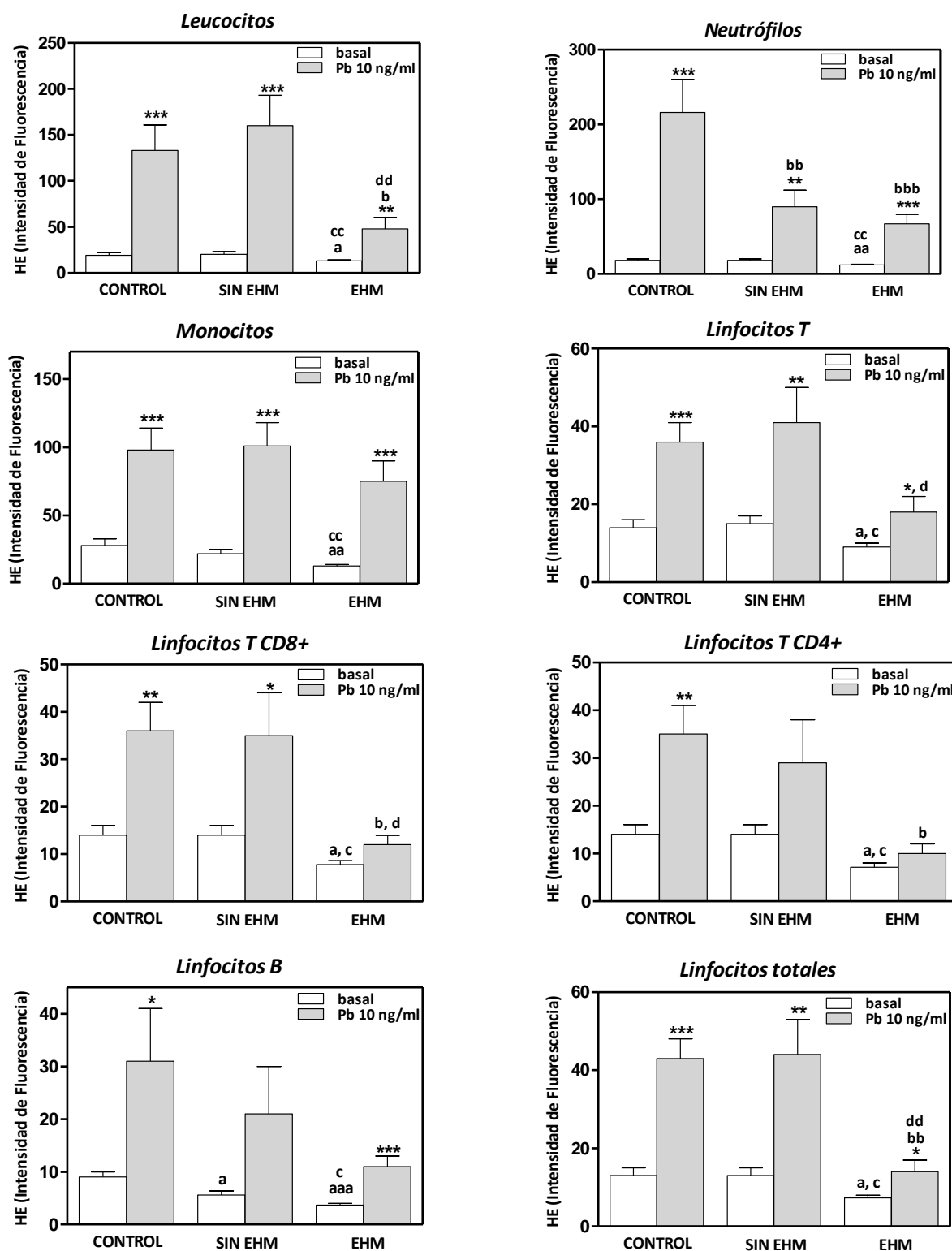
#### IV. Resultados

Tabla 17. Niveles de superóxido celular basales y tras adición de Plumbagina en las diferentes poblaciones celulares

Población celular		CONTROL	SIN EHM	EHM	SIN EHM vs EHM
		Intensidad de fluorescencia (I.F) de HE			
Leucocitos	basal	19 ± 3	20 ± 3	13 ± 1 <sup>a</sup>	p<0,01
	Pb	133 ± 28***	160 ± 33***	48 ± 12***, <sup>b</sup>	p<0,01
Neutrófilos	basal	18 ± 2	18 ± 2	12 ± 1 <sup>aa</sup>	p<0,01
	Pb	216 ± 44***	90 ± 22***, <sup>bb</sup>	67 ± 13***, <sup>bbb</sup>	ns
Monocitos	basal	28 ± 5	22 ± 3	13 ± 1 <sup>aa</sup>	p<0,01
	Pb	98 ± 16***	101 ± 17***	75 ± 15***	ns
Linfocitos T	basal	14 ± 2	15 ± 2	9 ± 1 <sup>a</sup>	p<0,05
	Pb	36 ± 5***	41 ± 9**	18 ± 4*	p<0,05
Linfocitos T CD8+	basal	14 ± 2	14 ± 2	7,8 ± 0,8 <sup>a</sup>	p<0,05
	Pb	36 ± 6**	35 ± 9*	12 ± 2 <sup>b</sup>	p<0,05
Linfocitos T CD4+	basal	14 ± 2	14 ± 2	7,1 ± 0,9 <sup>a</sup>	p<0,05
	Pb	35 ± 6**	29 ± 9	10 ± 2 <sup>b</sup>	ns
Linfocitos B	basal	9 ± 1	5,6 ± 0,8 <sup>a</sup>	3,7 ± 0,3 <sup>aaa</sup>	p<0,05
	Pb	31 ± 10*	21 ± 9	11 ± 2***	ns
Linfocitos totales	basal	13 ± 2	13 ± 2	7,3 ± 0,7 <sup>a</sup>	p<0,05
	Pb	45 ± 5***	46 ± 9**	24 ± 5*, <sup>bb</sup>	p<0,01

Se muestra la intensidad de fluorescencia de hidroetidina (HE) en condiciones basales y tras adición de Plumbagina 10 ng/ml (Pb). Los datos son los mismos representados en la Figura 49. Los valores son la media ± SEM del número de sujetos estudiados (control n=19, sin EHM n=22, EHM n=28). Los valores significativamente diferentes tras adición de Pb y sus basales se indican con asteriscos (\*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001). Los valores significativamente diferentes entre basales de los grupos de pacientes comparados con los de los controles se indican con 'a' (<sup>a</sup>p<0,05; <sup>aa</sup>p<0,01; <sup>aaa</sup>p<0,001) y las diferencias significativas tras adición de Pb entre los pacientes y los controles se indican con 'b' (<sup>b</sup>p<0,05; <sup>bb</sup>p<0,01).

## SUPERÓXIDO CELULAR



**Figura 49. Niveles de superóxido celular en condiciones basales y tras adición de Plumbagina en los distintos tipos celulares.** Se muestra la intensidad de fluorescencia (I.F.) tras adición de hidroetidina (HE) en condiciones basales (barras blancas) y tras la adición de Pb 10  $\mu$ M (barras grises) en las poblaciones celulares estudiadas. Los valores son la media  $\pm$  SEM del número de sujetos estudiados (control n=19, sin EHM n=22, EHM n=28). Los valores significativamente diferentes entre I.F. basal y tras adición de Pb en el mismo grupo de sujetos se indican con asteriscos; entre I.F. basal en pacientes respecto a controles con 'a'; entre I.F. tras adición de Pb en pacientes respecto a controles con 'b'; entre I.F. basal de pacientes con y sin EHM con 'c'; entre I.F. tras adición de Pb de pacientes con y sin EHM con 'd' (\*, a, b, c, d  $p < 0,05$ ; \*\*, aa, bb, cc, dd  $p < 0,01$ ; \*\*\*, aaa, bbb, ccc, ddd  $p < 0,001$ ).

#### IV. Resultados

Tabla 18. Aumento del superóxido celular inducido por la Plumbagina en las diferentes poblaciones celulares

Población celular	CONTROL	SIN EHM	EHM	SIN EHM vs EHM
	Ratio HE Pb/basal			
Leucocitos	7 ± 1	8 ± 1	3,7 ± 0,7*	p<0,05
Neutrófilos	12 ± 3	5 ± 1,0*	5,6 ± 0,8*	ns
Monocitos	3,5 ± 0,6	4,6 ± 0,8	5,8 ± 1,0	ns
Linfocitos T	2,6 ± 0,2	2,7 ± 0,4	2,0 ± 0,3	ns
Linfocitos T CD8+	2,6 ± 0,3	2,5 ± 0,4	1,5 ± 0,2*	p<0,05
Linfocitos T CD4+	2,5 ± 0,3	2,1 ± 0,4	1,4 ± 0,2*	ns
Linfocitos B	3,4 ± 0,8	3,7 ± 0,9	3,0 ± 0,6	ns
Linfocitos totales	3,3 ± 0,4	3,4 ± 0,5	1,9 ± 0,3**	p<0,05

Se muestra el ratio entre los niveles de fluorescencia de la hidroetidina (HE) tras adición de plumbagina (Pb) 10 ng/ml y los basales. Los datos son los mismos representados en la Figura 50. Los valores son la media ± SEM del número de sujetos estudiados (control n=19, sin EHM n=22, EHM n=28). Los valores significativamente diferentes de los controles se indican con asteriscos (\*p<0,05; \*\*p<0,01).

## SUPERÓXIDO CELULAR

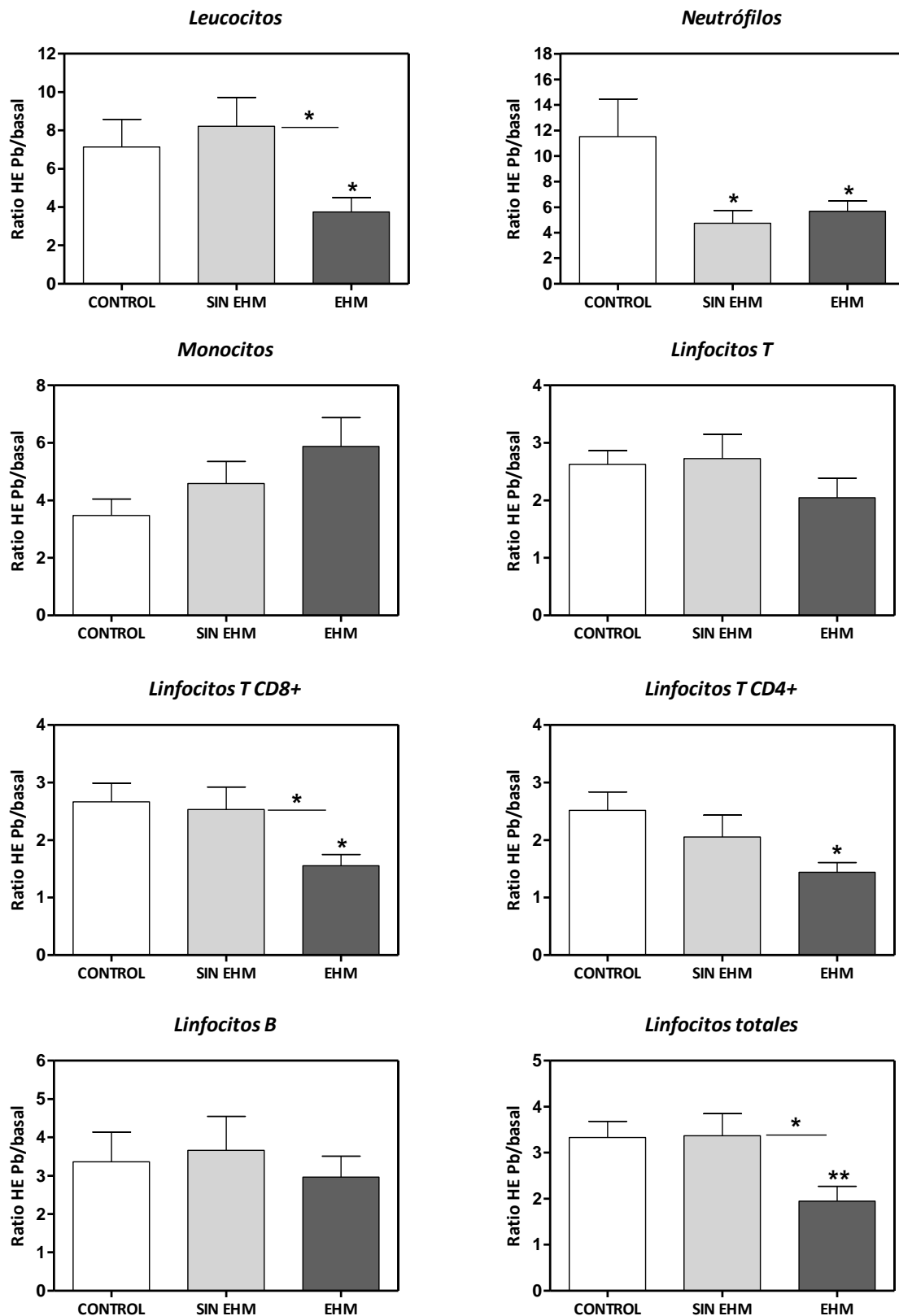


Figura 50. Aumento de superóxido celular inducido por Plumbagina (Pb) en los distintos tipos celulares. Se muestra el ratio entre la intensidad de fluorescencia de la hidroetidina (HE) tras adición de Pb 10 ng/ml y en condiciones basales en las distintas poblaciones celulares. Los valores son la media  $\pm$  SEM del número de sujetos estudiados (control n=19, sin EHM n=22, EHM n=28). Los valores significativamente diferentes entre grupos se indican con asteriscos (\* $p$ <0,05; \*\* $p$ <0,01).

### **5.3. Anión superóxido mitocondrial**

El anión superóxido mitocondrial se determina midiendo la fluorescencia emitida por reacción con el MitoSox (MTX) que atraviesa la membrana mitocondrial y reacciona con el superóxido mitocondrial.

Los niveles basales de superóxido mitocondrial se encuentran aumentados en pacientes con EHM comparado con los controles en Leucocitos, Neutrófilos, Monocitos, Linfocitos B y totales y, no están alterados en Linfocitos T, Linfocitos T CD8+ y T CD4+. En los pacientes con EHM respecto a los pacientes sin EHM se observa un aumento de superóxido mitocondrial basal en Monocitos (Tabla 19 y Figura 51).

Los pacientes sin EHM tienen aumentados los niveles basales de superóxido mitocondrial respecto a los controles en Leucocitos, Neutrófilos y Linfocitos B (Tabla 19 y Figura 51).

Tras la adición de la Plumbagina, aumenta significativamente el superóxido mitocondrial (la fluorescencia del MTX) en los controles y en ambos grupos de pacientes en todas las poblaciones celulares, excepto en los Linfocitos B de los pacientes con EHM (Tabla 19 y Figura 51).

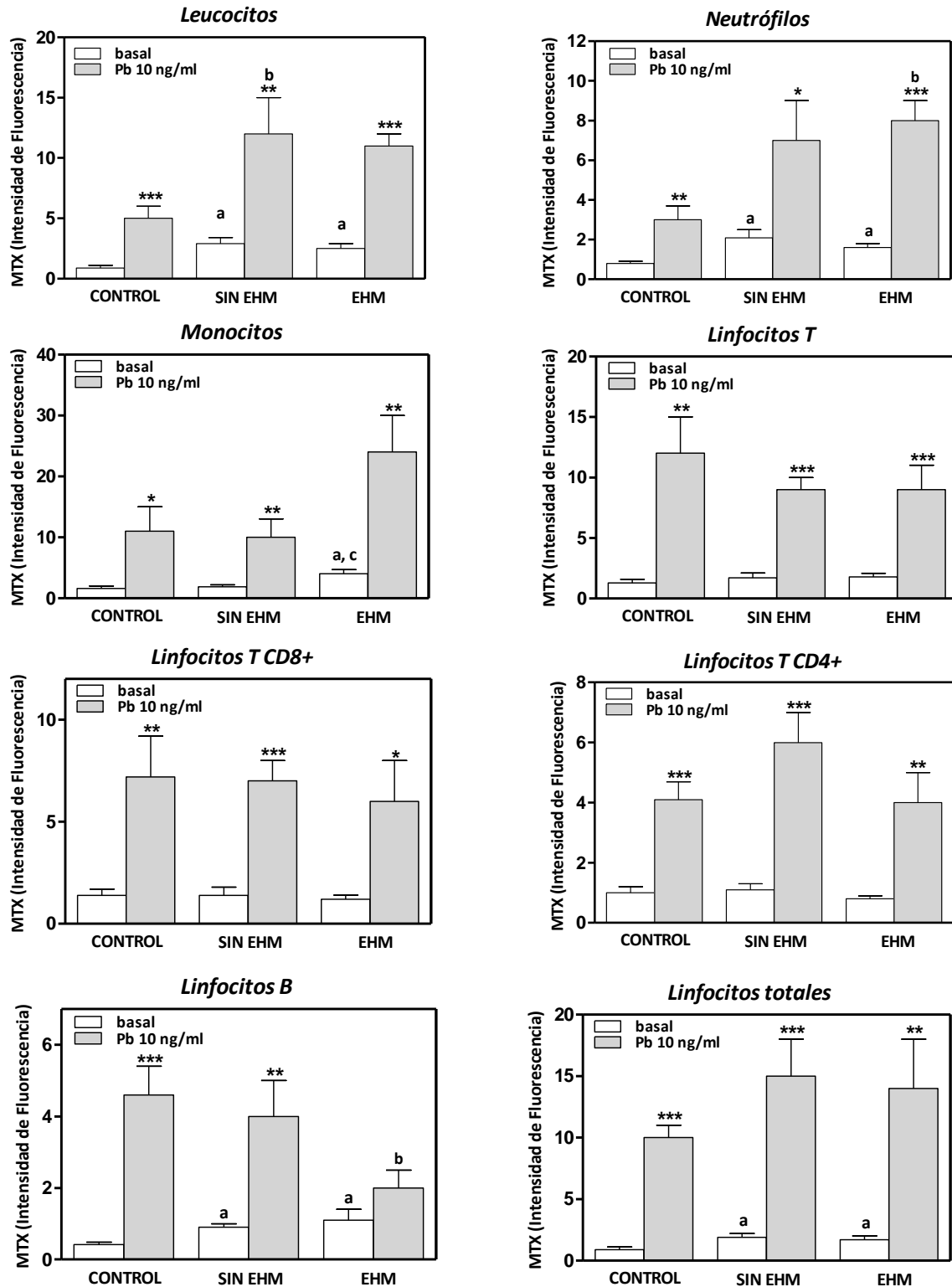
Para estudiar la respuesta del superóxido mitocondrial a un aumento de anión superóxido, se calculó el ratio entre sus niveles tras adición de plumbagina y los basales. Dicho ratio disminuye tanto en pacientes con EHM como sin EHM respecto a los controles en Linfocitos T y B, y no se altera en las otras poblaciones. En los pacientes con EHM el ratio es menor que en los pacientes sin EHM en los linfocitos B (Tabla 20 y Figura 52).

Tabla 19. Niveles de superóxido mitocondrial en condiciones basales y tras adición de Plumbagina en las diferentes poblaciones celulares

Población celular		CONTROL	SIN EHM	EHM	SIN EHM vs EHM
		Intensidad de fluorescencia (I.F) de MTX			
Leucocitos	basal	0,9 ± 0,2	2,9 ± 0,5 <sup>a</sup>	2,5 ± 0,4 <sup>a</sup>	ns
	Pb	5 ± 1***	12 ± 3***, <sup>b</sup>	11 ± 1***	ns
Neutrófilos	basal	0,8 ± 0,1	2,1 ± 0,4 <sup>a</sup>	1,6 ± 0,2 <sup>a</sup>	ns
	Pb	3,0 ± 0,7**	7 ± 2*	8 ± 1***, <sup>b</sup>	ns
Monocitos	basal	1,6 ± 0,4	1,9 ± 0,3	4,0 ± 0,7 <sup>a</sup>	p<0,05
	Pb	11 ± 4*	10 ± 3**	24 ± 6**	ns
Linfocitos T	basal	1,3 ± 0,3	1,7 ± 0,4	1,8 ± 0,3	ns
	Pb	12 ± 3**	9 ± 1***	9 ± 2***	ns
Linfocitos T CD8+	basal	1,4 ± 0,3	1,4 ± 0,4	1,2 ± 0,2	ns
	Pb	7 ± 2**	7 ± 1***	6 ± 2*	ns
Linfocitos T CD4+	basal	1,0 ± 0,2	1,1 ± 0,2	0,8 ± 0,1	ns
	Pb	4,1 ± 0,6***	6 ± 1***	4 ± 1**	ns
Linfocitos B	basal	0,42 ± 0,07	0,9 ± 0,1 <sup>a</sup>	1,1 ± 0,3 <sup>a</sup>	ns
	Pb	4,6 ± 0,8***	4 ± 1**	2,0 ± 0,5 <sup>b</sup>	Ns
Linfocitos totales	basal	0,9 ± 0,2	1,9 ± 0,3 <sup>a</sup>	1,7 ± 0,3 <sup>a</sup>	Ns
	Pb	10 ± 1***	15 ± 3***	14 ± 4**	Ns

Se muestra la intensidad de fluorescencia de mitoSox (MTX) en condiciones basales y tras adición de Plumbagina 10 ng/ml (Pb). Los datos son los mismos representados en la Figura 51. Los valores son la media ± SEM del número de sujetos estudiados (control n=19, sin EHM n=22, EHM n=28). Los valores significativamente diferentes tras la adición de Pb y sus basales se indican con asteriscos (\*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001). Los valores significativamente diferentes entre basales de los grupos de pacientes comparados con los de los controles se indican con 'a' (<sup>a</sup>p<0,05) y las diferencias significativas tras la adición de Pb entre los pacientes y los controles se indican con 'b' (<sup>b</sup>p<0,05).

**SUPERÓXIDO MITOCONDRIAL**



**Figura 51. Niveles de superóxido mitocondrial en condiciones basales y tras adición de Plumbagina en los distintos tipos celulares.** Se muestra la intensidad de fluorescencia (I.F.) tras adición de mitoSox (MTX) en condiciones basales (barras blancas) y tras la adición de Pb 10 ng/ml (barras grises) en las poblaciones celulares estudiadas. Los valores son la media  $\pm$  SEM del número de sujetos estudiados (control n=19, sin EHM n=22, EHM n=28). Los valores significativamente diferentes entre I.F. basal y tras adición de Pb en el mismo grupo de sujetos se indican con asteriscos; entre I.F. basal en pacientes respecto a controles con 'a'; entre I.F. tras adición de Pb en pacientes respecto a controles con 'b'; entre I.F. basal de pacientes con y sin EHM con 'c'; entre I.F. tras adición de Pb de pacientes con y sin EHM con 'd' (\*, a, b, c, d  $p < 0,05$ ; \*\*, aa, bb, cc, dd  $p < 0,01$ ; \*\*\*, aaa, bbb, ccc, ddd  $p < 0,001$ ).

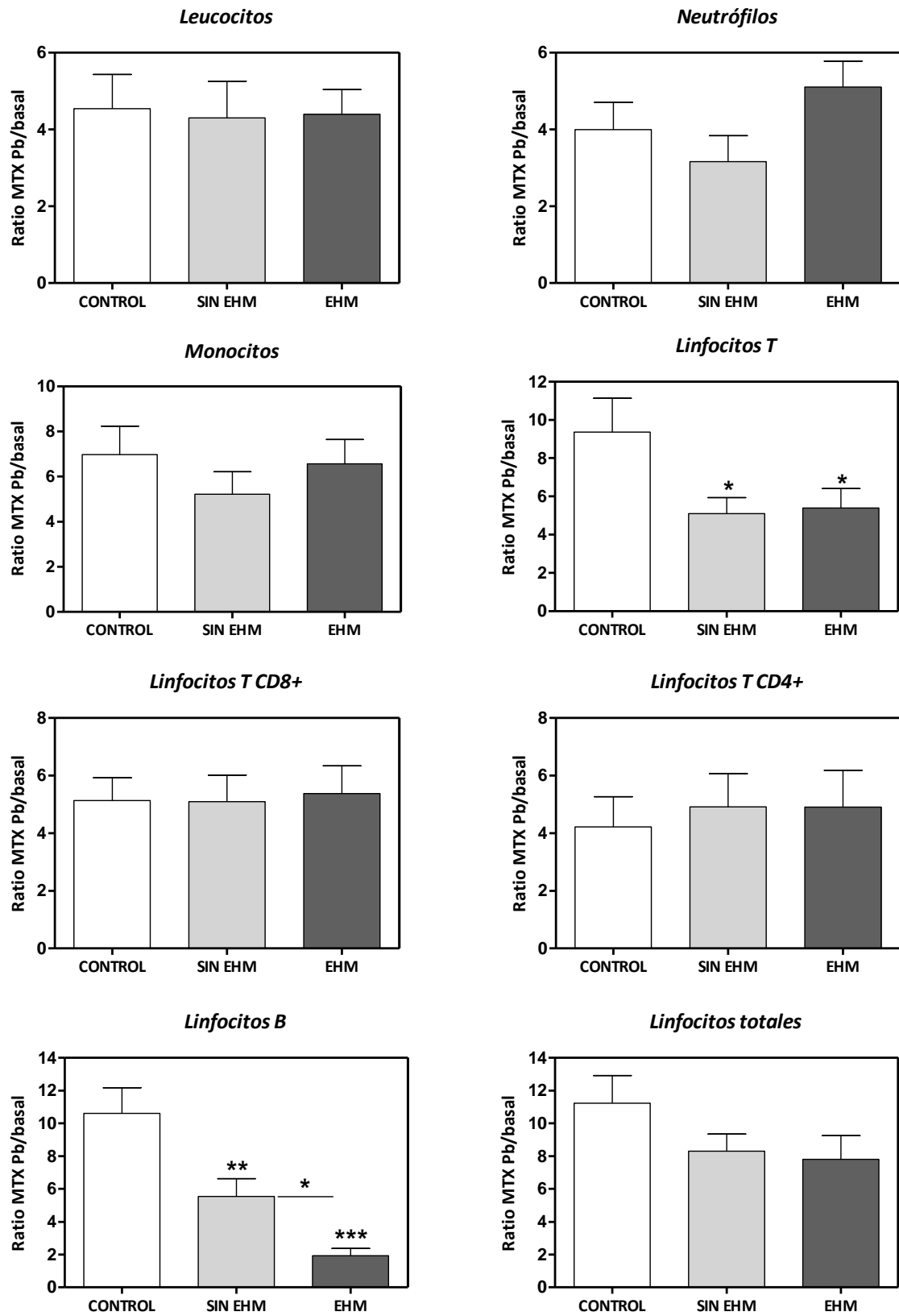


Tabla 20. Aumento del superóxido mitocondrial inducido por Plumbagina en las diferentes poblaciones celulares

Población celular	CONTROL	SIN EHM	EHM	SIN EHM vs EHM
	Ratio MTX Pb/basal			
Leucocitos	5 ± 1	4 ± 1	4,4 ± 0,6	ns
Neutrófilos	4,0 ± 0,7	3,2 ± 0,7	5,1 ± 0,7	ns
Monocitos	7 ± 1	5 ± 1	6 ± 1	ns
Linfocitos T	9 ± 2	5,1 ± 0,8*	5 ± 1*	ns
Linfocitos T CD8+	5,1 ± 0,8	5 ± 1	5 ± 1	ns
Linfocitos T CD4+	4 ± 1	5 ± 1	5 ± 1	ns
Linfocitos B	11 ± 2	5 ± 1**	1,9 ± 0,4***	p<0,05
Linfocitos totales	11 ± 2	8 ± 1	8 ± 1	ns

Se muestran los ratios entre los niveles de fluorescencia del MitoSox (MTX) tras adición de plumbagina (Pb) 10 ng/ml y los basales. Los datos son los mismos representados en la Figura 52. Los valores son la media ± SEM del número de sujetos estudiados (control n=19, sin EHM n=22, EHM n=28). Los valores significativamente diferentes de los controles se indican con asteriscos (\*p<0,05; \*\*p<0,01; p<0,001).

**SUPERÓXIDO MITOCONDRIAL**



**Figura 52. Aumento de superóxido mitocondrial inducido por Plumbagina (Pb) en distintos tipos celulares.** Se muestra el ratio entre la intensidad de fluorescencia del MitoSox (MTX) tras adición de Pb 10 ng/ml y en condiciones basales en las distintas poblaciones celulares estudiadas. Los valores son la media  $\pm$  SEM del número de sujetos estudiados (control n=19, sin EHM n=22, EHM n=28). Los valores significativamente diferentes entre grupos se indican con asteriscos (\*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001).

#### **5.4. Óxido nítrico (NO)**

El óxido nítrico (NO) se determina midiendo la fluorescencia emitida por la Diaminofluoresceína (DAF) que atraviesa la membrana celular y reacciona con el óxido nítrico.

Los niveles basales de óxido nítrico están aumentados en los pacientes con EHM respecto a los controles en todas las poblaciones celulares estudiadas excepto en Neutrófilos y Monocitos, en las cuales existe una tendencia al aumento sin que las diferencias sean significativas. En los pacientes con EHM, el óxido nítrico basal aumenta marcadamente respecto a los sin EHM en los linfocitos totales (Tabla 21 y Figura 53).

Los pacientes sin EHM tienen aumentados los niveles basales de óxido nítrico respecto a los controles en Leucocitos, Linfocitos T, Linfocitos T CD8+ y T CD4+ y Linfocitos totales (Tabla 21 y Figura 53).

Tras la adición de NOR-1, un agente generador de óxido nítrico, aumenta el óxido nítrico (la fluorescencia del DAF) en los controles en todas las poblaciones celulares, en los pacientes sin EHM en todas las poblaciones celulares, excepto en los Neutrófilos y Linfocitos B. En los pacientes con EHM el óxido nítrico sólo aumenta en los Linfocitos T CD8+ (Tabla 21 y Figura 53).

Para estudiar la respuesta del óxido nítrico celular a un aumento de óxido nítrico, se calculó el ratio entre los niveles de fluorescencia del DAF tras la adición del agente generador de óxido nítrico, NOR-1 y los basales. Este ratio disminuye en pacientes con EHM respecto a los controles en todas las poblaciones estudiadas y con respecto a los pacientes sin EHM en todas las poblaciones celulares excepto en Linfocitos B (Tabla 22 y Figura 54).

Los pacientes sin EHM tienen el ratio disminuido respecto a los controles en Monocitos, Linfocitos T CD4+ y en Linfocitos B (Tabla 22 y Figura 54).

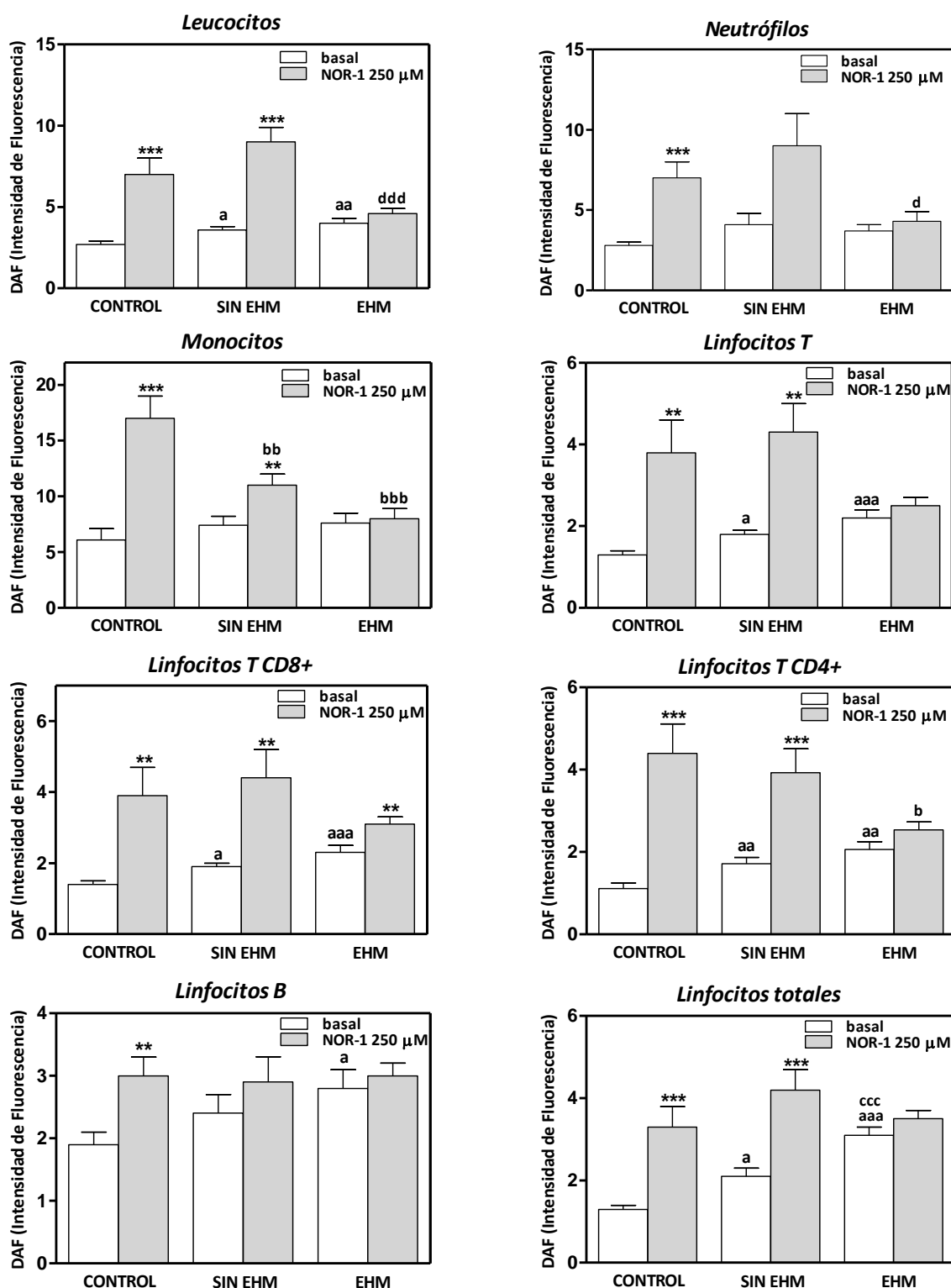
#### IV. Resultados

Tabla 21. Niveles de óxido nítrico en condiciones basales y tras adición de Plumbagina en las diferentes poblaciones celulares

Población celular		CONTROL	SIN EHM	EHM	SIN EHM vs EHM
		Intensidad de fluorescencia (I.F) de DAF			
Leucocitos	Basal	2,7 ± 0,2	3,6 ± 0,2 <sup>a</sup>	4,0 ± 0,3 <sup>aa</sup>	ns
	NOR-1	7 ± 1***	9,0 ± 0,9***	4,6 ± 0,3	p<0,001
Neutrófilos	Basal	2,8 ± 0,2	4,1 ± 0,7	3,7 ± 0,4	ns
	NOR-1	7 ± 1***	9 ± 2	4,3 ± 0,6	p<0,05
Monocitos	Basal	6,1 ± 1,0	7,4 ± 0,8	7,6 ± 0,9	ns
	NOR-1	17 ± 2***	11 ± 1** <sup>,bb</sup>	8,0 ± 0,9 <sup>bbb</sup>	ns
Linfocitos T	Basal	1,3 ± 0,1	1,8 ± 0,1 <sup>a</sup>	2,2 ± 0,2 <sup>aaa</sup>	ns
	NOR-1	3,8 ± 0,8**	4,3 ± 0,7**	2,5 ± 0,2	ns
Linfocitos T CD8+	Basal	1,4 ± 0,1	1,9 ± 0,1 <sup>a</sup>	2,3 ± 0,2 <sup>aaa</sup>	ns
	NOR-1	3,9 ± 0,8**	4,4 ± 0,8**	3,1 ± 0,2**	ns
Linfocitos T CD4+	Basal	1,1 ± 0,1	1,7 ± 0,2 <sup>aa</sup>	2,1 ± 0,2 <sup>aa</sup>	ns
	NOR-1	6 ± 1***	3,6 ± 0,6***	2,4 ± 0,2 <sup>b</sup>	ns
Linfocitos B	Basal	1,9 ± 0,2	2,4 ± 0,3	2,8 ± 0,3 <sup>a</sup>	ns
	NOR-1	3,0 ± 0,3**	2,9 ± 0,4	3,0 ± 0,2	ns
Linfocitos totales	Basal	1,3 ± 0,1	2,1 ± 0,2 <sup>a</sup>	3,1 ± 0,2 <sup>aaa</sup>	p<0,001
	NOR-1	3,3 ± 0,5***	4,2 ± 0,5***	3,5 ± 0,2	ns

Se muestra la intensidad de fluorescencia de diaminofluoresceína (DAF) en condiciones basales y tras adición de NOR-1 250 µM. Los datos son los mismos representados en la Figura 53. Los valores son la media ± SEM del número de sujetos estudiados (control n=19, sin EHM n=22, EHM n=28). Los valores significativamente diferentes tras adición de NOR-1 y sus basales se indican con asteriscos (\*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001). Los valores significativamente diferentes entre basales de los grupos de pacientes comparados con los de los controles se indican con 'a' (<sup>a</sup>p<0,05; <sup>aa</sup>p<0,01; <sup>aaa</sup>p<0,001) y las diferencias significativas tras adición de NOR-1 entre los pacientes y los controles se indican con 'b' (<sup>b</sup>p<0,05; <sup>bb</sup>p<0,01).

## ÓXIDO NÍTRICO



**Figura 53. Niveles de óxido nítrico en condiciones basales y tras adición de NOR-1 en los distintos tipos celulares.** Se muestra la intensidad de fluorescencia (I.F.) tras adición de diaminofluoresceína (DAF) en condiciones basales (barras blancas) y tras la adición de NOR-1 250 µM (barras grises) en las poblaciones celulares estudiadas. Los valores son la media  $\pm$  SEM del número de sujetos estudiados (control n=19, sin EHM n=22, EHM n=28). Los valores significativamente diferentes entre I.F. basal y tras adición de NOR-1 en el mismo grupo de sujetos se indican con asteriscos; entre I.F. basal en pacientes respecto a controles con 'a'; entre I.F. tras adición de NOR-1 en pacientes respecto a controles con 'b'; entre I.F. basal de pacientes con y sin EHM con 'c'; entre I.F. tras adición de NOR-1 de pacientes con y sin EHM con 'd' (\*,a,b,c,d p<0,05; \*\*,aa,bb,cc,dd p<0,01; \*\*\*,aaa,bbb,ccc,ddd p<0,001).

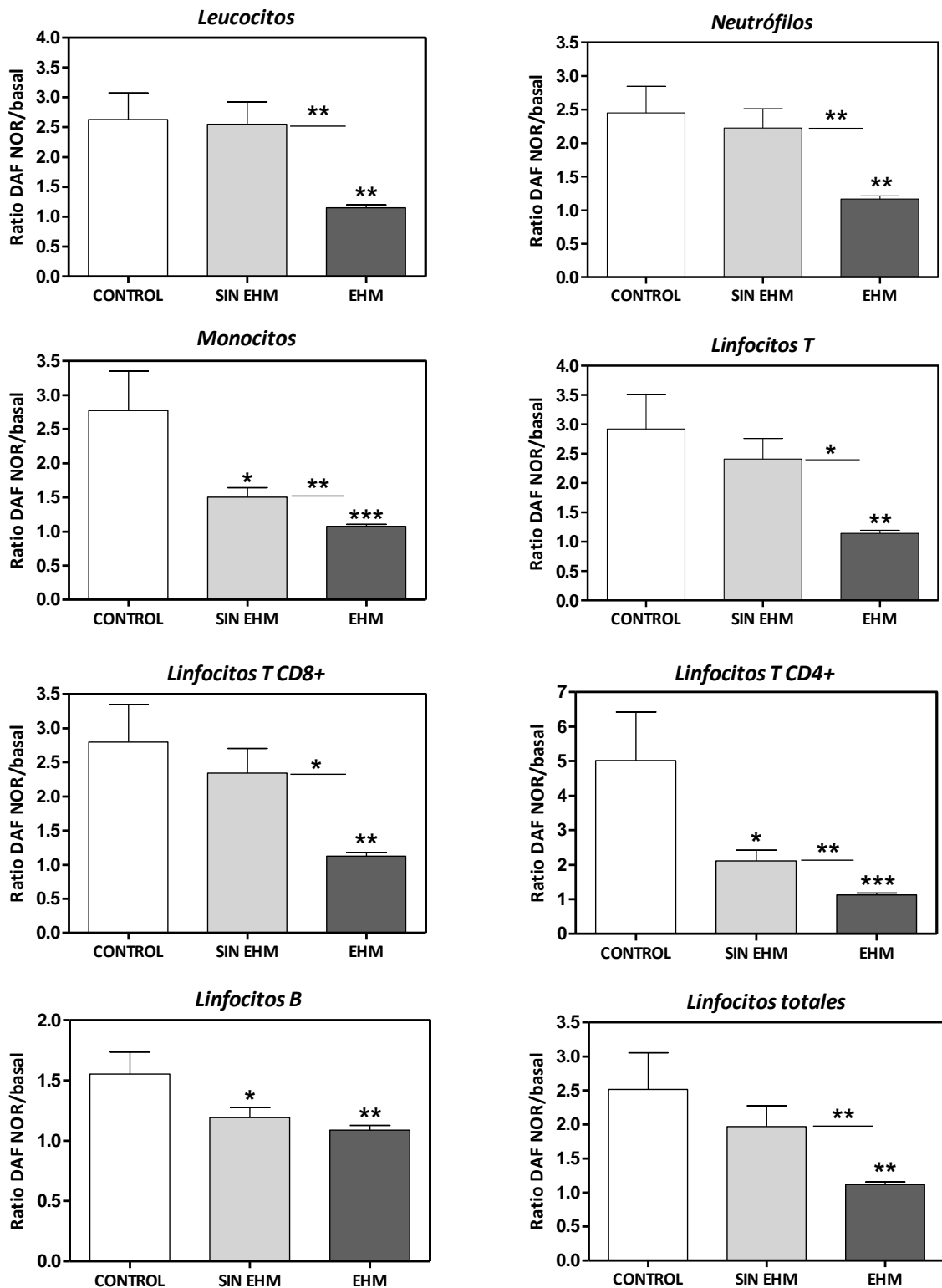
#### IV. Resultados

Tabla 22. Aumento del óxido nítrico inducido por NOR-1 en las diferentes poblaciones celulares

Población celular	CONTROL	SIN EHM	EHM	SIN EHM vs EHM
	Ratio DAF NOR1/basal			
Leucocitos	2,6 ± 0,4	2,6 ± 0,3	1,15 ± 0,04**	p<0,01
Neutrófilos	2,5 ± 0,4	2,2 ± 0,3	1,16 ± 0,05**	p<0,01
Monocitos	2,8 ± 0,6	1,5 ± 0,1*	1,08 ± 0,02***	p<0,01
Linfocitos T	2,9 ± 0,6	2,4 ± 0,3	1,14 ± 0,05**	p<0,05
Linfocitos T CD8+	2,8 ± 0,6	2,3 ± 0,4	1,12 ± 0,06**	p<0,05
Linfocitos T CD4+	5 ± 1	2,1 ± 0,3*	1,13 ± 0,05***	p<0,01
Linfocitos B	1,6 ± 0,2	1,19 ± 0,08*	1,09 ± 0,04**	ns
Linfocitos totales	2,5 ± 0,5	2,0 ± 0,3	1,12 ± 0,04**	p<0,01

Se muestran los ratios entre los niveles de fluorescencia de la diaminofluoreceína (DAF) tras adición de NOR-1 250  $\mu$ M y los basales. Los datos son los mismos representados en la Figura 54. Los valores son la media  $\pm$  SEM del número de sujetos estudiados (control n=19, sin EHM n=22, EHM n=28). Los valores significativamente diferentes de los controles se indican con asteriscos (\*p<0,05; \*\*p<0,01).

## ÓXIDO NÍTRICO



**Figura 54. Aumento de óxido nítrico inducido por NOR-1 en distintos tipos celulares.** Se muestra el ratio entre la intensidad de fluorescencia de Diaminofluoresceína tras adición de NOR-1 250  $\mu$ M y en condiciones basales en las distintas poblaciones celulares estudiadas. Los valores son la media  $\pm$  SEM del número de sujetos estudiados (control n=19, sin EHM n=22, EHM n=28). Los valores significativamente diferentes entre grupos se indican con asteriscos (\*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001).

### **5.5. Peróxidos y Peroxinitrito**

Los peróxidos y el radical peroxinitrito se determinan midiendo la fluorescencia emitida tras la reacción con la Dihidrorodamina (DHR) cuando ésta atraviesa la membrana celular y reacciona con éstos.

Los niveles basales de peróxidos/peroxinitritos están disminuidos en los pacientes con EHM respecto a los controles en todas las poblaciones estudiadas excepto en Monocitos. Los pacientes con EHM, tienen menores niveles basales que los pacientes sin EHM en Linfocitos T CD8+, Linfocitos T CD4+ y Linfocitos B (Tabla 23 y Figura 55).

Los pacientes sin EHM tienen niveles basales de peróxidos/peroxinitrito menores que los controles sólo en Neutrófilos (Tabla 23 y Figura 55).

Tras la adición de la Plumbagina, que genera superóxido, aumentan los niveles de peróxidos/peroxinitrito (la fluorescencia de DHR) en los controles y en ambos grupos de pacientes en todas las poblaciones celulares (Tabla 23 y Figura 55).

Para estudiar la respuesta de los niveles de peróxidos/peroxinitrito en la célula a un aumento de superóxido se calculó el ratio entre los niveles de fluorescencia de DHR tras adición de Plumbagina 10 ng/ml y los basales. Este ratio está aumentado en los pacientes con EHM respecto a los controles y a los pacientes sin EHM en todas las poblaciones celulares estudiadas, excepto en los Linfocitos B, dónde hay una tendencia al aumento que no llega a ser significativa respecto a los controles pero sí respecto a los pacientes sin EHM (Tabla 24 y Figura 56).



Tabla 23. Niveles de peróxidos/peroxinitrito en condiciones basales y tras adición de Plumbagina en las diferentes poblaciones celulares

Población celular		CONTROL	SIN EHM	EHM	SIN EHM vs EHM
		Intensidad de fluorescencia (I.F) de DHR			
Leucocitos	basal	10,8 ± 0,9	10,1 ± 0,8	8,5 ± 0,6 <sup>a</sup>	Ns
	Pb	89 ± 20***	60 ± 12***	278 ± 39***, <sup>bbb</sup>	p<0,001
Neutrófilos	basal	15 ± 1	11 ± 1 <sup>a</sup>	11 ± 1 <sup>a</sup>	Ns
	Pb	149 ± 37***	77 ± 18***	442 ± 67***, <sup>bbb</sup>	p<0,001
Monocitos	basal	16 ± 2	13 ± 2	14 ± 1	Ns
	Pb	62 ± 11***	56 ± 9***	143 ± 25***, <sup>b</sup>	p<0,01
Linfocitos T	basal	4,9 ± 0,5	4,3 ± 0,5	3,4 ± 0,2 <sup>a</sup>	Ns
	Pb	19 ± 2***	22 ± 3***	27 ± 2***	Ns
Linfocitos T CD8+	basal	5,0 ± 0,5	4,4 ± 0,5	3,3 ± 0,2 <sup>aa</sup>	p<0,05
	Pb	20 ± 3***	24 ± 2***	30 ± 3***, <sup>b</sup>	Ns
Linfocitos T CD4+	basal	5,1 ± 0,5	4,5 ± 0,5	3,5 ± 0,2 <sup>a</sup>	p<0,05
	Pb	16 ± 3***	17 ± 2***	25 ± 2***, <sup>b</sup>	p<0,05
Linfocitos B	basal	5,5 ± 0,7	5,0 ± 0,6	3,2 ± 0,2 <sup>aa</sup>	p<0,01
	Pb	22 ± 6**	19 ± 3***	20 ± 2***	Ns
Linfocitos totales	basal	4,7 ± 0,4	3,8 ± 0,4	3,2 ± 0,2 <sup>aa</sup>	Ns
	Pb	21 ± 3***	17 ± 4**	35 ± 4***, <sup>b</sup>	p<0,01

Se muestra la intensidad de fluorescencia de dihidrorodamina (DHR) en condiciones basales y tras adición de Plumbagina (Pb) 10 ng/ml. Los datos son los mismos representados en la Figura 55. Los valores son la media ± SEM del número de sujetos estudiados (control n=19, sin EHM n=22, EHM n=28). Los valores significativamente diferentes tras adición de Pb y sus basales se indican con asteriscos (\*p<0,05; \*\*\*p<0,001). Los valores significativamente diferentes entre basales de los grupos de pacientes comparados con los de los controles se indican con 'a' (<sup>a</sup>p<0,05; <sup>aa</sup>p<0,01) y las diferencias significativas tras adición de Pb entre los pacientes y los controles se indican con 'b' (<sup>b</sup>p<0,05<sup>bbb</sup>p<0,001).

PERÓXIDOS/PEROXINITRITO

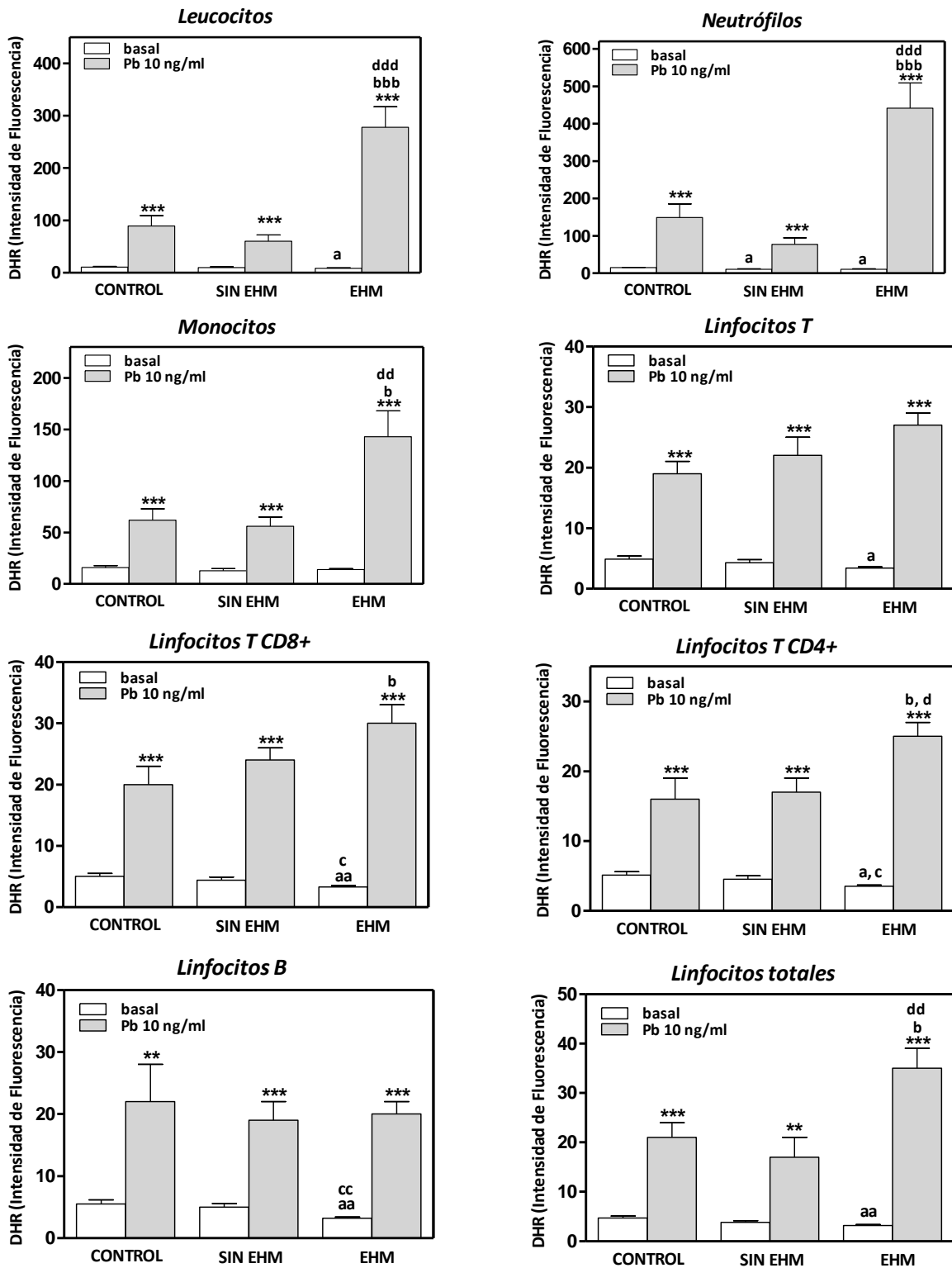
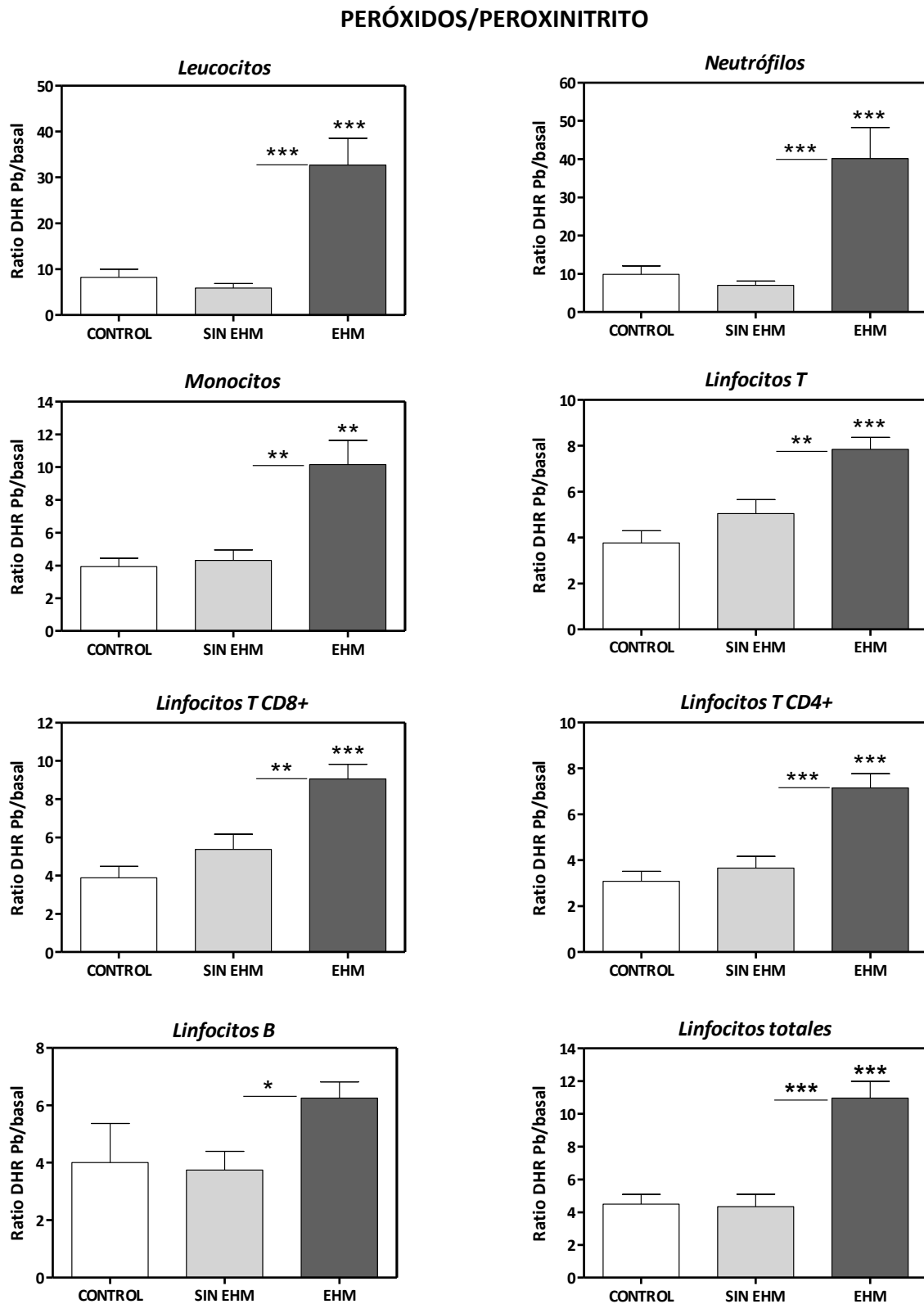


Figura 55. Niveles de peróxidos/peroxinitrito en condiciones basales y tras adición de Plumbagina (Pb) en los distintos tipos celulares. Se muestra la intensidad de fluorescencia (I.F.) tras adición de dihidrorodamina (DHR) en condiciones basales (barras blancas) y tras la adición de Pb 10 ng/ml (barras grises) en las poblaciones celulares estudiadas. Los valores son la media  $\pm$  SEM del número de sujetos estudiados (control n=19, sin EHM n=22, EHM n=28). Los valores significativamente diferentes entre I.F. basal y tras adición de Pb en el mismo grupo de sujetos se indican con asteriscos; entre I.F. basal en pacientes respecto a controles con 'a'; entre I.F. tras adición de Pb en pacientes respecto a controles con 'b'; entre I.F. basal de pacientes con y sin EHM con 'c'; entre I.F. tras adición de Pb de pacientes con y sin EHM con 'd' (\*, a, b, c, d  $p < 0,05$ ; \*\*, aa, bb, cc, dd  $p < 0,01$ ; \*\*\*, aaa, bbb, ccc, ddd  $p < 0,001$ ).

Tabla 24. Aumento de los peróxidos/peroxinitrito inducidos por Plumbagina en las diferentes poblaciones celulares

Población celular	CONTROL	SIN EHM	EHM	SIN EHM vs EHM
	Ratio DHR Pb/basal			
Leucocitos	8,2 ± 1,8	5,9 ± 1,0	32,7 ± 5,8***	p<0,001
Neutrófilos	9,9 ± 2,2	7,0 ± 1,1	40,2 ± 8,1***	p<0,001
Monocitos	3,9 ± 0,5	4,3 ± 0,6	10,2 ± 1,5**	p<0,01
Linfocitos T	3,8 ± 0,5	5,0 ± 0,6	7,8 ± 0,5***	p<0,01
Linfocitos T CD8+	3,9 ± 0,6	5,4 ± 0,8	9,1 ± 0,7***	p<0,01
Linfocitos T CD4+	3,1 ± 0,4	3,7 ± 0,5	7,2 ± 0,6***	p<0,001
Linfocitos B	4,0 ± 1,3	3,8 ± 0,6	6,3 ± 0,6	p<0,05
Linfocitos totales	4,5 ± 0,6	4,4 ± 0,7	11,0 ± 1,0***	p<0,001

Se muestran los ratios entre los niveles de fluorescencia de dihidrorodamina (DHR) tras adición de plumbagina (Pb) 10 ng/ml y los basales. Los datos son los mismos representados en la Figura 56. Los valores son la media ± SEM del número de sujetos estudiados (control n=19, sin EHM n=22, EHM n=28). Los valores significativamente diferentes de los controles se indican con asteriscos (\*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001).



**Figura 56. Aumento de peróxidos/peroxinitrito inducido por Plumbagina en distintos tipos celulares.** Se muestra el ratio entre la intensidad de fluorescencia de la Dihidrorodamina inducida por Plumbagina (Pb) 10 ng/ml y en condiciones basales en las distintas poblaciones celulares estudiadas. Los valores son la media  $\pm$  SEM del número de sujetos estudiados (control n=19, sin EHM n=22, EHM n=28). Los valores significativamente diferentes entre grupos se indican con asteriscos (\* $p$ <0,05; \*\* $p$ <0,01; \*\*\* $p$ <0,001).

### **5.6. Tioles reducidos (GSH)**

Los tioles reducidos, de los cuales el 95% es GSH, se determinan midiendo la fluorescencia emitida por reacción con la 5-clorometilfluoresceína (CMF) cuando atraviesa la membrana celular y reacciona con éstos.

Los niveles basales de tioles reducidos están aumentados en los pacientes con EHM en todas las poblaciones celulares estudiadas respecto a los controles y, en Leucocitos, Neutrófilos, Linfocitos T, Linfocitos T CD8+, Linfocitos CD4+ y Linfocitos totales respecto a los pacientes sin EHM (Tabla 25 y figura 57).

Los pacientes sin EHM también tienen aumentado el nivel basal de tioles reducidos respecto a los controles en todas las poblaciones celulares (Tabla 25 y figura 57).

Tras la generación de superóxido por adición de Plumbagina, disminuyen los niveles de GSH (la fluorescencia de CMF) en los controles y en ambos grupos de pacientes en todas las poblaciones celulares (Tabla 25 y Figura 57).

Para estudiar la respuesta de los niveles de tioles reducidos a un aumento de superóxido se calculó el ratio entre los niveles de fluorescencia de CMF tras adición de Plumbagina (Pb) 10 ng/ml y los basales. Dicho ratio disminuye significativamente menos en los pacientes con EHM respecto a los controles en Monocitos, Linfocitos B y Linfocitos totales y, disminuye significativamente más en Neutrófilos. Aunque la tendencia en las otras poblaciones celulares es a disminuir ligeramente, las diferencias no son significativas. En Monocitos, el ratio disminuye significativamente menos en pacientes con EHM que en pacientes sin EHM (Tabla 26 y Figura 58).

Los pacientes sin EHM tienen el ratio menos disminuido que los controles en Linfocitos totales (Tabla 26 y Figura 58).

#### IV. Resultados

Tabla 25. Niveles de tioles reducidos en condiciones basales y tras adición de Plumbagina en las diferentes poblaciones celulares

Población celular		CONTROL	SIN EHM	EHM	SIN EHM vs EHM
		Intensidad de fluorescencia (I.F) de CMF			
Leucocitos	basal	6 ± 1	21 ± 3 <sup>aaa</sup>	33 ± 3 <sup>aaa</sup>	p<0,01
	Pb	3,5 ± 0,7*	12 ± 1 <sup>**</sup> , <sup>bb</sup>	18 ± 2 <sup>***</sup> , <sup>bbb</sup>	p<0,05
Neutrófilos	basal	7 ± 1	20 ± 3 <sup>aaa</sup>	30 ± 2 <sup>aaa</sup>	p<0,01
	Pb	4,3 ± 0,7*	12 ± 1 <sup>*</sup> , <sup>bbb</sup>	14 ± 1 <sup>***</sup> , <sup>bbb</sup>	ns
Monocitos	basal	13 ± 2	48 ± 9 <sup>aa</sup>	66 ± 8 <sup>aaa</sup>	ns
	Pb	2,9 ± 0,3 <sup>***</sup>	11 ± 2 <sup>***</sup> , <sup>b</sup>	22 ± 2 <sup>***</sup> , <sup>bbb</sup>	p<0,001
Linfocitos T	basal	3,6 ± 0,5	13 ± 2 <sup>a</sup>	22 ± 3 <sup>aaa</sup>	p<0,01
	Pb	1,6 ± 0,2 <sup>***</sup>	5,3 ± 0,8 <sup>***</sup> , <sup>bb</sup>	8,6 ± 0,9 <sup>***</sup> , <sup>bbb</sup>	p<0,01
Linfocitos T CD8+	basal	3,7 ± 0,4	13 ± 2 <sup>aaa</sup>	19 ± 2 <sup>aaa</sup>	p<0,05
	Pb	1,8 ± 0,2 <sup>***</sup>	5,8 ± 0,7 <sup>**</sup> , <sup>bbb</sup>	7,8 ± 0,7 <sup>***</sup> , <sup>bbb</sup>	ns
Linfocitos T CD4+	basal	3,5 ± 0,5	13 ± 2 <sup>a</sup>	26 ± 3 <sup>aaa</sup>	p<0,001
	Pb	1,7 ± 0,2*	6,1 ± 0,7 <sup>**</sup> , <sup>bbb</sup>	10,4 ± 0,9 <sup>***</sup> , <sup>bbb</sup>	p<0,001
Linfocitos B	basal	2,9 ± 0,2	18 ± 1 <sup>aaa</sup>	16 ± 2 <sup>aaa</sup>	ns
	Pb	0,64 ± 0,05 <sup>***</sup>	7,4 ± 0,9 <sup>***</sup> , <sup>bbb</sup>	7,0 ± 0,8 <sup>***</sup> , <sup>bbb</sup>	ns
Linfocitos totales	basal	3,7 ± 0,5	13 ± 2 <sup>a</sup>	21 ± 3 <sup>aaa</sup>	p<0,05
	Pb	1,4 ± 0,1 <sup>***</sup>	6 ± 1 <sup>**</sup> , <sup>bb</sup>	10 ± 1 <sup>**</sup> , <sup>bbb</sup>	p<0,01

Se muestra la intensidad de fluorescencia de 5-clorometilfluoresceína (CMF) en condiciones basales y tras adición de Plumbagina (Pb) 10 ng/ml. Los datos son los mismos representados en la Figura 57. Los valores son la media ± SEM del número de sujetos estudiados (control n=19, sin EHM n=22, EHM n=28). Los valores significativamente diferentes tras adición de Pb y sus basales se indican con asteriscos (\*p<0,05; \*\* p<0,01; \*\*\*p<0,001). Los valores significativamente diferentes entre basales de los grupos de pacientes comparados con los de los controles se indican con 'a' (<sup>a</sup>p<0,05; <sup>aa</sup>p<0,01; <sup>aaa</sup>p<0,001) y las diferencias significativas tras adición de Pb entre los pacientes y los controles se indican con 'b' (<sup>b</sup>p<0,05; <sup>bb</sup>p<0,001).

TIOLES REDUCIDOS (GSH)

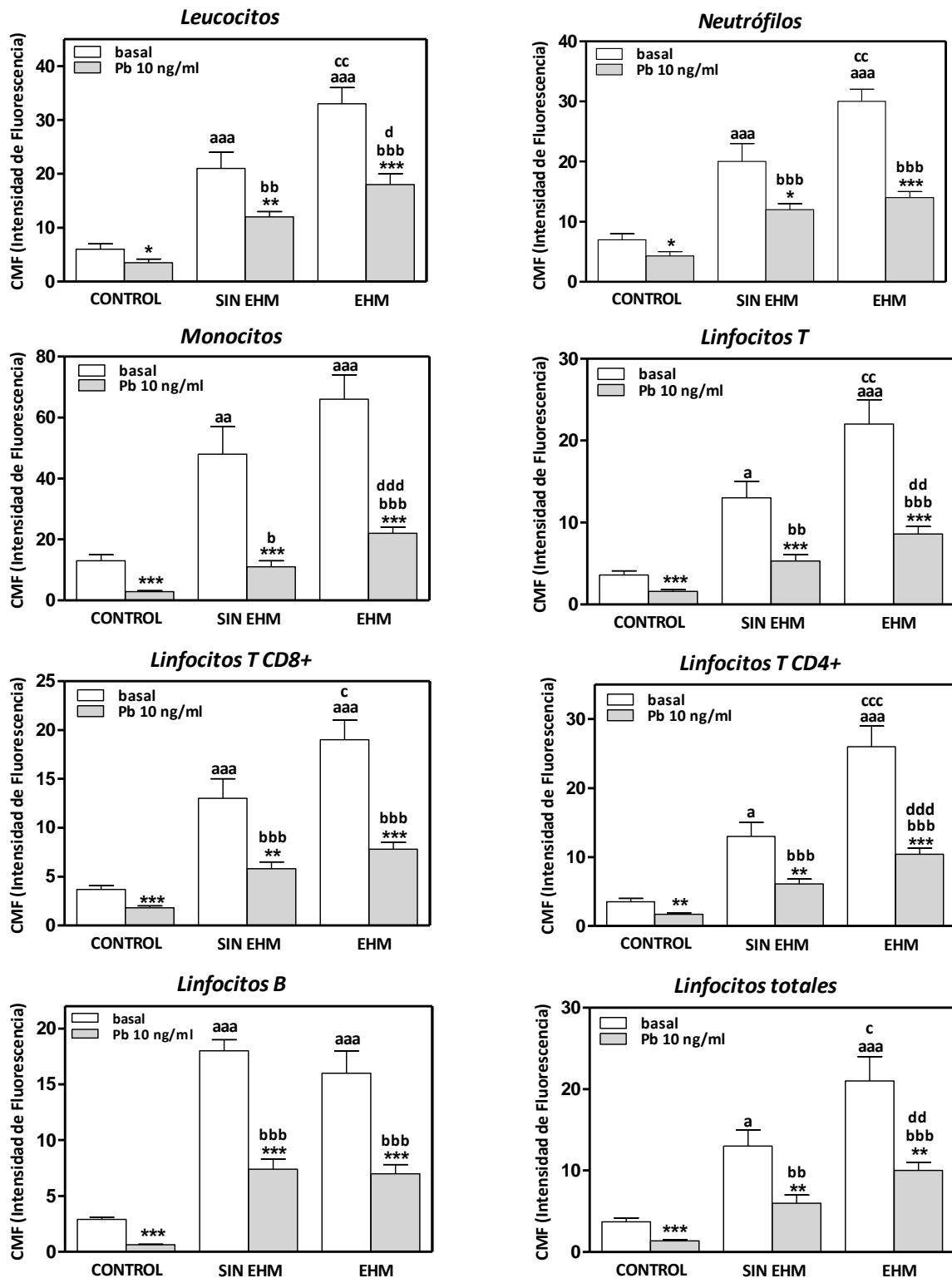


Figura 57. Niveles de tioles reducidos en condiciones basales y tras adición de Plumbagina (Pb) en los distintos tipos celulares. Se muestra la intensidad de fluorescencia (I.F.) tras adición de 5-clorometilfluoresceína (CMF) en condiciones basales (barras blancas) y tras la adición de Pb 10 ng/ml (barras grises) en las poblaciones celulares estudiadas. Los valores son la media  $\pm$  SEM del número de sujetos estudiados (control n=19, sin EHM n=22, EHM n=28). Los valores significativamente diferentes entre I.F. basal y tras adición de Pb en el mismo grupo de sujetos se indican con asteriscos; entre I.F. basal en pacientes respecto a controles con 'a'; entre I.F. tras adición de Pb en pacientes respecto a controles con 'b'; entre I.F. basal de pacientes con y sin EHM con 'c'; entre I.F. tras adición de Pb de pacientes con y sin EHM con 'd' (\*, a, b, c, d  $p < 0,05$ ; \*\*, aa, bb, cc, dd  $p < 0,01$ ; \*\*\*, aaa, bbb, ccc, ddd  $p < 0,001$ ).

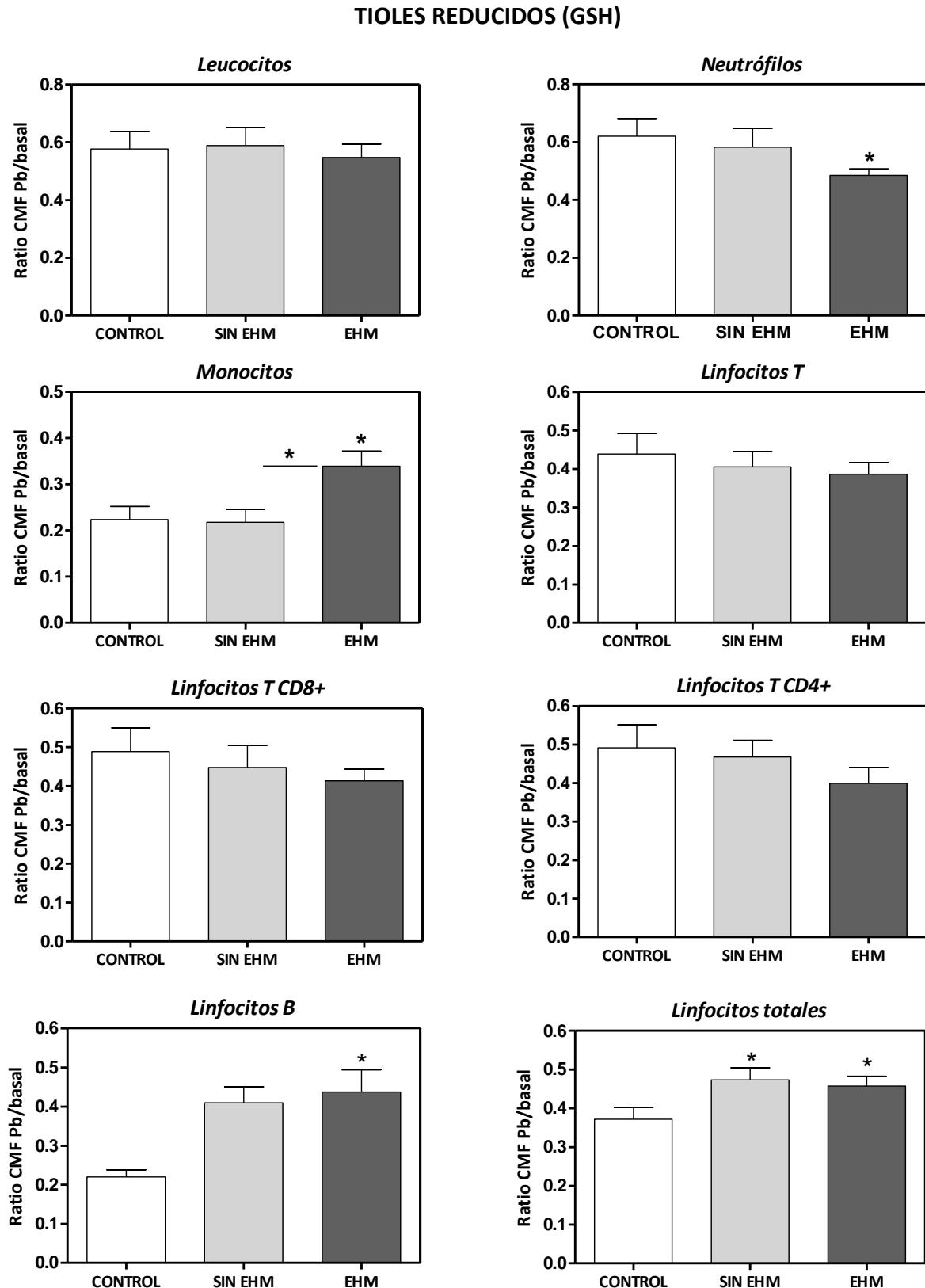
#### IV. Resultados

Tabla 26. Disminución de los niveles de tioles reducidos tras adición de Pb en las diferentes poblaciones celulares

Población celular	CONTROL	SIN EHM	EHM	SIN EHM vs EHM
	Ratio CMF Pb/basal			
Leucocitos	0,58 ± 0,06	0,59 ± 0,06	0,55 ± 0,05	ns
Neutrófilos	0,62 ± 0,06	0,58 ± 0,06	0,48 ± 0,02*	ns
Monocitos	0,22 ± 0,03	0,22 ± 0,03	0,34 ± 0,03*	p<0,05
Linfocitos T	0,44 ± 0,05	0,41 ± 0,04	0,39 ± 0,03	ns
Linfocitos T CD8+	0,49 ± 0,06	0,45 ± 0,06	0,41 ± 0,03	ns
Linfocitos T CD4+	0,49 ± 0,06	0,47 ± 0,04	0,40 ± 0,04	ns
Linfocitos B	0,22 ± 0,02	0,41 ± 0,04	0,44 ± 0,06*	ns
Linfocitos totales	0,37 ± 0,03	0,47 ± 0,03*	0,46 ± 0,02*	ns

Se muestran los ratios entre los niveles de fluorescencia de 5-clorometilfluoresceína (CMF) tras adición de plumbagina (Pb) 10 ng/ml y los basales. Los datos son los mismos representados en la Figura 58. Los valores son la media ± SEM del número de sujetos estudiados (control n=19, sin EHM n=22, EHM n=28). Los valores significativamente diferentes de los controles se indican con asteriscos (\*p<0,05).





**Figura 58. Disminución de los tioles reducidos inducida por Plumbagina en distintos tipos celulares.** Se muestra el ratio entre la intensidad de fluorescencia de 5-clorofluoresceína tras adición de Plumbagina (Pb) 10 ng/ml y en condiciones basales en las distintas poblaciones celulares. Los valores son la media  $\pm$  SEM del número de sujetos estudiados (control n=19, sin EHM n=22, EHM n=28). Los valores significativamente diferentes entre grupos se indican con asteriscos (\* $p < 0,05$ ).

### **5.7. Potencial de membrana mitocondrial**

El potencial de membrana mitocondrial se determina midiendo la fluorescencia emitida por la Tetrametilrodamina (TMRM). La despolarización de la membrana mitocondrial se realiza mediante la adición del agente despolarizante FCCP (Carbonyl cyanide 4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazone) 25  $\mu$ M.

El potencial de membrana mitocondrial en condiciones basales está disminuido en los pacientes con EHM respecto a los controles en todas las poblaciones celulares estudiadas excepto en Linfocitos T CD8+ y Linfocitos B. No hay diferencias significativas entre pacientes con y sin EHM en ninguna población celular (Tabla 27 y Figura 59).

En los pacientes sin EHM disminuye respecto a los controles en Monocitos, Linfocitos T CD4+ y Linfocitos totales (Tabla 27 y Figura 59).

Al añadir el agente despolarizante FCCP, el potencial de membrana mitocondrial disminuye en los controles pero apenas se modifica en los pacientes sin ó con EHM en todas las poblaciones celulares (excepto en Linfocitos B) aunque las diferencias sólo son significativas en Leucocitos, Monocitos y Linfocitos T. Ésto indica que en los pacientes ya existe una despolarización previa a la inducción de ésta, por lo que el efecto del FCCP es pequeño, mientras que los controles responden al FCCP, despolarizándose la membrana mitocondrial (Tabla 27 y Figura 59).

Para estudiar la respuesta del potencial de membrana a la despolarización por FCCP se calculó el ratio entre los niveles de fluorescencia de TMRM tras adición de FCCP y los basales. Este ratio es mayor (desciende menos) en Leucocitos y Monocitos de pacientes con ó sin EHM y, en Linfocitos T de pacientes con EHM que en los controles. Entre pacientes sin y con EHM no existen diferencias (Tabla 28 y Figura 60).

Tabla 27. Potencial de membrana mitocondrial en condiciones basales y tras adición de FCCP en las diferentes poblaciones celulares

Población celular		CONTROL	SIN EHM	EHM	SIN EHM vs EHM
		Intensidad de fluorescencia (I.F) de TMRM			
Leucocitos	basal	4,3 ± 0,6	3,2 ± 0,3	2,6 ± 0,2 <sup>a</sup>	Ns
	FCCP	2,6 ± 0,2*	2,7 ± 0,3	2,2 ± 0,2	Ns
Neutrófilos	basal	4,7 ± 0,7	3,7 ± 0,5	3,0 ± 0,2 <sup>a</sup>	Ns
	FCCP	3,0 ± 0,3	3,1 ± 0,4	2,5 ± 0,3	Ns
Monocitos	basal	7 ± 2	3,1 ± 0,5 <sup>a</sup>	2,8 ± 0,3 <sup>aa</sup>	Ns
	FCCP	3,0 ± 0,3*	2,0 ± 0,3*	1,8 ± 0,2*	Ns
Linfocitos T	basal	2,8 ± 0,4	1,9 ± 0,3	1,6 ± 0,1 <sup>a</sup>	Ns
	FCCP	1,7 ± 0,2*	1,4 ± 0,2	1,26 ± 0,09	Ns
Linfocitos T CD8+	basal	3,2 ± 0,4	2,7 ± 0,2	2,8 ± 0,3	Ns
	FCCP	2,5 ± 0,3	2,4 ± 0,2	2,5 ± 0,2	Ns
Linfocitos T CD4+	basal	2,8 ± 0,5	1,6 ± 0,2 <sup>a</sup>	1,3 ± 0,2 <sup>aa</sup>	Ns
	FCCP	1,7 ± 0,2	1,3 ± 0,2	1,0 ± 0,1	Ns
Linfocitos B	basal	1,8 ± 0,2	1,5 ± 0,2	1,4 ± 0,2	Ns
	FCCP	1,7 ± 0,3	1,1 ± 0,1	1,1 ± 0,1	ns
Linfocitos totales	basal	2,6 ± 0,3	1,7 ± 0,2 <sup>a</sup>	1,5 ± 0,1 <sup>aa</sup>	ns
	FCCP	1,9 ± 0,1	1,4 ± 0,1	1,2 ± 0,1	ns

Se muestra la intensidad de fluorescencia de tetrametilrodamina (TMRM) en condiciones basales y tras adición de FCCP 25  $\mu$ M (FCCP). Los datos son los mismos representados en la Figura 59. Los valores son la media  $\pm$  SEM del número de sujetos estudiados (control n=19, sin EHM n=22, EHM n=28). Los valores significativamente diferentes tras adición de FCCP y sus basales se indican con asteriscos (\*p<0,05). Los valores significativamente diferentes entre basales de los grupos de pacientes comparados con los de los controles se indican con 'a' (<sup>a</sup>p<0,05; <sup>aa</sup>p<0,01).

POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL

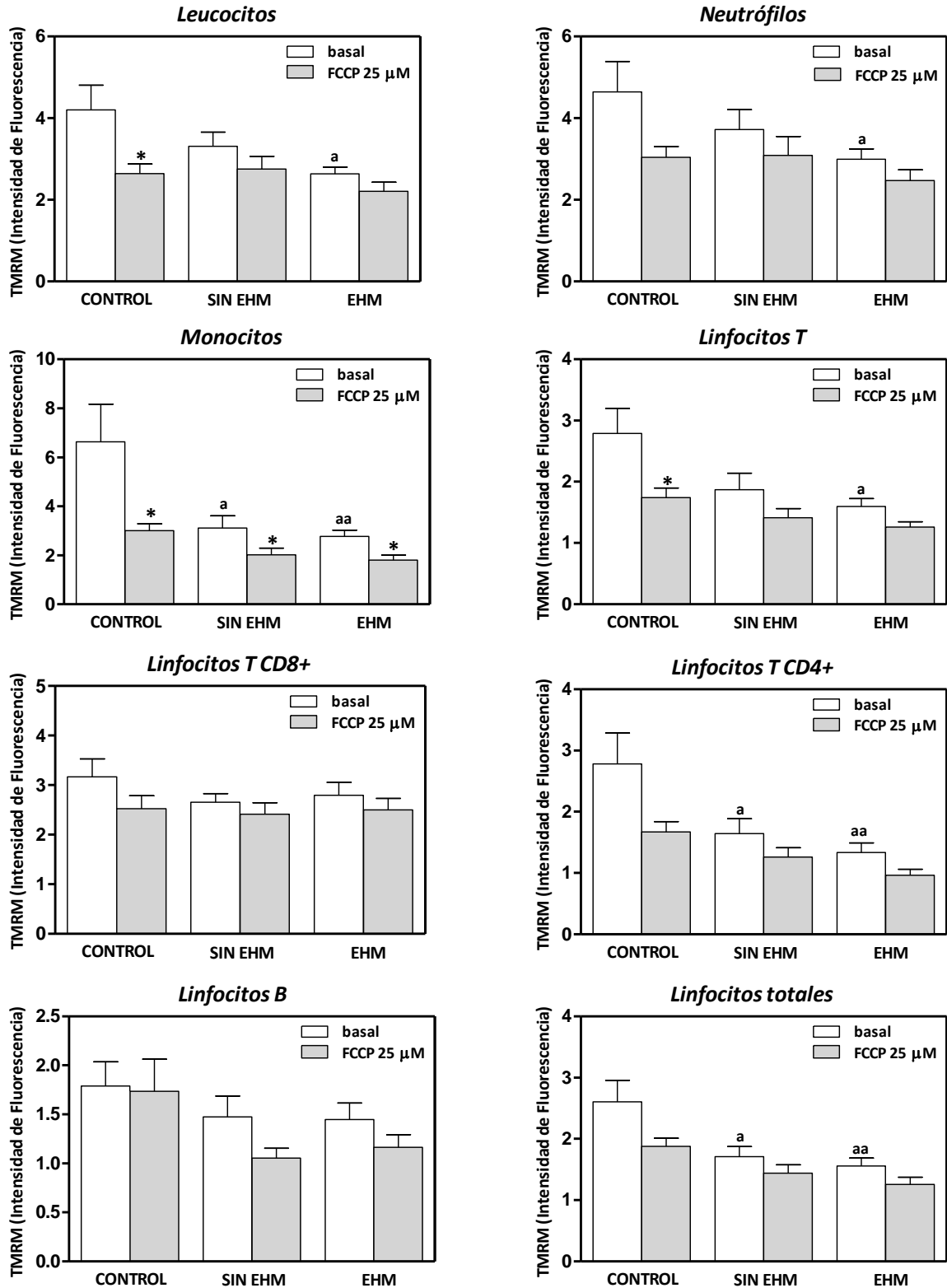


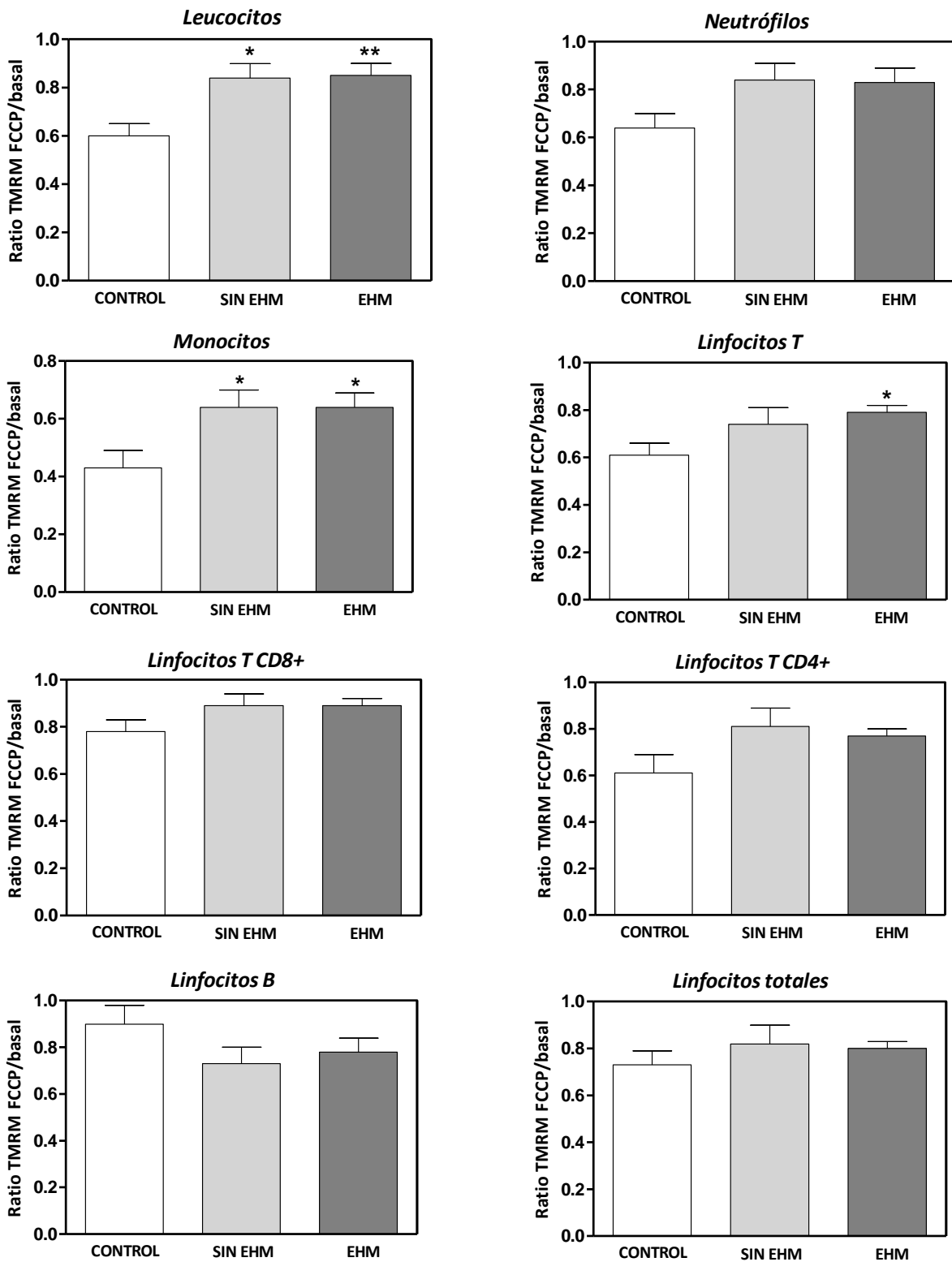
Figura 59. Potencial de membrana mitocondrial en condiciones basales y tras adición del FCCP en los distintos tipos celulares. Se muestra la intensidad de fluorescencia tras adición de tetrametilrodamina (TMRM) en condiciones basales (barras blancas) y tras la adición de FCCP 25 μM (barras grises) en las poblaciones celulares estudiadas. Los valores son la media ± SEM del número de sujetos estudiados (control n=19, sin EHM n=22, EHM n=28). Los valores significativamente diferentes entre I.F basal y tras adición de FCCP en el mismo grupo de sujetos se indican con asteriscos; entre I.F basal en pacientes respecto a controles con 'a'; entre I.F tras adición de FCCP en pacientes respecto a controles con 'b'; entre I.F basal de pacientes con y sin EHM con 'c'; entre I.F tras adición de FCCP de pacientes con y sin EHM con 'd' (\*,a,b,c,d p<0,05; \*\*,aa,bb,cc,dd p<0,01; \*\*\*,aaa,bbb,ccc,ddd p<0,001).

Tabla 28. Potencial de membrana mitocondrial tras despolarización con FCCP en las diferentes poblaciones celulares

Población celular	CONTROL	SIN EHM	EHM	SIN EHM vs EHM
	Ratio TMRM FCCP/basal			
Leucocitos	0,60 ± 0,05	0,84 ± 0,06*	0,85 ± 0,05**	Ns
Neutrófilos	0,64 ± 0,06	0,84 ± 0,07	0,83 ± 0,06	Ns
Monocitos	0,43 ± 0,06	0,64 ± 0,06*	0,64 ± 0,05*	Ns
Linfocitos T	0,61 ± 0,05	0,74 ± 0,07	0,79 ± 0,03*	Ns
Linfocitos T CD8+	0,78 ± 0,05	0,89 ± 0,05	0,89 ± 0,03	Ns
Linfocitos T CD4+	0,61 ± 0,08	0,81 ± 0,08	0,77 ± 0,03	Ns
Linfocitos B	0,94 ± 0,08	0,73 ± 0,07	0,78 ± 0,06	Ns
Linfocitos totales	0,73 ± 0,06	0,82 ± 0,08	0,80 ± 0,03	Ns

Se muestran los ratios entre los niveles de fluorescencia de tetrametilrodamina (TMRM) tras adición de FCCP y los basales. Los valores son los mismos representados en la Figura 60. Los valores son la media ± SEM del número de sujetos estudiados (control n=19, sin EHM n=22, EHM n=28). Los valores significativamente diferentes de los controles se indican con asteriscos (\*p<0,05; p<0,01).

POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL



**Figura 60. Potencial de membrana mitocondrial tras despolarización por FCCP en distintos tipos celulares.** Se muestra el ratio entre la intensidad de fluorescencia de Tetrametilrodamina (TMRM) tras adición de FCCP 25µM y en condiciones basales en las distintas poblaciones celulares estudiadas. Los valores son la media ± SEM del número de sujetos estudiados (control n=19, sin EHM n=22, EHM n=28). Los valores significativamente diferentes entre grupos se indican con asteriscos (\*p<0,05; \*\*p<0,01).

## **6. Correlación entre especies reactivas del oxígeno/nitrógeno en células de la serie blanca y el daño oxidativo, inflamación, hiperamonemia y alteraciones neurológicas en pacientes con EHM**

Las correlaciones entre las distintas especies reactivas del oxígeno/nitrógeno y cada uno de los parámetros bioquímicos analizados se presentan en las tablas 29 y 30 y, con cada uno de los tests psicométricos analizados en las tablas 31 y 32.

Los datos sobre el grado de significación (valores de  $r$  y  $p$ ) de las correlaciones que se comentan en este apartado se presentan en tablas 35-39 en el anexo I. Se comentan aquí sólo aquellas correlaciones que son significativas con valores de  $p \leq 0,01$  y  $r \leq -0,500$  ó  $\geq 0,500$ .

### **6.1. Correlaciones entre especies reactivas del oxígeno/nitrógeno y parámetros bioquímicos**

#### **6.1.1. Inflamación**

El aumento en suero de los niveles de IL-6 se correlaciona con:

1. Un aumento de peróxido de hidrógeno (DCF) basal en Linfocitos T CD8+ y CD4+.
2. Un aumento de óxido nítrico (DAF) basal en Linfocitos T CD4+ y Linfocitos totales.
3. Un aumento de tioles reducidos (CMF) basal en Leucocitos, Neutrófilos y Linfocitos T CD8+.

#### **6.1.2. GMPc plasmático**

El aumento de los niveles de GMPc en el plasma se correlaciona principalmente con:

1. Un aumento de peróxido de hidrógeno (DCF) en Neutrófilos.
2. Un aumento de óxido nítrico (DAF) basal en Linfocitos totales.
3. Un aumento de peróxidos/peroxinitrito en respuesta al aumento de superóxido (ratio DHR Pb/basal) en Linfocitos T CD8+ y Linfocitos totales.
4. Un aumento de tioles reducidos (CMF) basales en Leucocitos, Neutrófilos, Linfocitos T y Linfocitos T CD4+.

#### **6.1.3. Hiperamonemia**

El aumento de los niveles de amonio en sangre correlaciona con:

1. Un aumento de óxido nítrico (DAF) basal en Linfocitos totales.
2. Un aumento de tioles reducidos (CMF) basales en Leucocitos, Neutrófilos y Linfocitos T CD8+.

## **6.2. Correlaciones entre especies reactivas del oxígeno/nitrógeno y marcadores de daño oxidativo**

### **6.2.1. Ratio GSSG/GSH en sangre total**

El aumento del ratio GSSG/GSH correlaciona con:

1. Un aumento de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (DCF) basal en Neutrófilos.
2. Una disminución del superóxido celular (HE) basal en Neutrófilos, Linfocitos T, Linfocitos T CD8+ y Linfocitos totales.
3. Un aumento de superóxido mitocondrial inducido por Plumbagina (ratio MTX Pb/basal) en Linfocitos B.
4. Un aumento del óxido nítrico (DAF) basal en Leucocitos, Linfocitos T, Linfocitos T CD8+, Linfocitos T CD4+ y Linfocitos totales.
5. Una disminución del aumento de óxido nítrico inducido por NOR-1 (ratio DAF NOR-1/basal) en todas Leucocitos, Neutrófilos, Linfocitos T, Linfocitos T CD8+ y Linfocitos totales.
6. Un aumento de la formación de peróxidos/peroxinrito en respuesta al aumento de superóxido (ratio DHR Pb/basal) en todas las poblaciones celulares excepto en Neutrófilos y Linfocitos totales.
7. Un aumento de tioles reducidos (CMF) basales en todas las poblaciones celulares.

### **6.2.2. 3-Nitrotirosina (3-NT) en suero**

El aumento de los niveles séricos de 3-Nitrotirosina se correlaciona con:

1. Un aumento de la formación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en respuesta a un aumento de superóxido (ratio DCF Pb/basal) en Neutrófilos, Linfocitos T CD8+, Linfocitos T CD4+ y Linfocitos B.
2. Un aumento de la formación de peróxidos/peroxinrito en respuesta al aumento de superóxido (ratio DHR Pb/basal) en Leucocitos, Neutrófilos, Linfocitos T CD8+ y CD4+ y, Linfocitos B.

### **6.2.3. Malondialdehido (MDA) en suero**

El aumento de los niveles de MDA en suero se correlaciona principalmente con el aumento de tioles reducidos (CMF) basales en todas Leucocitos, Linfocitos T CD8+ y CD4+.

### **6.2.4. 8-Hidroxideoxiguanina (8-OHdG) en suero**

El aumento de los niveles de 8-OHdG en suero se correlaciona principalmente con el aumento del óxido nítrico basal en Linfocitos T CD8+.



### **6.3. Correlaciones entre especies reactivas del oxígeno/nitrógeno y alteraciones cognitivas**

#### **6.3.1. Puntuación en la batería de test psicométricos PHES**

Existe correlación entre la disminución en la puntuación global de la batería de test PHES para el diagnóstico de la EHM y:

1. Una disminución del superóxido celular (HE) basal en Linfocitos B.
2. Una disminución del aumento de superóxido mitocondrial inducido por Plumbagina (ratio MTX Pb/basal) en Linfocitos B.
3. Un aumento de óxido nítrico (DAF) basal en Linfocitos totales
4. Una disminución de los peróxidos/peroxinitrito (DHR) basales en Linfocitos B
5. Un aumento de la formación de peróxidos/peroxinitrito en respuesta al aumento de superóxido (ratio DHR Pb/basal) en Linfocitos T, Linfocitos T CD8+ y CD4+ y, Linfocitos totales.
6. Un aumento en los tioles reducidos (CMF) basales en todas las poblaciones celulares excepto en Monocitos y Linfocitos B.

#### **6.3.2. Atención selectiva-sostenida y concentración mental: test d2**

La disminución de la atención selectiva/sostenida y la concentración mental correlaciona principalmente con:

1. Una disminución del superóxido celular (HE) basal en Monocitos, Linfocitos T CD8+ y Linfocitos totales.
2. Un aumento de la formación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en respuesta a un aumento de superóxido (ratio DCF Pb/basal) en Neutrófilos y Monocitos.
3. Una disminución del aumento de óxido nítrico inducido por NOR-1 (ratio DAF NOR-1/basal) en todas las poblaciones celulares excepto en Linfocitos B.
4. Una disminución de peróxidos/peroxinitrito (DHR) basales en Linfocitos B
5. Un aumento de la formación de peróxidos/peroxinitrito en respuesta al aumento de superóxido (ratio DHR Pb/basal) en Linfocitos T CD4+.
6. Un aumento de los tioles reducidos (CMF) basales en Linfocitos T y Linfocitos T CD4+.

### **6.3.3. Atención selectiva (velocidad de procesamiento): test Stroop y test Oral de Claves**

La disminución en la velocidad de procesamiento, y por tanto en la atención selectiva correlaciona con:

1. Una disminución del superóxido celular (HE) basal en Leucocitos, Neutrófilos, Linfocitos T CD8+ y Linfocitos totales.
2. Un aumento del óxido nítrico (DAF) basal en Linfocitos totales
3. Una disminución del aumento de óxido nítrico inducido por NOR-1 (ratio DAF NOR-1/basal) en todas las poblaciones celulares, excepto en Linfocitos B.
4. Una disminución de los peróxidos/peroxinitrito (DHR) basales en Linfocitos B.
5. Un aumento de los tioles reducidos (CMF) basales en todas las poblaciones celulares excepto en Linfocitos B y Linfocitos totales.

### **6.3.4. Memoria de trabajo: tests orales de Dígitos y de Letras y Números**

La disminución en la memoria de trabajo se correlaciona con:

1. Una disminución del superóxido celular (HE) basal en Monocitos.
3. Una disminución del aumento de óxido nítrico inducido por NOR-1 (ratio DAF NOR-1/basal) en Monocitos y Linfocitos totales.
4. Un aumento de los tioles reducidos (CMF) basales en Leucocitos.

## **6.4. Correlaciones entre especies reactivas del oxígeno/nitrógeno y alteraciones motoras**

### **6.4.1. Coordinación bimanual**

La disminución de la coordinación bimanual (aumento del tiempo de realización de la tarea) se correlaciona con:

1. Un aumento del superóxido mitocondrial (MTX) basal en Linfocitos B
2. Una disminución del superóxido mitocondrial en respuesta a un aumento de superóxido (ratio MTX Pb/basal) en Linfocitos B.
3. Un aumento del óxido nítrico (DAF) basal en Linfocitos totales.
4. Una disminución del aumento de óxido nítrico inducido por NOR-1 (ratio DAF NOR-1/basal) en Linfocitos B.

6. Un aumento de los tioles reducidos (CMF) basales en Leucocitos, Monocitos, Linfocitos T, Linfocitos T CD8+ y CD4+.

#### **6.4.2. Coordinación visuomotora**

La disminución de la coordinación visuomotora (aumento del tiempo de realización de la tarea) se correlaciona con:

1. Una disminución del superóxido mitocondrial en respuesta a un aumento de superóxido (ratio MTX Pb/basal) en Linfocitos B.
2. Un aumento del óxido nítrico (DAF) basal en Linfocitos totales.
3. Una disminución del aumento de óxido nítrico inducido por NOR-1 (ratio DAF NOR-1/basal) en Linfocitos B.



Tabla 29. Correlaciones entre parámetros bioquímicos e indicadores de estrés oxidativo y especies reactivas del oxígeno/nitrógeno en condiciones basales ( $r \geq 0,500$  ó  $\leq -0,500$ ;  $p \leq 0,01$ ) y 3-Nitrotirosina ( $r \geq 0,390$  ó  $\leq -0,390$ ;  $p \leq 0,01$ )

CONDICIONES BASALES	Inflamación (IL-6 suero)	GMPc plasma	Amonio sangre	Nitratos y nitritos plasma	Ratio GSSG/GSH sangre	3-NT suero	MDA suero	8-OH-dG suero
PERÓXIDO HIDRÓGENO	X	X			X			
población celular	LT8, LT4	N			N			
SUPERÓXIDO CELULAR					X			
población celular					N, LT, LT8, Ltot			
SUPERÓXIDO MITOCONDRIAL								
población celular								
ÓXIDO NÍTRICO	X	X	X		X			X
población celular	LT4, Ltot	Ltot	Ltot		L, LT, LT8, LT4, Ltot			LT8
PEROXIDOS/PEROXINITRITO								
población celular								
TIOLES REDUCIDOS	X	X	X		X		X	
población celular	L, N, LT8	L, N, LT, LT4	L, N, LT8		L, N, M, LT, LT8, LT4, LB, Ltot		L, LT8, LT4	
POTENCIAL MEMB MITOCOND								
población celular								
3-NITROTIROSINA	X						X	

IL-6: Interleucina 6; GSSG/GSH: Glutatión oxidado/reducido; 3-NT: 3-Nitrotirosina; MDA: Malondialdehído; 8-OH-dG: 8-hidroxiideoxiguanina; L: leucocitos; N: neutrófilos; M: monocitos; LT: linfocitos T; LT8: linfocitos T CD8+; LT4: linfocitos T CD4+; LB: linfocitos B; Ltot: linfocitos totales

Tabla 30. Correlaciones entre parámetros bioquímicos e indicadores de estrés oxidativo y especies reactivas del oxígeno/nitrógeno tras la adición de un agente inductor de estrés oxidativo  $r \geq 0,500$  ó  $\leq -0,500$ ;  $p \leq 0,01$ )

RESPUESTA A UN AGENTE INDUCTOR DE ESTRÉS OXIDATIVO/NITROSATIVO	Inflamación (IL-6 suero)	GMPC plasma	Amonio sangre	Nitratos y nitritos plasma	Ratio GSSG/GSH sangre	3-NT suero	MDA suero	8-OH-dG suero
PERÓXIDO HIDRÓGENO tras Pb						X		
población celular						N, LT8, LT4, LB		
SUPERÓXIDO CELULAR tras Pb								
población celular								
SUPERÓX MITOCONDRIAL tras Pb					X			
población celular					LB			
ÓXIDO NÍTRICO tras NOR-1					X			
población celular					L, N, LT, LT8, Ltot			
PEROXIDOS/PEROXINITRITO tras Pb		X			X	X		
población celular	LT8, Ltot				L, M, LT, LT8, LT4, LB	L, N, LT8, LT4, LB		
TIOLES REDUCIDOS tras Pb								
población celular								
POTEN MEMB MITOCON tras FCCP								
población celular								

Pb: Plumbagina (productor de superóxido); NOR-1 (productor de NO); FCCP (agente despolarizante); IL-6: Interleucina 6; GSSG/GSH: Glutatión oxidado/reducido; 3-NT: 3-Nitrotirosina; MDA: Malondialdehído; 8-OH-dG: 8-hidroxi-deoxiguanina; L: leucocitos; N: neutrófilos; M: monocitos; LT: linfocitos T; LT8: linfocitos T CD8+; LT4: linfocitos T CD4+; LB: linfocitos B; Ltot: linfocitos totales

Tabla 31. Correlaciones entre alteraciones neurológicas y especies reactivas del oxígeno/nitrógeno en condiciones basales ( $r \geq 0,500$  ó  $\leq -0,500$ ;  $p \leq 0,01$ ) y 3-Nitrotirosina ( $r \geq 0,340$  ó  $\leq -0,340$ ;  $p \leq 0,01$ )

CONDICIONES BASALES	PHES	Atención selectiva-sostenida y concentración (d2)	Atención selectiva (Stroop; Oral de Claves)	Memoria de trabajo (Oral de Dígitos; Letras y Números)	Coordinación bimanual	Coordinación visuomotora
PERÓXIDO HIDRÓGENO						
población celular						
SUPERÓXIDO CELULAR	X	X	X	X		
población celular	LB	M, LT8, Ltot	L, N, LT8, Ltot	M		
SUPERÓXIDO MITOCONDRIAL					X	
población celular					LB	
ÓXIDO NÍTRICO	X		X		X	X
población celular	Ltot		Ltot		Ltot	Ltot
PEROXIDOS/PEROXINITRITO	X	X	X			
población celular	LB	LB	LB			
TIOLES REDUCIDOS	X	X	X	X	X	
población celular	L, N, LT, LT8, LT4, Ltot	LT, LT4	L, N, M, LT, LT8, LT4	L	L, M, LT, LT8, LT4	
POTENCIAL MEMB MITOCOND						
población celular						
3-NITROTIROSINA	X	X	X	X	X	X

PHES: Psychometric Hepatic Encephalopathy Score; LTT: Línea Quebrada; L: leucocitos; N: neutrófilos; M: monocitos; LT: linfocitos T; LT8: linfocitos T CD8+; LT4: linfocitos T CD4+; LB: linfocitos B; Ltot: linfocitos totales

Tabla 32. Correlaciones entre alteraciones neurológicas y especies reactivas del oxígeno/nitrógeno tras la adición de un agente inductor de estrés oxidativo ( $r \geq 0,500$  ó  $\leq -0,500$ ;  $p \leq 0,01$ )

RESPUESTA A UN AGENTE INDUCTOR DE ESTRÉS OXIDATIVO/NITROSATIVO	PHES	Atención selectiva-sostenida y concentración (d2)	Atención selectiva (Stroop; Oral de Claves)	Memoria de trabajo (Oral de Dígitos; Letras y Números)	Coordinación bimanual	Coordinación visuomotora
PERÓXIDO HIDRÓGENO tras Pb		X				
población celular		N, M				
SUPERÓXIDO CELULAR tras Pb						
población celular						
SUPERÓX MITOCONDRIAL tras Pb	X				X	X
población celular	LB				LB	LB
ÓXIDO NÍTRICO tras NOR-1		X	X	X	X	X
población celular		L, N, M, LT, LT8, LT4, Ltot	L, N, M, LT, LT8, LT4, Ltot	M, Ltot	LB	LB
PEROXIDOS/PEROXINITRITO tras Pb	X	X				
población celular	LT, LT8, LT4, Ltot	LT4				
TIOLES REDUCIDOS tras Pb						
población celular						
POTEN MEMB MITOCON tras FCCP						
población celular						

Pb: Plumbagina (productor de superóxido); NOR-1 (productor de NO); FCCP (agente despolarizante); PHES: Psychometric Hepatic Encephalopathy Score; LTT: Línea Quebrada; L: leucocitos; N: neutrófilos; M: monocitos; LT: linfocitos T; LT8: linfocitos T CD8+; LT4: linfocitos T CD4+; LB: linfocitos B; Ltot: linfocitos totales



## **V. DISCUSIÓN**



## 1. Alteraciones cognitivas y motoras en pacientes cirróticos con EHM

La encefalopatía hepática (EH) es una consecuencia del fallo hepático y conlleva un amplio rango de alteraciones neuropsiquiátricas desde ligeros cambios en la personalidad o alteraciones en el ciclo sueño-vigilia hasta alteraciones en la función cognitiva, en la coordinación motora y en el grado de consciencia. Entre el 30 y el 50% de los pacientes con cirrosis que no muestran signos clínicos de EH presentan encefalopatía hepática mínima (EHM) con un leve deterioro cognitivo.

Los pacientes con EHM pueden presentar diversos déficits cognitivos (percepción visuo-espacial, atención, concentración) y motores (enlentecimiento psicomotor) que no son detectables en un examen neurológico rutinario pero se ponen de manifiesto cuando se realizan tests psicométricos específicos (Amodio et al, 2004).

Las alteraciones en la atención, velocidad de procesamiento de la información, coordinación motora, etc, tienen importantes consecuencias en la vida diaria de los pacientes (Dhiman and Chawla, 2009). Por ejemplo, la mayoría de los pacientes cirróticos con EHM tiene disminuida la capacidad de conducir vehículos (Schomerus et al, 1981; Bajaj et al, 2009; Felipo et al, 2013) y muestran un aumento del número de accidentes domésticos, laborales y de tráfico y de caídas y de hospitalizaciones (Román et al, 2011).

Se ha llegado a un consenso para diagnosticar la presencia de EHM utilizando los mismos tests psicométricos en todos los hospitales. Para ello se seleccionó en 2002 como batería de referencia, la denominada PHES (Psychometric Hepatic Encephalopathy Score), compuesta por cinco tests que evalúan 1) velocidad de procesamiento (test de Dígitos y Símbolos, Conexión Numérica A y B); 2) memoria de trabajo (test de Dígitos y Símbolos); 3) atención (test de Conexión Numérica A y B) y, 4) coordinación visuoespacial (test de Puntos Seriados y Línea Quebrada) (Weissenborn et al, 2001; Ferenci et al, 2002).

Para evaluar la presencia o no de EHM, los resultados de los tests de cada paciente han de ser corregidos en función de su edad y nivel educativo y han de ser referidos a los obtenidos por la población general sin EHM, que varían ligeramente según los países.

En España, la puntuación de cada test de la batería PHES y la global se obtienen mediante una aplicación informática utilizando los valores de referencia obtenidos para la población española normal por la Red Española de Encefalopatía Hepática (Romero-Gómez et al, 2006). La aplicación se encuentra en la página web <http://www.redeh.org> y tiene en cuenta

la edad y el nivel de estudios de los sujetos evaluados. Se considera que un paciente tiene EHM cuando la puntuación global es -4 o menor. El paciente puede tener EHM debido a alteraciones cognitivas, motoras o al conjunto de ambos tipos, siendo éste el caso más frecuente (Felipo et al, 2012).

El principal beneficio de la utilización de la batería PHES es que permite comparar resultados de distintos estudios realizados en cualquier Hospital, lo cual no era posible anteriormente debido a la diversidad de tests utilizados en cada estudio.

Nuestra experiencia nos ha demostrado que la batería PHES utiliza tests que no son los más sensibles para discernir finamente alteraciones en algunas de las funciones cognitivas y motoras alteradas en pacientes con EHM. Además, en los tests del PHES que evalúan atención, velocidad de procesamiento o memoria de trabajo existe un componente motor, ya que los tests se realizan por escrito. Tampoco permiten evaluar finamente por separado la memoria de trabajo y la atención. Muchos tests de memoria dependen de la atención, y resulta difícil saber a qué alteración atribuir un error, a la atención o a la memoria. El PHES es una herramienta útil para diagnosticar homogéneamente la EHM pero no para realizar una investigación fina de funciones cognitivas específicas como atención ó memoria. Existen otros tests que permiten diferenciar entre atención y memoria, siendo uno de ellos el de retención de dígitos (Tewes, 1991) que mide la memoria a corto plazo.

La frecuencia crítica de parpadeo (FCP) se propuso como método alternativo para el diagnóstico de la EHM (Kircheis et al, 2002), y aunque generalmente los pacientes cirróticos con EHM tienen menor FCP, el procedimiento se ve en algunos casos afectado por alteraciones visuales del individuo, dificultando la tarea y la interpretación de los resultados obtenidos.

En esta tesis, además de utilizar la batería PHES y la FCP, hemos analizado con más detalle diferentes funciones cognitivas y motoras mediante la utilización de diversos tests que nos permiten evaluar de manera más precisa algunas alteraciones neurológicas concretas (déficits de atención, coordinación bimanual y visuomotora...) en los pacientes con EHM.

## **1.1. Alteraciones cognitivas en pacientes con EHM**

### **1.1.1. Atención selectiva**

Para la evaluación de la atención selectiva, la velocidad psicomotora y flexibilidad cognitiva, se utilizó el test de Stroop de Colores y Palabras (Stroop, 1935). Los resultados indican que los pacientes con EHM muestran un déficit en la atención selectiva, obteniendo peores resultados en el test que los sujetos control y que los pacientes sin EHM, los cuales no se diferencian de los controles. Por tanto, este test es un buen predictor de EHM, como se ha demostrado recientemente en paralelo a nuestro estudio (Bajaj et al, 2013). Este test tiene como ventaja que no requiere una alta capacidad intelectual del individuo (sólo lectura y colores), tiene en cuenta la edad del sujeto y requiere poco tiempo para su realización (menos de 3 minutos), lo cual es una ventaja para la práctica clínica de rutina. Las limitaciones del test residen en que en los individuos con alta frecuencia de lectura ó con dificultades para diferenciar colores se genera una interferencia mayor a la esperada.

Otra prueba de atención selectiva y velocidad de procesamiento mental es el test de Claves oral. Este test pertenece a la batería WAIS (*Wechsler Adult Intelligence Scale*) que evalúa diferentes funciones cognitivas. Los pacientes con EHM tienen un importante déficit de atención y en la velocidad de procesamiento en comparación con los controles y con los pacientes sin EHM. Los pacientes sin EHM presentan menor velocidad de procesamiento, ya que no son capaces de realizar tantos ítems como los controles. Esto indica que algunos pacientes que la batería PHES clasifica como 'sin EHM' presentan en realidad una menor velocidad de procesamiento mental que no es detectada por el PHES pero sí con el test de Claves oral. Por tanto, el análisis de la velocidad de procesamiento podría detectar la presencia de EHM con mayor sensibilidad que el PHES. Por otra parte, el hecho de que pacientes sin EHM según el PHES tengan disminuida la velocidad de procesamiento mental indica que ésta es una de las alteraciones más tempranas en pacientes con cirrosis, conduciendo a la EHM.

Tanto el Stroop como el test oral de Claves son predictivos de la EHM y muestran una buena sensibilidad y especificidad, siendo mayor en el test oral de Claves (sensibilidad del 86% y especificidad del 83%) que en el Stroop, en el cual el mejor parámetro diagnóstico de EHM es la tarea congruente (nº palabras) con una sensibilidad de 84% y especificidad de 68%.

### 1.1.2. Atención selectiva-sostenida y concentración mental

Para el estudio de la atención selectiva/sostenida y la concentración mental, se analiza la capacidad de atender selectivamente a ciertos aspectos relevantes de la tarea mientras se ignoran los irrelevantes de una forma rápida y precisa. Para evaluarla utilizamos el test d2. Este test proporciona diversos parámetros que nos permiten obtener información sobre diferentes alteraciones cognitivas de una manera concisa. Los resultados de este test, indican un déficit en la atención selectiva/sostenida y la concentración mental en los pacientes con EHM en comparación con los controles y los pacientes sin EHM. Los pacientes sin EHM también muestran cierto déficit en comparación con los controles, ya que se encuentran en percentiles inferiores en parámetros que miden velocidad de procesamiento (TR), precisión del procesamiento (TA), efectividad total de la prueba y control atencional e inhibitorio (TOT) y concentración (CON). Este efecto en los pacientes sin EHM sugiere que en estos sujetos ya existe un déficit atencional que el PHES no es capaz de detectar, indicando que estas alteraciones neurológicas se producen tempranamente en EHM.

Cabe señalar que los sujetos control se encuentran en percentiles más altos que la población normal (n=112) tipificada en los baremos proporcionados por el autor del test en el año 1981. Este test tiene en cuenta la edad del sujeto y no se afecta por el nivel intelectual ya que se basa en el reconocimiento de ítems, tarea que se ensaya previamente. Esto sugiere que tal vez, estos baremos deberían ser actualizados en la población española actual analizando un mayor número de individuos.

Este test se ha utilizado en estudios en pacientes con esquizofrenia, epilepsia, síndrome psicológico difuso, demencia o Alzheimer, recogidos en la adaptación del *Manual del test de atención d2* (Brickenkamp, 2009). Los resultados de estos estudios mostraron en estos pacientes deficiencias en el test d2, siendo TOT (efectividad en la realización de la tarea) y CON (índice de concentración) los parámetros más relevantes indicando que el test d2 es capaz de detectar el déficit atencional asociado a dichas patologías.

El test d2 se ha utilizado también en un estudio en pacientes con cirrosis alcohólica descompensada y pancreatitis (Hamster et al, 1982) en el que se utilizaron también otros tests para evaluar la atención y concentración. Los cirróticos alcohólicos mostraron un déficit en la realización del test d2, principalmente en los parámetros TOT y CON. En esta tesis demostramos que los pacientes con EHM presentan un mayor déficit en la realización de este test que los cirróticos sin EHM, en los parámetros TOT y CON, pero también en otros

parámetros como TA (total de aciertos) y TR (velocidad de procesamiento mental y cantidad de trabajo realizado).

Este déficit atencional y en la concentración implica un deterioro de la calidad de vida del paciente con EHM, dificultando la realización de tareas que requieran estas funciones cognitivas, por ejemplo la conducción de vehículos.

Los resultados de esta tesis demuestran que el test d2 es una buena herramienta para el diagnóstico de EHM, siendo un test rápido, de fácil realización y capaz de analizar a la vez, por separado, diferentes funciones cognitivas relacionadas con la atención.

El análisis mediante regresión logística y curvas ROC corrobora la capacidad diagnóstica de EHM del test d2. Todas las medidas que proporciona este test (TOT: efectividad, CON: concentración, TR: velocidad de procesamiento y cantidad de trabajo realizado; TA: aciertos) son útiles para el diagnóstico de EHM, mostrando similar capacidad predictiva y áreas bajo la curva altas (0,852-0,896). La sensibilidad y especificidad también son similares (83-86% y 73-78%, respectivamente).

### **1.1.3. Memoria de trabajo**

En el estudio de la memoria de trabajo mediante los tests de Dígitos y Letras y Números (batería WAIS) observamos que los pacientes con EHM son capaces de memorizar un menor número de series de ítems que los controles y pacientes sin EHM, presentando un déficit en la memoria de trabajo. Además los pacientes sin EHM también muestran una disminución significativa de la memoria de trabajo en comparación con los controles, lo cual sugiere que esta función cognitiva se ve afectada desde la fase más temprana de EHM, y el PHES no es capaz de detectar este déficit en algunos pacientes sin EHM.

El déficit en la memoria de trabajo afecta a la capacidad de procesar y almacenar información verbal y visuoespacial afectando a la vida diaria de los pacientes pudiendo producir olvidos ó desorientación.

El análisis por regresión logística y curvas ROC muestra una escasa capacidad predictiva y áreas bajo la curva bajas, por lo que no sería adecuado para el diagnóstico de EHM.

## **1.2. Alteraciones en la coordinación motora**

Los pacientes con EHM tienen disminuida la coordinación bimanual y visuomotora, puesto que necesitan más tiempo para realizar la tarea que los sujetos sanos y que los pacientes sin EHM, encontrándose en percentiles menores en las tablas de normalidad poblacional.

Los pacientes sin EHM también tienen peor coordinación que los sujetos control. Nuestros controles se encuentran en percentiles superiores a la población normal en las tablas de tipificación de los tests generadas en 1978 (percentil 70 en Bimanual y 80 en Visuomotora). Una posible causa puede ser la falta de heterogeneidad de la población (trabajadores de ensamblaje) utilizada para la confección de las tablas de tipificación de ambos tests realizadas en los años setenta. Es posible que desde entonces pueda haber aumentado el grado de habilidad manipulativa debido a la utilización habitual de nuevas tecnologías que la requieren.

En cualquier caso, es evidente la disminución de la coordinación bimanual y visuomotora en los pacientes con EHM comparado con los controles y los pacientes sin EHM.

El déficit en los pacientes sin EHM, nos indica que la coordinación motora se ve afectada en una fase temprana de la EHM, incluso antes de que pueda ser detectada por el PHES. Butz et al (2010), realizaron un estudio sobre alteraciones motoras, como temblor, ataxia y actividad manual (test de Annett) en pacientes con cirrosis sin y con EHM, y sus resultados muestran que los pacientes cirróticos con y sin EHM muestran mayor ataxia y enlentecimiento de los movimientos manuales que los sujetos sanos. Ésto indica que los cirróticos sin EHM ya empiezan a mostrar déficits motores, por lo que es una de las alteraciones neurológicas más tempranas en la EHM.

Las consecuencias en la vida diaria de las alteraciones en la coordinación motora son un empeoramiento de la calidad de vida, pudiendo sufrir caídas, hospitalizaciones y un enlentecimiento psicomotor que afecta también a tareas como la conducción de vehículos.

En conclusión, los pacientes con EHM muestran déficits cognitivos, principalmente en atención (tanto selectiva como sostenida, velocidad de procesamiento mental y concentración), memoria de trabajo y, alteraciones en la coordinación motora. Estas alteraciones serían las más tempranas en la progresión de la EHM y se pueden detectar también en pacientes que la batería PHES clasifica como sin EHM.



## 2. Alteraciones bioquímicas en pacientes cirróticos con EHM

La EH y la EHM son consecuencia del fallo hepático. Es importante identificar cuáles son los factores asociados al fallo hepático, involucrados en la EHM, que afectan la función cerebral. Ésto puede permitir identificar marcadores tempranos de EHM y diseñar tratamientos para revertirla o prevenir su progresión.

Los principales factores que contribuyen a la patogenia de la EHM son el amonio y la inflamación (Shawcross et al. 2004; Montoliu et al. 2009; Felipo et al, 2013).

Nuestro grupo, entre otros, ha demostrado que la hiperamonemia y la inflamación (con aumento de IL-6 e IL-18 en suero) son los principales factores que contribuyen a la EHM y actúan sinérgicamente en la inducción del deterioro neurológico (Shawcross et al. 2004, 2007; Cauli et al. 2007; Montoliu et al. 2009; Felipo et al, 2012). También se ha descrito en otras enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer que la neuroinflamación juega un papel importante en el deterioro cognitivo (Szekely et al. 2004; Maccioni et al. 2009) y que el amonio podría contribuir a la demencia en dicha patología (Seiler 1993, 2002).

Los pacientes cirróticos sin y con EHM presentan hiperamonemia, que alcanza niveles similares en ambos grupos. El amonio es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica (BHE) induciendo alteraciones en el sistema nervioso central. Se ha demostrado que la hiperamonemia crónica altera la vía glutamato-óxido nítrico-GMPc en cerebro, resultando en un menor aumento del óxido nítrico que activa la guanilato soluble conduciendo a un menor aumento del GMPc que es responsable de algunos tipos de deterioro cognitivo (Felipo et al, 2013). La activación de la guanilato ciclasa directamente por óxido nítrico está aumentada en corteza cerebral de pacientes fallecidos con EH (Rodrigo et al, 2004) y en linfocitos de pacientes con EHM (Corbalan et al, 2002). En plasma los pacientes cirróticos presentan niveles aumentados de GMPc y de nitratos/nitritos, pero sólo el aumento de GMPc es mayor en cirróticos con que sin EHM (Montoliu et al, 2007).

Se ha demostrado que la inflamación agrava las alteraciones neurológicas producidas por la hiperamonemia en pacientes cirróticos y que, además determina el grado de severidad de la EH en pacientes cirróticos con EH avanzada (Shawcross et al. 2004, 2011). Nuestro grupo, realizó un amplio estudio de citocinas pro-inflamatorias en pacientes cirróticos, demostrando que los niveles de IL-6 e IL-18 en suero están aumentados tanto en los cirróticos sin EHM como con EHM, pero los pacientes con EHM muestran un aumento mucho mayor que los pacientes sin EHM. Además, los niveles de IL-6 e IL-18 correlacionan con la presencia y grado de EHM,

indicando que la inflamación es un contribuyente esencial al deterioro neurológico en la EHM (Montoliu et al, 2009).

Los resultados de esta tesis coinciden con estos datos previos, mostrando: 1) hiperamonemia similar en pacientes sin y con EHM; 2) aumento de nitratos/nitritos en plasma similar en pacientes sin y con EHM; 3) aumento mayor de GMPc en plasma en pacientes con EHM que sin EHM y 4) mayor aumento de IL-6 e IL-18 en suero en pacientes con EHM que sin EHM.

Además, existe una correlación entre la inflamación (niveles de IL-6 e IL-18) y el resultado obtenido los tests neurológicos (PHES, Stroop, d2 y tests de coordinación bimanual y visuomotora). Los resultados en el test oral de Claves y Letras y Números correlacionan sólo con la IL-18. Ésto confirma el papel de la inflamación en el deterioro cognitivo (velocidad de procesamiento, atención, memoria de trabajo, concentración) y motor en la EHM. La hiperamonemia correlaciona con alteraciones cognitivas y motoras en algún test (PHES, test oral de Dígitos y coordinación visuomotora) pero no en otros (Tabla 8).

La inflamación e hiperamonemia actúan sinérgicamente causando alteraciones neurológicas en la EHM. Los pacientes con EHM presentan niveles similares de amonio pero mucho mayores de inflamación (IL-6 e IL-18) en sangre que los sin EHM. El hecho de que la inflamación esté relacionada con más alteraciones neurológicas que la hiperamonemia, indica que sería el grado de inflamación principalmente el que determina el desarrollo de las alteraciones neurológicas.

### **3. Estrés oxidativo en pacientes cirróticos con EHM**

#### **3.1. Daño oxidativo/nitrosativo y mecanismos antioxidantes**

El estrés oxidativo se origina cuando existe un desequilibrio entre los mecanismos antioxidantes y los agentes prooxidantes, a favor de estos últimos.

Diversos estudios han mostrado que existe estrés oxidativo durante la cirrosis, aunque los resultados son muy diversos. Gerli et al (1992) encontraron en eritrocitos de pacientes cirróticos una disminución de GSH y en actividades catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GPx) mientras que la actividad superóxido dismutasa (SOD) no mostraba cambios. Sin embargo, Geetha et al (2007) muestran aumento de actividad GPx y de marcadores de estrés oxidativo

(peróxidos/hidroperóxidos lipídicos, óxido nítrico) y, una disminución de GSH, de actividad CAT y SOD en eritrocitos de pacientes cirróticos. Ergün et al (2011) en cambio describen un aumento del GSH y de la actividad SOD y CAT en eritrocitos, un aumento de nitratos/nitritos en suero y de MDA en plasma y un aumento no significativo en nitrotirosina plasmática. Otros estudios muestran que hay una disminución de la actividad SOD y GPx en eritrocitos de pacientes cirróticos y un aumento en plasma de productos de peroxidación lipídica (TBARS) aludiendo a un estrés oxidativo extracelular (Nalini et al, 1999). Por el contrario, Szuster-Ciesielska et al (2002) muestran un aumento de la actividad SOD y CAT en plasma de pacientes con cirrosis.

Siqueira et al (2008) observaron una disminución del GSH en plasma y un aumento de NO y GMPc en pacientes cirróticos. Spahr et al. (2007) también mostraron un aumento de peroxidación lipídica (MDA) en plasma de pacientes con cirrosis.

En la mayoría de estudios realizados, la disminución de las actividades antioxidantes bien en eritrocitos o en otros tipos de muestras, son considerados por los autores como causa del estrés oxidativo en dichos pacientes, argumentando un desequilibrio entre los mecanismos antioxidantes y prooxidantes a favor de los últimos. Esta hipótesis está presente desde hace dos décadas (Nordmann et al, 1994).

Aunque hay numerosos estudios sobre estrés oxidativo en cirrosis, en ellos no se ha analizado la presencia de EHM por lo que no se sabe si algunos pacientes presentan EHM ó no. Por tanto, se sabe poco del papel que puede tener el estrés oxidativo en la patogenia de la encefalopatía hepática mínima. Uno de los objetivos principales de esta tesis es avanzar en el conocimiento de este papel.

Existen algunos estudios en pacientes con encefalopatía hepática (EH) clínica en los cuales se encontraron valores elevados de radicales libres, y una capacidad antioxidante disminuida en pacientes con EH por cirrosis hepática por consumo de alcohol (Negru et al, 1999).

Estudios realizados en cerebros de pacientes cirróticos fallecidos con y sin EH muestran un aumento de marcadores de estrés oxidativo en el córtex cerebral de los pacientes con EH pero no en los sin EH, con un aumento de nitración de residuos tirosina de proteínas de entre 20-75 kDa y aumento de oxidación de ADN (8-hidroxiguanosina). En pacientes con EH no encontraron diferencias en la expresión de la SOD (Görg et al, 2010). Este mismo grupo, también ha demostrado recientemente un aumento en la expresión de genes de enzimas

antioxidantes (Hemooxigenasa-1, Selenoproteína-V, Peroxiredoxina-4 ó PPAR $\alpha$ ) en corteza cerebral de pacientes fallecidos con EH (Görg et al, 2013).

Estos datos sugieren que el estrés oxidativo podría contribuir a las alteraciones cerebrales y al deterioro neurológico en encefalopatía hepática clínica. No se ha estudiado su posible papel en la EHM.

Nuestro grupo ha realizado investigaciones en los últimos años para identificar algún biomarcador periférico útil para diagnosticar la EHM, ya que durante esta fase no hay síntomas evidentes de EH y es importante el diagnóstico precoz para prevenir que el paciente desarrolle EH clínica. Hemos demostrado que los pacientes cirróticos con EHM tienen los niveles de 3-nitrotirosina (3-NT) libre en suero muy aumentados con respecto a los pacientes sin EHM. La determinación de 3-NT en suero tiene una alta capacidad diagnóstica de EHM con alta sensibilidad (89%), especificidad (93%) y valor predictivo positivo y negativo (91%) (Montoliu et al, 2011).

La 3-NT es un indicador de estrés oxidativo/nitrosativo ya que se forma por reacción de la tirosina con peroxinitrito (Figura 13) que a su vez, se forma por reacción del anión superóxido y el óxido nítrico. Por tanto, el aumento de 3-NT refleja un aumento de estrés oxidativo y nitrosativo en pacientes con EHM (Montoliu et al, 2011).

Este resultado motivó el estudio en más detalle de la implicación del estrés oxidativo/nitrosativo en la patogenia de la EHM, y por tanto esta tesis.

Nuestros pacientes cirróticos con EHM muestran un aumento de los marcadores de daño de las principales biomoléculas causado por el estrés oxidativo/nitrosativo. La carbonilación de proteínas aumenta igual en pacientes con y sin EHM; la oxidación de lípidos (MDA) y la del ADN (8-OHdG) aumentan más en pacientes con EHM que sin EHM.

También hemos encontrado un aumento de 3-NT en plasma y disminución del GSH libre en sangre total, dando lugar a un aumento del ratio GSSG/GSH en ambos grupos de pacientes, aunque es mucho mayor en pacientes con EHM.

En cuanto a las actividades de enzimas antioxidantes medidas en eritrocitos y en células mononucleares, hemos encontrado un aumento de todas las actividades antioxidantes estudiadas (CAT, SOD, GPx, GR, GST) en eritrocitos y células mononucleares de pacientes con EHM (excepto en la SOD en eritrocitos). Únicamente el aumento de la actividad GPx en ambos tipos celulares y de la GR en eritrocitos es mayor en pacientes con EHM que sin EHM.

El aumento de las actividades antioxidantes de dichas enzimas puede estar reflejando un aumento de la necesidad de eliminar especies reactivas del oxígeno, que es su función. El aumento de la actividad SOD, indicaría que existe un aumento de superóxido que la SOD detoxifica convirtiéndolo en peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), cuyo aumento conduciría al aumento de las actividades CAT y GPx para eliminarlo. En cuanto a la GST, al igual que la GPx consume GSH, utilizándolo para detoxificar compuestos mediante la conjugación con éste y la GPx para eliminar el peróxido de hidrógeno, mientras que la GR recicla el GSSG a GSH, por lo que la disminución del GSH, pese a que la GR está más activa, podría explicarse por un consumo elevado de GSH por la GPx para detoxificar hidroperóxidos (Figura 61).

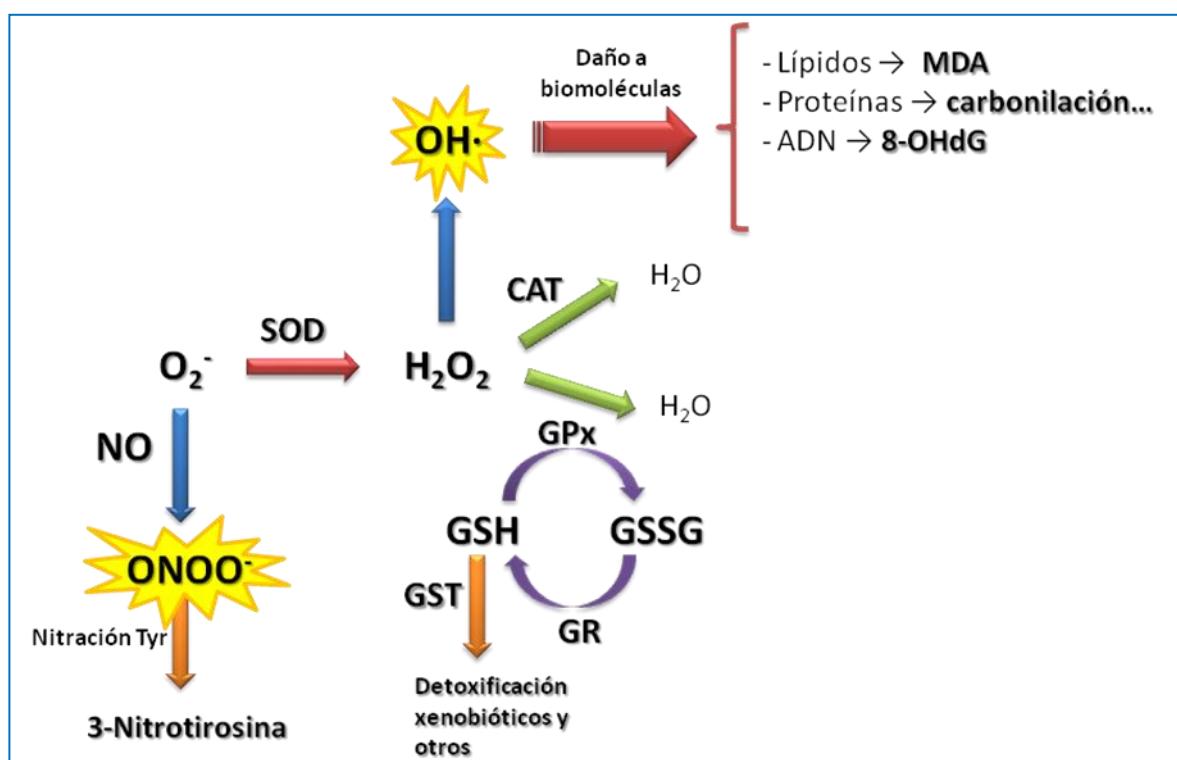


Figura 61. Esquema de la formación de las especies reactivas del oxígeno (ROS) y del nitrógeno (RNS), enzimas antioxidantes que catalizan las reacciones y daño producido por el estrés oxidativo generado por el desequilibrio entre los mecanismos antioxidantes y los prooxidantes (ROS/RNS), a favor de los últimos.

Por otra parte, el gran aumento de los hidroperóxidos lipídicos, produce aldehídos (MDA) que son eliminados por la GST mediante la conjugación con el GSH (aldehído-GSH). El aumento de hidroperóxidos lipídicos y de MDA conduciría a un aumento de la actividad de la GST para permitir su eliminación. Esto consumiría más GSH, contribuyendo a su disminución (Zimniak, 2011).

El mayor aumento en las actividades GPx y GR en los pacientes con EHM respecto a los sin EHM sugiere que hay mayor formación de peróxido de hidrógeno, probablemente como

consecuencia de una mayor formación de superóxido. Para eliminar este peróxido de hidrógeno sería necesario aumentar la actividad GPx y para intentar regenerar el GSH consumido, la de la GR. Nuestros resultados sugieren que el aumento en la actividad de la GR no estaría siendo lo suficientemente eficaz para mantener los niveles de GSH.

Los marcadores de daño oxidativo/nitrosativo en sangre (aumento de MDA, de proteínas carboniladas, de 8-OHdG, nitración de tirosina y disminución de GSH) indican la presencia de estrés oxidativo/nitrosativo. Consideramos que el aumento de actividad de las enzimas antioxidantes en pacientes con EHM sería un mecanismo adaptativo de las células frente al estrés oxidativo al que están siendo sometidas, aunque no esté siendo suficientemente eficaz para combatir todo el daño producido por dicho estrés.

Hemos encontrado una relación entre los niveles en sangre de diversos marcadores de daño oxidativo/nitrosativo (aumento de MDA, 3-NT y disminución de GSH) y algunas alteraciones cognitivas en los pacientes con EHM, como son la atención selectiva (test Stroop y d2) y sostenida y concentración (test d2), velocidad de procesamiento mental (test d2 y oral de Claves) y memoria de trabajo (test oral de Dígitos). El GSH y la 3-NT correlacionan también con el test oral de Letras y Números) y alteraciones en la coordinación motora, tanto bimanual, visuoespacial y visuomotora.

Además, el MDA, 3-NT y GSH también están relacionados con la inflamación (IL-6 e IL-18) y la hiperamonemia (excepto la 3-NT) presente en la EHM.

Los datos sugieren que la formación de superóxido y peróxido de hidrógeno es mayor en pacientes con EHM que en pacientes sin EHM. Este aumento del estrés oxidativo podría contribuir al deterioro neurológico en la EHM.

En cuanto a la actividad antioxidante, únicamente el aumento de la actividad GR y GPx en eritrocitos y, de la GPx en células mononucleares se relaciona con alteraciones en la atención, concentración y coordinación motora (bimanual y visuomotora). Estas dos enzimas son las únicas que tienen mayor actividad en los pacientes con EHM que en los pacientes sin EHM.

Si consideramos, como se indica arriba, que el aumento de actividad GPx y GR en pacientes con EHM refleja un aumento del estrés oxidativo, esta correlación sugiere que el deterioro neurológico (atención, concentración, coordinación) aparece en los pacientes con cirrosis cuando se supera un determinado nivel de estrés oxidativo/nitrosativo, lo cual ocurre

en pacientes con EHM pero no sin EHM. Los niveles de hiperamonemia y, sobretodo de inflamación, determinarían el nivel de estrés oxidativo, que mediaría el deterioro neurológico.

Se ha demostrado que, a concentraciones altas el amonio, *per se*, genera de estrés oxidativo/nitrosativo. Kosenko et al (1997) mostraron que la intoxicación aguda con dosis altas de amonio en ratas disminuye la actividad de las enzimas antioxidantes (GPx, SOD y catalasa) en hígado, cerebro y eritrocitos y, aumenta los niveles de superóxido y óxido nítrico. En cultivos celulares de microglía, la adición de amonio induce la liberación al medio de ROS y óxido nítrico, conduciendo a estrés oxidativo/nitrosativo (Kakulavarapu et al, 2013). Schliess et al (2002) observaron en cultivos de astrocitos de rata que el amonio inducía la nitración de residuos tirosina de proteínas, indicando presencia de estrés oxidativo/nitrosativo. Todos estos estudios se han realizado utilizando concentraciones muy altas de amonio (mM). No se conoce si niveles más bajos de amonio como los presentes en pacientes cirróticos son suficientes para inducir *per se* estrés oxidativo.

El TNF- $\alpha$  es una citocina pro-inflamatoria secretada al inicio del proceso inflamatorio (Tracey et al, 1987), siendo esencial para la amplificación de respuesta inflamatoria induciendo la liberación de otras citocinas pro-inflamatorias (Brennan et al, 1989), quimiocinas y moléculas de adhesión, produciendo una mayor producción de TNF- $\alpha$  (Doukas et al, 1990; Schroder et al, 1990). Además, el TNF- $\alpha$  induce la formación de ceramida a partir de esfingomiélin, que viaja a la mitocondria, donde es capaz de inhibir el flujo de electrones, con dos consecuencias importantes: en primer lugar se produce una importante disminución en la producción de ATP. Por otra parte, al ser interrumpida la cadena respiratoria a nivel del complejo 3, se produce un aumento de la producción de superóxido y de peróxido de hidrógeno mitocondrial. De esta manera, la liberación de TNF- $\alpha$  constituye un factor prooxidante, aumentando el estrés oxidativo a nivel mitocondrial (Videla, 2003).

Estos datos sugieren que, además de la hiperamonemia, la inflamación (por ejemplo el TNF- $\alpha$ ) también puede contribuir a la mayor inducción de estrés oxidativo en pacientes con EHM.

### **3.2. Alteraciones en especies reactivas del oxígeno/nitrógeno, potencial de membrana mitocondrial y glutatión reducido en células mononucleares sanguíneas**

Una vez comprobado que los pacientes con EHM presentan estrés oxidativo/nitrosativo, con daño oxidativo en biomoléculas en sangre y un aumento de la actividad de las enzimas antioxidantes en eritrocitos y células mononucleares (linfocitos y monocitos), nos propusimos caracterizar qué especies reactivas del oxígeno (ROS) y del nitrógeno (RNS) tenían los niveles alterados y en qué tipo celular en sangre. Para ello realizamos un estudio mediante citometría de flujo analizando distintos ROS/RNS (superóxido, peróxido de hidrógeno, óxido nítrico, peróxidos/peroxinitrito) en diferentes poblaciones leucocitarias. También medimos el potencial de membrana mitocondrial y el GSH, relacionados con el estrés oxidativo/nitrosativo.

Para analizar la producción de ROS/RNS mediante citometría de flujo, elegimos las poblaciones mayoritarias de leucocitos, por una parte las células implicadas en la inmunidad innata (Neutrófilos, Monocitos) y en la inmunidad adquirida (Linfocitos T, con sus principales subtipos T CD8+ y T CD4+ y, los Linfocitos B). Se sabe que los Neutrófilos y Monocitos son las principales células productoras de ROS/RNS, ya que su función es fagocitar componentes exógenos o endógenos que suponen una amenaza para el organismo llevando a cabo la destrucción intracelular del agente dañino (Male et al, 2012). Este proceso de destrucción está mediado por los ROS/RNS generados que atacan a proteínas, lípidos y ADN del agente dañino aunque también pueden atacar las células del propio organismo. Los datos obtenidos muestran que en los pacientes con EHM, los Linfocitos también tienen un papel importante en el aumento del estrés oxidativo pudiendo explicarse como una respuesta adaptativa del organismo a la inflamación crónica persistente en los pacientes con EHM.

La citometría de flujo nos permitió separar 8 poblaciones celulares de la serie blanca y analizar en cada una los niveles de ROS/RNS. Sin embargo las actividades de las enzimas antioxidantes no pudimos determinarlas en cada tipo celular porque la insuficiente cantidad de muestra no lo permitía. Por tanto, sólo podemos relacionar los datos de ROS/RNS en cada tipo celular con las actividades de las enzimas antioxidantes en células mononucleares (monocitos y linfocitos) en su conjunto.

Medimos los niveles de las distintas ROS/RNS en condiciones basales y su respuesta a la adición de superóxido, óxido nítrico ó un despolarizante de la membrana mitocondrial. Las



principales diferencias encontradas entre los pacientes con EHM y los controles, en una visión global, se resumen en la Tabla 33 y, se discuten en los apartados 3.2.1 y 3.2.2.

**Tabla 33: Resultados obtenidos en pacientes con EHM en comparación con los controles**

Condiciones basales	Respuesta a estrés
↓ potencial memb mitocondrial	Ausencia de despolarización
↑ superóxido mitocondrial	↓ superóxido mitocondrial
↓ superóxido celular	↓ superóxido celular
↑ peróxido de hidrógeno	↑ peróxido de hidrógeno
↑ óxido nítrico	↓ óxido nítrico
↓ peróxidos/peroxinitrito	↑ peróxidos/peroxinitrito
↑ tioles reducidos	↑ tioles reducidos en Monocitos, Linfocitos (B y totales) ↓ tioles reducidos en Neutrófilos

↑: aumento de niveles basales o en la respuesta al estrés en EHM comparado con controles

↓: disminución de niveles basales o menor aumento en respuesta al estrés en EHM comparado con controles

### 3.2.1. Niveles basales de ROS/RNS, potencial de membrana mitocondrial y GSH

La mitocondria tiene como función principal la producción de energía, mediante una cascada de reacciones de oxido-reducción y transporte electrónico conocidas como fosforilación oxidativa que genera un gradiente de protones en la membrana mitocondrial interna que se utiliza como fuerza motriz para la síntesis de ATP (Kowaltowski, 2000; Saraste, 1999). Durante este proceso, se generan ROS, como el peróxido de hidrógeno y el superóxido, el cual difunde al citoplasma (Figura 62) donde puede reaccionar con el óxido nítrico, con la consecuente formación de peroxinitrito.

En condiciones basales, los pacientes con EHM tienen disminuido el potencial de membrana mitocondrial en todas las poblaciones celulares respecto a los controles y muy sutilmente respecto a los pacientes sin EHM, lo cual se traduce en una mayor despolarización de la membrana mitocondrial. Esta despolarización puede conducir a la incapacidad de mantener los gradientes electroquímicos necesarios para la fosforilación oxidativa y síntesis del ATP y a la generación excesiva de ROS por la cadena de transporte electrónico (Green y Reed, 1998).

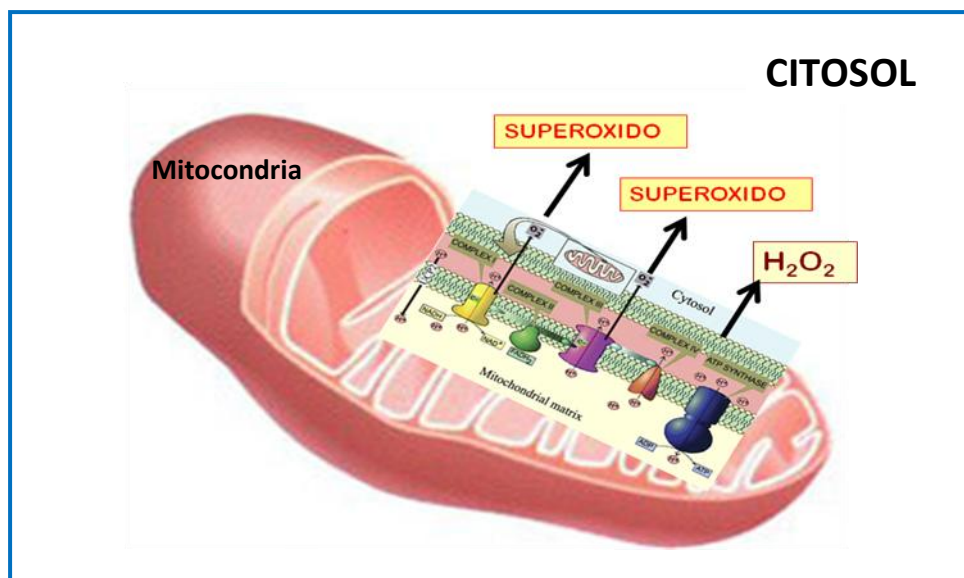


Figura 62. Generación de superóxido en la mitocondria durante la respiración celular y posterior difusión al citosol

Los pacientes con EHM tienen niveles de superóxido mitocondrial más altos que los controles en todas las células de la serie blanca estudiadas excepto en las subpoblaciones de linfocitos T (CD8+ y CD4+). Teniendo en cuenta que la actividad SOD total está aumentada en células mononucleares (linfocitos y monocitos), esto sugiere que este aumento sólo es suficiente para eliminar el exceso de superóxido formado en Linfocitos T, que mantienen los niveles similares a los controles. En el resto de poblaciones celulares, el aumento de la actividad SOD total en los pacientes con EHM es insuficiente para eliminar el exceso de superóxido producido en la mitocondria.

Los niveles de superóxido celular están disminuidos en los pacientes con EHM respecto a los controles en todas las poblaciones celulares estudiadas. Teniendo en cuenta que el superóxido mitocondrial está aumentado en los pacientes con EHM, la disminución del superóxido celular refleja una disminución de superóxido citosólico. El mecanismo antioxidante encargado de eliminar el superóxido es la SOD, que tiene isoformas citosólica (SOD-Cu/Zn) y mitocondrial (SOD-Mn). El 70% de la actividad SOD corresponde a la citosólica (Marklund, 1984). La disminución del superóxido citosólico en los pacientes con EHM sugiere que el superóxido formado en la mitocondria difunde al citosol y que la célula ha puesto en marcha el mecanismo antioxidante adecuado para su eliminación: el aumento de la actividad SOD en pacientes con EHM, que es eficaz en la eliminación del superóxido citoplasmático, transformándolo en peróxido de hidrógeno. Por otra parte, el superóxido citosólico también

podría estar reaccionando con el óxido nítrico, formando peroxinitrito. El conjunto de estos dos mecanismos: 1) aumento de la eliminación por parte de la SOD, formando peróxido de hidrógeno y 2) aumento de la eliminación por reacción con óxido nítrico, formando peroxinitrito, explicaría los menores niveles de superóxido celular en pacientes con EHM en comparación con los controles (Figura 63).

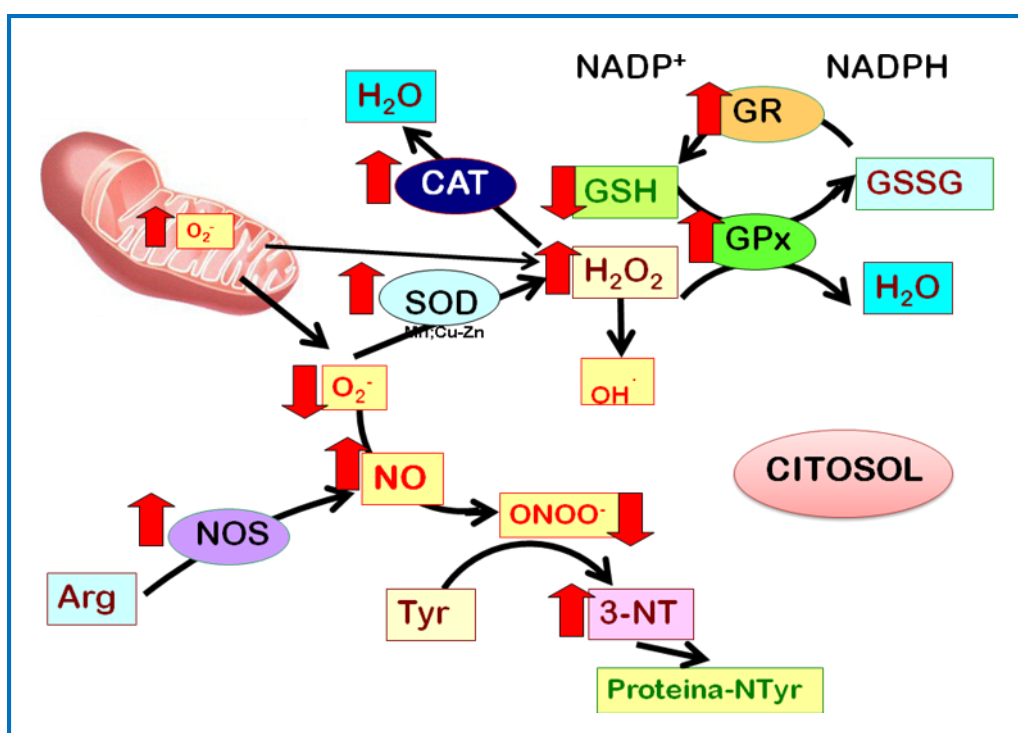


Figura 63. Esquema de las alteraciones de las ROS/RNS y enzimas antioxidantes en condiciones basales en pacientes con EHM en comparación con los controles (↑: aumento; ↓: disminución)

En cuanto al peróxido de hidrógeno, los pacientes con EHM tienen mayores niveles en comparación con los controles en todas las poblaciones leucocitarias estudiadas, principalmente en Neutrófilos. Este peróxido de hidrógeno provendría de la detoxificación del superóxido citosólico por la SOD-Cu/Zn, de acuerdo con la hipótesis anterior. Ésto sugiere además que, aunque los mecanismos enzimáticos encargados de eliminar el peróxido de hidrógeno (GPx y catalasa) están aumentados en células mononucleares, su aumento no es suficiente para eliminarlo eficazmente (Figura 63).

El peróxido de hidrógeno, es una fuente de formación de radical hidroxilo, que es muy reactivo y tiene gran capacidad para producir daño oxidativo en las biomoléculas (Yim et al, 1990; Halliwell, 1991). El aumento de peróxido de hidrógeno podría aumentar la formación de

hidroxilo que contribuiría al daño oxidativo en lípidos, proteínas y ácidos nucleicos observado en los pacientes con EHM.

Por otro lado, los niveles de óxido nítrico (NO) están aumentados en los pacientes con EHM en comparación con los controles en todas las poblaciones celulares estudiadas. Esto sería consecuencia de un aumento de la actividad de la enzima óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), que se induce en los procesos inflamatorios y sintetiza grandes cantidades de NO. El aumento de óxido nítrico, en este contexto celular constituye una fuente de generación de peroxinitrito por reacción con el superóxido, apoyando el papel del óxido nítrico en la disminución de superóxido citosólico por su consumo en la formación de peroxinitrito (Figura 63).

Los niveles de peróxidos/peroxinitrito están disminuidos en los pacientes con EHM respecto a los controles en todas las poblaciones celulares estudiadas. Ésto sugiere que, como previamente indicábamos, aunque está aumentada la formación de peroxinitrito por reacción del superóxido citosólico y del NO, el peroxinitrito formado se está consumiendo para nitrar residuos tirosina libre y en proteína, formando 3-Nitrotirosina, que está muy aumentada en pacientes con EHM.

Los niveles de tioles reducidos, de los que el 95% es glutatión reducido (GSH), están aumentados en los pacientes con EHM respecto a los controles en todas las poblaciones celulares estudiadas. Este resultado es opuesto al obtenido en eritrocitos, donde encontramos una disminución. En las células mononucleares (linfocitos y monocitos) las actividades glutatión peroxidasa (GPx) y glutatión S-transferasa (GST), que consumen GSH para detoxificar peróxidos de hidrógeno o lipídicos, tienen aumentada su actividad. La actividad de la glutatión reductasa (GR) está también aumentada, pero en menor medida que la GPx y la GST, por lo que en principio, parece que sería incapaz de mantener ó aumentar los niveles de GSH. Pensamos que el aumento de GSH en las células de la serie blanca y no en los eritrocitos en pacientes con EHM no sería debida a diferencias en su degradación sino en su biosíntesis. Las enzimas encargadas de sintetizar el GSH, la gamma-glutamylcisteína sintetasa y la glutatión sintetasa (Lu et al, 2009) estarían más activas en la serie blanca de pacientes con EHM como respuesta al estrés oxidativo. Al no poder regenerar suficiente GSH a través de la GR, la célula se adaptaría aumentando su síntesis.

### 3.2.2. Respuesta celular al aumento de ROS/RNS

Al estudiar el potencial de membrana mitocondrial tras adición de un agente despolarizante observamos una disminución del potencial en los controles pero no en los pacientes con EHM, indicando que en los pacientes ya existe una despolarización basal de la membrana (disminución del potencial de membrana mitocondrial), por lo que no responden al agente despolarizante. Esta despolarización de la membrana mitocondrial, como hemos comentado previamente, produciría una disminución de la síntesis del ATP y generación excesiva de ROS por la cadena de transporte electrónico.

Al añadir un agente generador de superóxido para analizar la respuesta de la célula observamos lo siguiente:

Los niveles de superóxido mitocondrial en todas las poblaciones celulares en los pacientes con EHM se mantienen similares ó aumentan menos (Linfocitos T y B) que en los controles. Este resultado sugiere que la SOD mitocondrial (SOD-Mn) es capaz de eliminar una mayor proporción del superóxido generado exógenamente, corroborando un aumento de su actividad, especialmente en Linfocitos B. En el caso de los linfocitos T, la SOD-Mn es capaz de eliminar el exceso de superóxido mitocondrial, tanto el generado exógenamente como el basal endógeno, lo que indica un mayor aumento de la actividad SOD-Mn en los linfocitos T que en las otras poblaciones celulares. El hecho de que, a pesar de la mayor capacidad de detoxificar superóxido mitocondrial en pacientes con EHM, sus niveles estén aumentados en condiciones basales indica que hay un gran aumento de formación de superóxido en mitocondrias de pacientes con EHM.

Los niveles de superóxido citosólico también aumentan menos en todas las poblaciones celulares (excepto en monocitos) en los pacientes con EHM que en controles. Ésto indica una mayor eliminación y que los mecanismos para eliminarlo están siendo eficaces. Como se ha comentado antes, dos mecanismos podrían contribuir a la eliminación de superóxido: aumento de la actividad SOD y aumento del consumo por reacción con el NO para formar peroxinitrito.

Por otro lado, el aumento de peróxido de hidrógeno en respuesta al superóxido exógeno es mayor en todas las poblaciones celulares en los pacientes con EHM que en los controles. Estos resultados corroboran que el aumento de actividad de SOD en células mononucleares en los pacientes está siendo eficaz en la realización de su función, convirtiendo el superóxido en peróxido de hidrógeno y, que los mecanismos encargados de eliminar el peróxido de

hidrógeno (GPx, catalasa) de dichas células aunque están aumentados, no son suficientes para eliminar todo el aumento en la generación de peróxido de hidrógeno.

La adición de superóxido produce un mayor aumento de los niveles de peroxinitrito en los pacientes con EHM que en los controles, sugiriendo que cuando hay un exceso de superóxido, éste reacciona con el NO para formar peroxinitrito, cuya concentración aumenta más que en los controles. El hecho de que los niveles de peroxinitrito en pacientes con EHM sean menores que en controles en condiciones basales pero mayores tras adición de superóxido exógeno sugiere que, en condiciones basales el peroxinitrito reacciona con tirosina para formar 3-Nitrotirosina (3-NT) más rápidamente de lo que se forma el peroxinitrito. En cambio, cuando se añade repentinamente grandes cantidades de superóxido exógeno, el peroxinitrito se forma muy rápidamente mientras que su reacción con tirosina para formar 3-NT es más lenta, por lo que se acumula el peroxinitrito (Figura 64).

Cuando añadimos un agente generador de NO, el aumento de NO en los pacientes con EHM es menor que en los controles. Ésto indica que se elimina más rápidamente en los pacientes, lo que apoya que una mayor cantidad de óxido nítrico se está utilizando para generar peroxinitrito.

El aumento de superóxido exógeno produce una disminución de los niveles de GSH únicamente en los Neutrófilos y ligeramente en Linfocitos T (CD8+ y CD4+) de pacientes con EHM, sugiriendo que el aumento de peróxido de hidrógeno formado es utilizado por la GPx, que oxida el GSH a GSSG. Sin embargo, en Monocitos y Linfocitos B, los niveles de GSH en pacientes con EHM disminuyen menos que en los controles. Como se comenta antes, ésto podría ser debido a una mayor síntesis debida a una mayor actividad de la gamma-glutamylcisteína sintetasa y la glutatión sintetasa.

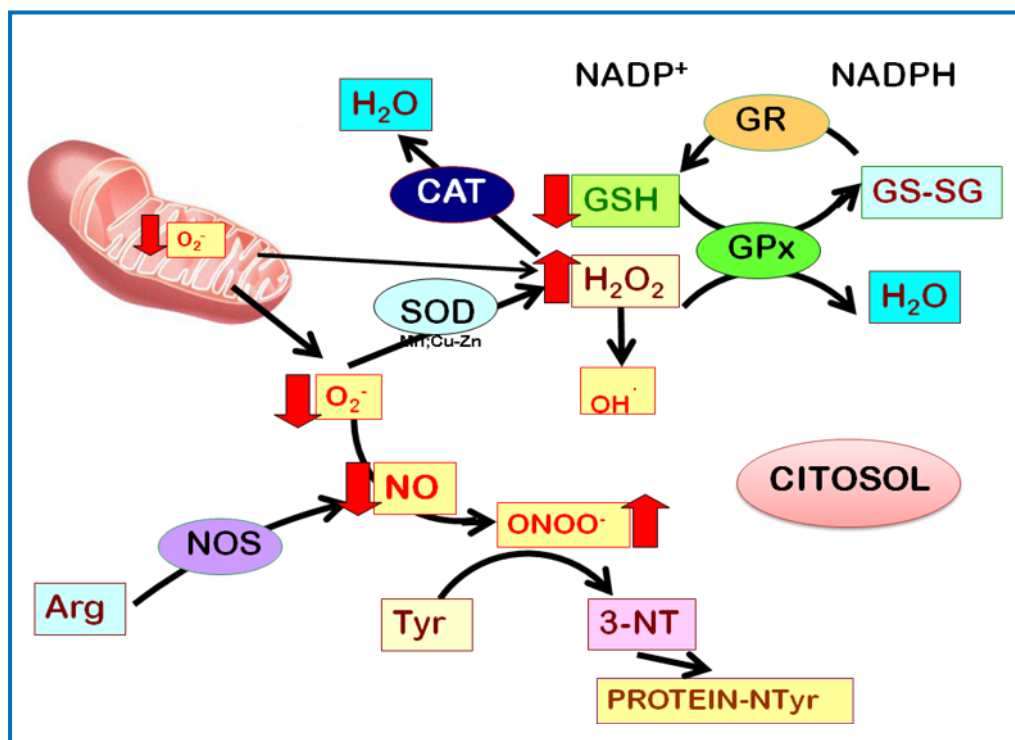


Figura 64. Esquema de las alteraciones de las ROS/RNS y enzimas antioxidantes tras adición de superóxido/óxido nítrico en pacientes con EHM en comparación con los controles (↑: aumento; ↓: disminución)

En general, en pacientes sin EHM, las concentraciones basales de ROS/RNS y su respuesta a superóxido u óxido nítrico generados exógenamente, muestran alteraciones similares a las de los pacientes con EHM, aunque de menor intensidad ó grado. Las principales diferencias entre ambos tipos de pacientes se muestran en la Tabla 34:

Tabla 34: Resultados obtenidos en pacientes con EHM en comparación con los sin EHM

Condiciones basales	Respuesta a estrés
Ausencia de despolarización	Ausencia de despolarización
↑ superóxido mitocondrial en Monocitos	↓ superóxido mitocondrial en Linfocitos B
↓ <b>superóxido celular</b>	↓ superóxido celular en Leucocitos y Linfocitos (T CD8+ y totales)
↑ peróxido de hidrógeno en Neutrófilos	↑ peróxido de hidrógeno en Leucocitos, Neutrófilos, Monocitos y Linfocitos T CD8+
↑ <b>óxido nítrico en Linfocitos totales</b>	↓ <b>óxido nítrico</b> (excepto Linfocitos B)
↓ <b>peróxidos/peroxinitrito en Linfocitos (T CD8+, T CD4+ y B)</b>	↑ <b>peróxidos/peroxinitrito</b>
↑ <b>tioles reducidos</b> (excepto Linfocitos B)	↑ <b>tioles reducidos</b> en Monocitos

↑: aumento de niveles basales o en respuesta al estrés en EHM comparado con controles  
 ↓: disminución de niveles basales o menor aumento en respuesta al estrés en EHM comparado con controles; *(se remarcan en negrita las diferencias más acusadas)*

Como podemos observar en la Tabla 34 las diferencias entre pacientes con y sin EHM en la mayoría de parámetros medidos son similares a las diferencias respecto a los controles pero se presentan en menos poblaciones celulares o en ninguna en el caso del potencial de membrana en el que ambos tipos de pacientes presentan una despolarización basal en todos los tipos celulares que las incapacita para responder a un agente despolarizante.

Los parámetros en los que se observaron mayores diferencias son la disminución del superóxido celular basal y la disminución de los peróxidos/peroxinitrito en las subpoblaciones linfocitarias. Otra diferencia importante es el aumento de tioles reducidos (GSH) en los pacientes con EHM en comparación a los sin EHM, sugiriendo que, como respuesta a un mayor estrés oxidativo aumenta de síntesis de GSH como se ha comentado antes.

Las principales diferencias en las respuestas celulares a la adición de óxido nítrico ó superóxido exógenos, son una disminución del NO y del superóxido y, un aumento de los peróxidos/peroxinitritos. Ésto sugiere que existe una mayor formación de peroxinitrito en los pacientes con EHM que en los sin EHM. Este peroxinitrito nitra residuos de tirosina formando la 3-Nitrotirosina (3-NT).

El análisis de correlaciones de los resultados del estudio muestra que el aumento del óxido nítrico en los Linfocitos totales se correlaciona con la inflamación en sangre (IL-6), sugiriendo que en pacientes con EHM, la inflamación induciría la generación de NO en los linfocitos. La inflamación también correlaciona con el aumento de 3-NT, sugiriendo que el aumento de NO producido durante la inflamación y su posterior reacción con el superóxido es la principal causa del aumento de 3-NT.

También existe una correlación entre el aumento del ratio GSSG/GSH en sangre, y el aumento del peróxido de hidrógeno en Neutrófilos. El ratio GSSG/GSH aumentaría por el consumo de GSH por la GPx para intentar eliminar el exceso de peróxido de hidrógeno. El aumento de peróxido de hidrógeno en este tipo celular era esperable ya que los Neutrófilos son células fagocíticas preparadas para generar grandes cantidades de ROS/RNS.

En cuanto a las alteraciones neurológicas, el aumento de NO en los Linfocitos totales se correlaciona muy bien con las alteraciones en la coordinación motora (bimanual y visuomotora) y en el PHES. A su vez, estas alteraciones también se correlacionan con el aumento de 3-NT en suero, lo que sugiere como antes que el aumento de NO producido en los Linfocitos como consecuencia de la inflamación es el responsable del aumento de la formación



de peroxinitrito y de la 3-NT que serían los factores más determinantes en las alteraciones de coordinación motora y en la obtención de peores resultados en el PHES en EHM.

Por otra parte, las alteraciones en atención correlacionan con la disminución en los niveles basales de peróxidos/peroxinitrito en los Linfocitos B, sugiriendo un papel relevante de estas células en el consumo de peroxinitrito para formar 3-NT que también correlaciona con los déficits de atención.

Estos datos sugieren que el aumento de NO, peroxinitrito y 3-NT son contribuyentes esenciales a las alteraciones en coordinación motora y atención. De momento, no disponemos de datos suficientes para entender la razón por la que la correlación se observa en Linfocitos T para déficits de coordinación y en Linfocitos B para los de atención.

En este sentido, llama la atención que las correlaciones parecen distintas cuando se analizan los datos tras inducir un aumento de superóxido exógeno. En este caso los cambios en superóxido mitocondrial en los Linfocitos B correlación con la alteración de la coordinación visuomotora y el deterioro en la realización del PHES. Sin embargo, las alteraciones en la atención, correlacionan con cambios en NO tras adición de un generador de NO en linfocitos T CD8+ y en células fagocíticas. El menor aumento del superóxido mitocondrial y del NO en pacientes con EHM, tras adición de los generadores exógenos sugiere, como hemos indicado, un mayor consumo por una mayor formación de peroxinitrito que, a su vez nitra tirosinas formando 3-NT, por lo que estas correlaciones podrían indicar que es el aumento de formación de 3-NT y de la nitración de tirosina en proteínas lo que estaría mediando las alteraciones cognitivas y motoras.

Pensamos que el aumento que observamos en la formación de peroxinitrito y nitrotirosina (3-NT) en células sanguíneas y en sangre de pacientes con EHM se produce también en cerebro. Ésto podría conducir a la nitración patológica de proteínas cerebrales que modulan los procesos cognitivos y motores, conduciendo al deterioro de los mismos. Por ejemplo, el receptor NMDA (N-Metil-D-Aspartato) modula procesos de aprendizaje y memoria mediante la activación de la vía glutamato-NO-GMPc. Se ha descrito que el peroxinitrito puede nitrar el receptor NMDA, produciendo un aumento en su activación (Muscoli et al, 2013). El receptor NMDA juega un papel esencial en los procesos de aprendizaje y memoria. La alteración de su función por nitración podría contribuir al deterioro cognitivo en EHM. Nuestro grupo ha demostrado que en modelos animales de EHM existe un aumento de la activación tónica del receptor NMDA en cerebelo, que disminuye la función de dicha vía, reduciendo la capacidad del aprendizaje y la memoria (Erceg et al, 2005; EIMlili et al, 2010; Felipo, 2013). Es

posible que la nitración de residuos tirosina del receptor NMDA contribuya a esta hiperexcitabilidad y a la alteración de la vía glutamato-NO-GMPc con las consecuentes alteraciones cognitivas.

El estrés oxidativo/nitrosativo en sangre podría servir como indicador de su presencia en cerebro. El estudio de los mecanismos por los que se produce el estrés oxidativo/nitrosativo en sangre podría ayudar a entender cómo se produce en cerebro y a diseñar procedimientos para prevenirlo o revertirlo. Estos procedimientos podrían ser útiles para mejorar el deterioro cognitivo y motor en EHM.

## **VI. CONCLUSIONES**



1. La batería de tests psicométricos PHES no es suficientemente sensible para detectar finamente algunas alteraciones cognitivas y motoras presentes en pacientes con EHM, dejando sin diagnosticar a algunos pacientes.
2. Otros tests psicométricos detectan con mayor sensibilidad que la batería PHES alteraciones en funciones cognitivas y motoras específicas en pacientes con EHM. En particular, los tests de coordinación bimanual y visuomotora, los tests de Stroop y de Claves Oral para la atención selectiva y velocidad de procesamiento mental y el test d2 para la atención selectiva-sostenida y la concentración mental. Estos tests pueden mejorar el diagnóstico de la EHM.
3. Los pacientes cirróticos con EHM presentan estrés oxidativo/nitrosativo en sangre, con aumento de peroxidación lipídica, oxidación del ADN, carbonilación de proteínas, nitración de tirosina y del ratio GSSG/GSH y disminución de los niveles de GSH. Los pacientes sin EHM también presentan estrés oxidativo/nitrosativo pero en menor grado. La correlación existente entre los marcadores de daño oxidativo/nitrosativo en sangre (3-NT, MDA, GSH) y la inflamación sugiere un papel relevante de ésta en la generación del estrés oxidativo.
4. La correlación existente entre los déficits de atención, concentración mental y coordinación motora y los marcadores de daño oxidativo/nitrosativo en sangre (3-NT, MDA, GSH) sugiere un papel del estrés oxidativo en estas alteraciones neurológicas.
5. La actividad de las enzimas antioxidantes está aumentada en eritrocitos y células mononucleares de los pacientes con y sin EHM. Únicamente la actividad glutatión peroxidasa está aumentada en pacientes con EHM respecto a pacientes sin EHM. Este aumento sería un mecanismo adaptativo para eliminar el peróxido de hidrógeno generado como consecuencia del aumento en la formación de superóxido mitocondrial.
6. La membrana mitocondrial de los pacientes con EHM se encuentra despolarizada, contribuyendo a la generación excesiva de superóxido y peróxido de hidrógeno.

7. En las poblaciones leucocitarias, especialmente en Linfocitos, de los pacientes con EHM, está aumentado el superóxido mitocondrial y disminuido el superóxido celular. Esta disminución sería consecuencia de: a) la reacción con el óxido nítrico para formar peroxinitrito, que nitrifica tirosinas formando 3-Nitrotirosina y b) su consumo por la superóxido dismutasa para formar peróxido de hidrógeno. Tanto los niveles de 3-Nitrotirosina como los de peróxido de hidrógeno están muy aumentados en pacientes con EHM.
  
8. Las principales diferencias entre los pacientes con y sin EHM en la respuesta celular a un aumento de superóxido/óxido nítrico exógenos son menores aumentos de óxido nítrico y de superóxido y un mayor aumento del peroxinitrito, indicando que en los pacientes con EHM se forma más peroxinitrito. Sin embargo, los niveles basales de peroxinitrito son menores en pacientes con EHM, probablemente porque ha ido reaccionando con tirosina para formar 3-Nitrotirosina, que está muy aumentada en pacientes con EHM.
  
9. El aumento de óxido nítrico en Linfocitos correlaciona con la inflamación, que también correlaciona con el aumento de 3-Nitrotirosina. Esto sugiere que, en pacientes con EHM, la inflamación induciría la generación de óxido nítrico en linfocitos y que su reacción con el superóxido sería la principal causa del aumento de 3-Nitrotirosina. Este proceso sería un contribuyente esencial a los déficits en coordinación motora, atención y en la realización de los tests del PHES en pacientes con EHM.

## **VII. ANEXO**





Tabla 35. Correlaciones entre indicadores de daño oxidativo y especies reactivas del oxígeno/nitrógeno

↑ RATIO GSSG/GSH EN SANGRE TOTAL								
PARÁMETRO	POBLACIÓN CELULAR							
	LEUCOS	NEUTROS	MONOS	LINFOS T	LINFOS T CD8+	LINFOS T CD4+	LINFOS B	LINFOS TOTALES
↑ PERÓXIDOS (DCF)		r= 0,577 p<0,001						
↓ SUPERÓXIDO CELULAR (HE)		r=-0,526 p<0,001		r=-0,574 p<0,001	r=-0,565 p<0,001			r=-0,502 p=0,001
↓ ratio MTX							r=-0,749 p<0,001	
↑ ÓXIDO NÍTRICO (DAF)	r=0,526 p<0,001			r=0,639 p<0,001	r=0,625 p<0,001	r=0,648 p<0,001		r=0,699 p<0,001
↓ ratio DAF	r=-0,612 p<0,001	r=-0,610 p<0,001		r=-0,576 p<0,001	r=-0,573 p<0,001			r=-0,551 p=0,004
↑ ratio DHR	r=0,692 p<0,001		r=0,655 p<0,001	r=0,539 p<0,001	r=0,667 p<0,001	r=0,729 p<0,001	r=0,561 p=0,005	
↑ TIOLES REDUCIDOS (CMF)	r=0,740 p<0,001	r=0,718 p<0,001	r=0,605 p<0,001	r=0,772 p<0,001	r=0,657 p<0,001	r=0,754 p<0,001	r=0,665 p=0,001	r=0,720 p<0,001
↑ NITROTIROSINA EN SUERO								
↑ ratio DCF		r= 0,601 p<0,001			r=0,596 p<0,001	r=0,629 p<0,001	r=0,703 p<0,001	
↑ ratio DHR	r=0,547 p<0,001	r= 0,712 p<0,001			r=0,537 p=0,001	r=0,629 p<0,001	r=0,617 p=0,008	
↑ MDA EN SUERO								
↑ TIOLES REDUCIDOS (CMF)	r=0,529 p<0,001				r=0,554 p<0,001	r=0,500 p<0,001		
↑ 8-HIDROXIDEOXIGUANINA EN SUERO								
↑ ÓXIDO NÍTRICO (DAF)					r=0,567 p<0,001			
↑ ratio DHR			r=0,532 p<0,001					

Tabla 36. Correlaciones entre parámetros bioquímicos y especies reactivas del oxígeno/nitrógeno

↑ IL-6 EN SUERO								
PARÁMETRO	POBLACIÓN CELULAR							
	LEUCOS	NEUTROS	MONOS	LINFOS T	LINFOS T CD8+	LINFOS T CD4+	LINFOS B	LINFOS TOTALES
↑ PERÓXIDOS (DCF)					r=0,596 p=0,004	r=0,551 p<0,001		
↑ ÓXIDO NÍTRICO (DAF)						r=0,504 p<0,001		r=0,654 p<0,001
↑ TIOLES REDUCIDOS (CMF)	r=0,602 p<0,001	r= 0,593 p<0,001			r=0,513 p<0,001			
↑ GMPc EN PLASMA								
↑ PERÓXIDOS (DCF)		r=0,549 p<0,001						
↑ ÓXIDO NÍTRICO (DAF)								r=0,545 p=0,007
↑ ratio DHR					r=0,518 p<0,001			r=0,531 p<0,001
↑ TIOLES REDUCIDOS (CMF)	r=0,584 p<0,001	r=0,612 p<0,001		r=0,592 p<0,001		r=0,612 p<0,001		
↑ AMONIO EN SANGRE TOTAL								
↑ ÓXIDO NÍTRICO (DAF)								r=0,528 p=0,008
↑ TIOLES REDUCIDOS (CMF)	r=0,536 p<0,001	r=0,523 p<0,001			r=0,533 p<0,001			

Tabla 37. Correlaciones entre presencia de EHM (según PHES) y especies reactivas del oxígeno/nitrógeno

PRESENCIA DE ENCEFALOPATÍA HEPÁTICA MÍNIMA								
PARÁMETRO	POBLACIÓN CELULAR							
	LEUCOS	NEUTROS	MONOS	LINFOS T	LINFOS T CD8+	LINFOS T CD4+	LINFOS B	LINFOS TOTALES
↓ puntuación total PHES								
↓ SUPERÓXIDO CELULAR (HE)							r=0,530 p=0,005	
↓ratio SUPERÓXIDO MITOCONDRIAL (MTX)							r=0,609 p=0,001	
↑ ÓXIDO NÍTRICO (DAF)								r=-0,640 p<0,001
↓ PERÓXIDOS Y PEROXINITRITO (DHR)							r=0,566 p<0,001	
↑ ratio DHR				r=-0,593 p<0,001	r=-0,518 p<0,001	r=-0,629 p<0,001		r=-0,502 p<0,001
↑TIOLES REDUCIDOS (CMF)	r=-0,547 p<0,001	r=-0,522 p<0,001		r=-0,512 p<0,001	r=-0,553 p<0,001	r=-0,625 p<0,001		r=-0,593 p<0,001

Tabla 38. Correlaciones entre alteraciones cognitivas y especies reactivas del oxígeno/nitrógeno

ALTERACIONES COGNITIVAS								
PARÁMETRO	POBLACIÓN CELULAR							
	LEUCOS	NEUTROS	MONOS	LINFOS T	LINFOS T CD8+	LINFOS T CD4+	LINFOS B	LINFOS TOTALES
↓ Atención selectiva/sostenida y Concentración mental (test d2)								
↓ SUPERÓXIDO CELULAR (HE) TOT			r=0,603 p<0,001		r=0,501 p<0,001			r=0,591 p<0,001
↓ ratio DAF TOT	r=0,719 p<0,001	r=0,697 p<0,001	r=0,635 p<0,001	r=0,682 p<0,001	r=0,620 p<0,001	r=0,568 p<0,001		r=0,612 p=0,001
↓ PERÓXIDOS Y PEROXINITRITO (DHR) TOT/CON							r=0,641 r=0,666 p<0,001	
↓ SUPERÓXIDO CELULAR (HE) TOT			r=0,603 p<0,001		r=0,501 p<0,001			r=0,591 p<0,001
↑ ratio DHR CON						r=-0,578 p<0,001		
↑ TIOLES REDUCIDOS (CMF) TOT				r=-0,525 p<0,001		r=-0,550 p<0,001		
↓ Velocidad de procesamiento y Flexibilidad cognitiva (test Stroop)								
↓ SUPERÓXIDO CELULAR (HE)	r=0,536 p<0,001	r=0,523 p<0,001			r=0,551 p<0,001			r=0,586 p<0,001
↓ ratio DAF	r=0,616 p<0,001	r=0,635 p<0,001	r=0,574 p<0,001	r=0,608 p<0,001	r=0,619 p<0,001			r=0,538 p=0,002
↓ PERÓXIDOS Y PEROXINITRITO (DHR)							r=0,733 p<0,001	
↑ TIOLES REDUCIDOS (CMF) PAL-COL	r=-0,513 p<0,001							
↓ Velocidad de procesamiento y Atención selectiva (test oral de Claves)								
↑ ÓXIDO NÍTRICO (DAF)								r=-0,574 p=0,002
↓ ratio DAF	r=0,545 p<0,001	r=0,506 p<0,001	r=0,507 p<0,001	r=0,606 p<0,001		r=0,551 p<0,001		
↑ TIOLES REDUCIDOS (CMF)	r=-0,562 p<0,001	r=-0,522 p<0,001	r=-0,519 p<0,001	r=-0,560 p<0,001	r=-0,506 p<0,001	r=-0,554 p<0,001		
↓ Memoria de trabajo (test oral de Dígitos Total)								
↓ SUPERÓXIDO CELULAR (HE)			r=0,505 p<0,001					
↓ ratio DAF			r=0,510 p<0,001					r=0,546 p=0,002
↑ TIOLES REDUCIDOS (CMF)	r=-0,505 p<0,001							

Tabla 39. Correlaciones entre alteraciones motoras y especies reactivas del oxígeno/nitrógeno

↓ COORDINACIÓN MOTORA								
PARÁMETRO	POBLACIÓN CELULAR							
	LEUCOS	NEUTROS	MONOS	LINFOS T	LINFOS T CD8+	LINFOS T CD4+	LINFOS B	LINFOS TOTALES
↓ Coordinación visuoespacial (↓ Puntuación test Línea Quebrada de la batería PHES)								
↑ ratio PERÓXIDOS (DCF)			r=-0,510 p<0,001					
↓ SUPERÓXIDO CELULAR (HE)							r=0,634 p<0,001	
↑ ÓXIDO NÍTRICO (DAF)								r=-0,574 p=0,001
↑ ratio DHR		r=-0,525 p<0,001		r=-0,591 p<0,001	r=-0,587 p<0,001	r=-0,673 p<0,001	r=-0,529 p=0,005	
↑ TIOLES REDUCIDOS (CMF)						r=-0,529 p<0,001		
↓ Coordinación Bimanual (↑ tiempo)								
↑ SUPERÓXIDO MITOCONDRIAL (MTX)							r=0,504 p=0,003	
↓ ratio SUPERÓXIDO MITOCONDRIAL (MTX)							r=-0,566 p=0,004	
↑ ÓXIDO NÍTRICO (DAF)								r=0,619 p<0,001
↓ ratio DAF							r=-0,534 p=0,002	
↑ TIOLES REDUCIDOS (CMF)	r=0,528 p<0,001		r=0,515 p<0,001	r=0,521 p<0,001	r=0,540 p<0,001	r=0,548 p<0,001		
↓ Coordinación Visuomotora (↑ tiempo)								
↓ ratio SUPERÓXIDO MITOCONDRIAL (MTX)							r=-0,673 p<0,001	
↑ ÓXIDO NÍTRICO (DAF)								r=0,618 p<0,001
↓ ratio DAF							r=-0,510 p=0,003	

## **VIII. BIBLIOGRAFÍA**



- Adams RD, Foley JM (1953). The neurological disorder associated with liver disease. *Research publications - Association for Research in Nervous and Mental Disease*. **32**, 198-237.
- Aebi H (1984). Catalase in vitro. *Methods in enzymology*. **105**, 121-126.
- Aiba M, Takeyoshi I, Ohwada S, Kawashima Y, Iwanami K, Sunose Y, Yamada T, Tsutsumi H, Matsumoto K, Morishita Y (2001). Novel nitric oxide donor (FK409) ameliorates liver damage during extended liver resection with warm ischemia in dogs. *Journal of the American College of Surgeons*. **193**, 264-271.
- Akaike T, Okamoto T, Zaki MH, Fujii S, Sawa T (2009). [New paradigm of host defense against intracellular pathogens by nitric oxide]. *Nihon Hansenbyo Gakkai zasshi = Japanese journal of leprosy : official organ of the Japanese Leprosy Association*. **78**, 41-47.
- Alarcon F, Gimenez-Roldan S (2005). Systemic diseases that cause movement disorders. *Parkinsonism & related disorders*. **11**, 1-18.
- Albertini R, Rindi S, Passi A, Bardoni A, Salvini R, Pallavicini G, De Luca G (1996). The effect of cornea proteoglycans on liposome peroxidation. *Archives of biochemistry and biophysics*. **327**, 209-214.
- Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM (1993). Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **90**, 7915-7922.
- Amodio P, Montagnese S, Gatta A, Morgan MY (2004). Characteristics of minimal hepatic encephalopathy. *Metabolic brain disease*. **19**, 253-267.
- Amodio P, Schiff S, Del Piccolo F, Mapelli D, Gatta A, Umilta C (2005). Attention dysfunction in cirrhotic patients: an inquiry on the role of executive control, attention orienting and focusing. *Metabolic brain disease*. **20**, 115-127.
- Ansari MA, Scheff SW (2010). Oxidative stress in the progression of Alzheimer disease in the frontal cortex. *Journal of neuropathology and experimental neurology*. **69**, 155-167.
- Ardanaz N, Pagano PJ (2006). Hydrogen peroxide as a paracrine vascular mediator: regulation and signaling leading to dysfunction. *Experimental biology and medicine*. **231**, 237-251.
- Arthur JR (2000). The glutathione peroxidases. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. **57**, 1825-1835.
- Asensi M, Sastre J, Pallardo FV, Estrela JM, Viña J (1994a). Determination of oxidized glutathione in blood: high-performance liquid chromatography. *Methods in enzymology*. **234**, 367-371.
- Asensi M, Sastre J, Pallardo FV, Garcia de la Asuncion J, Estrela JM, Viña J (1994b). A high-performance liquid chromatography method for measurement of oxidized glutathione in biological samples. *Analytical biochemistry*. **217**, 323-328.
- Bai G, Rama Rao KV, Murthy CR, Panickar KS, Jayakumar AR, Norenberg MD (2001). Ammonia induces the mitochondrial permeability transition in primary cultures of rat astrocytes. *Journal of neuroscience research*. **66**, 981-991.
- Bajaj JS, Saeian K, Schubert CM, Hafeezullah M, Franco J, Varma RR, Gibson DP, Hoffmann RG, Stravitz RT, Heuman DM, Sterling RK, Shiffman M, Topaz A, Boyett S, Bell D, Sanyal AJ (2009). Minimal hepatic encephalopathy is associated with motor vehicle crashes: the reality beyond the driving test. *Hepatology*. **50**, 1175-1183.
- Bajaj JS, Thacker LR, Heuman DM, Fuchs M, Sterling RK, Sanyal AJ, Puri P, Siddiqui MS, Stravitz RT, Bouneva I, Luketic V, Noble N, White MB, Monteith P, Unser A, Wade JB (2013). The Stroop

## VIII. Bibliografia

---

- smartphone application is a short and valid method to screen for minimal hepatic encephalopathy. *Hepatology*. **58**, 1122-1132.
- Basili S, Raparelli V, Riggio O, Merli M, Carnevale R, Angelico F, Tellan G, Pignatelli P, Violi F, Group C (2011). NADPH oxidase-mediated platelet isoprostane over-production in cirrhotic patients: implication for platelet activation. *Liver international: official journal of the International Association for the Study of the Liver*. **31**, 1533-1540.
- Beauchamp C, Fridovich I (1971). Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical biochemistry*. **44**, 276-287.
- Beckmann JS, Ye YZ, Anderson PG, Chen J, Accavitti MA, Tarpey MM, White CR (1994). Extensive nitration of protein tyrosines in human atherosclerosis detected by immunohistochemistry. *Biological chemistry Hoppe-Seyle*. **375**, 81-88.
- Bellance N, Lestienne P, Rossignol R (2009). Mitochondria: from bioenergetics to the metabolic regulation of carcinogenesis. *Frontiers in bioscience*. **14**, 4015-4034.
- Bellomo G, Jewell SA, Thor H, Orrenius S (1982). Regulation of intracellular calcium compartmentation: studies with isolated hepatocytes and t-butyl hydroperoxide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **79**, 6842-6846.
- Bemeur C, Desjardins P, Butterworth RF (2010). Antioxidant and anti-inflammatory effects of mild hypothermia in the attenuation of liver injury due to azoxymethane toxicity in the mouse. *Metabolic brain disease*. **25**, 23-29.
- Bentivoglio M, Mariotti R, Bertini G (2011). Neuroinflammation and brain infections: historical context and current perspectives. *Brain research reviews*. **66**, 152-173.
- Benzi G, Moretti A (1995). Age- and peroxidative stress-related modifications of the cerebral enzymatic activities linked to mitochondria and the glutathione system. *Free radical biology & medicine*. **19**, 77-101.
- Bergendi L, Benes L, Durackova Z, Ferencik M (1999). Chemistry, physiology and pathology of free radicals. *Life sciences*. **65**, 1865-1874.
- Bessman AN, Hawkins R (1963). The Relative Effects of Enterically Administered Plasma and Packed Cells on Circulating Blood Ammonia. *Gastroenterology*. **45**, 368-373.
- Bielsky BH, Gebieki JM (1977). Application of radiation chemistry to biology. *Free radicals biology. W.A. Pryor., Academic Press*. **3**, 1-19
- Block ML, Zecca L, Hong JS (2007). Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms. *Nature reviews. Neuroscience*. **8**, 57-69.
- Bodepudi V, Shibutani S, Johnson F (1992). Synthesis of 2'-deoxy-7,8-dihydro-8-oxoguanosine and 2'-deoxy-7,8-dihydro-8-oxoadenosine and their incorporation into oligomeric DNA. *Chemical research in toxicology*. **5**, 608-617.
- Bosoi CR, Yang X, Huynh J, Parent-Robitaille C, Jiang W, Tremblay M, Rose CF (2012). Systemic oxidative stress is implicated in the pathogenesis of brain edema in rats with chronic liver failure. *Free radical biology & medicine*. **52**, 1228-1235.
- Boulton CL, Southam E, Garthwaite J (1995). Nitric oxide-dependent long-term potentiation is blocked by a specific inhibitor of soluble guanylyl cyclase. *Neuroscience*. **69**, 699-703.
- Boveris A, Cadenas E (1975). Mitochondrial production of superoxide anions and its relationship to the antimycin insensitive respiration. *FEBS letters*. **54**, 311-314.



- Boveris A, Chance B (1973). The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *The Biochemical journal*. **134**, 707-716.
- Boveris A, Oshino N, Chance B (1972). The cellular production of hydrogen peroxide. *The Biochemical journal*. **128**, 617-630.
- Breen AP, Murphy JA (1995). Reactions of oxyl radicals with DNA. *Free radical biology & medicine*. **18**, 1033-1077.
- Brennan FM, Chantry D, Jackson A, Maini R, Feldmann M (1989). Inhibitory effect of TNF alpha antibodies on synovial cell interleukin-1 production in rheumatoid arthritis. *Lancet*. **2**, 244-247.
- Brennan PA, Downie IP, Langdon JD, Zaki GA (1999). Emerging role of nitric oxide in cancer. *The British journal of oral & maxillofacial surgery*. **37**, 370-373.
- Brickenkamp R (2009). Test d2. *Adaptación de TEA Ediciones*.
- Brown KM, Pickard K, Nicol F, Beckett GJ, Duthie GG, Arthur JR (2000). Effects of organic and inorganic selenium supplementation on selenoenzyme activity in blood lymphocytes, granulocytes, platelets and erythrocytes. *Clinical science*. **98**, 593-599.
- Bruck J, Gorg B, Bidmon HJ, Zemtsova I, Qvartskhava N, Keitel V, Kircheis G, Haussinger D (2011). Locomotor impairment and cerebrocortical oxidative stress in portal vein ligated rats in vivo. *Journal of hepatology*. **54**, 251-257.
- Burkhard PR, Delavelle J, Du Pasquier R, Spahr L (2003). Chronic parkinsonism associated with cirrhosis: a distinct subset of acquired hepatocerebral degeneration. *Archives of neurology*. **60**, 521-528.
- Bush PA, Gonzalez NE, Griscavage JM, Ignarro LJ (1992). Nitric oxide synthase from cerebellum catalyzes the formation of equimolar quantities of nitric oxide and citrulline from L-arginine. *Biochemical and biophysical research communications*. **185**, 960-966.
- Buss H, Chan TP, Sluis KB, Domigan NM, Winterbourn CC (1997). Protein carbonyl measurement by a sensitive ELISA method. *Free radical biology & medicine*. **23**, 361-366.
- Bustamante J, Rimola A, Ventura PJ, Navasa M, Cirera I, Reggiardo V, Rodes J (1999). Prognostic significance of hepatic encephalopathy in patients with cirrhosis. *Journal of hepatology*. **30**, 890-895.
- Butz M, Timmermann L, Braun M, Groiss SJ, Wojtecki L, Ostrowski S, Krause H, Pollok B, Gross J, Sudmeyer M, Kircheis G, Haussinger D, Schnitzler A (2010). Motor impairment in liver cirrhosis without and with minimal hepatic encephalopathy. *Acta neurologica Scandinavica*. **122**, 27-35.
- Cadenas E, Boveris A, Ragan CI, Stoppani AO (1977). Production of superoxide radicals and hydrogen peroxide by NADH-ubiquinone reductase and ubiquinol-cytochrome c reductase from beef-heart mitochondria. *Archives of biochemistry and biophysics*. **180**, 248-257.
- Cagnin A, Taylor-Robinson SD, Forton DM, Banati RB (2006). In vivo imaging of cerebral "peripheral benzodiazepine binding sites" in patients with hepatic encephalopathy. *Gut*. **55**, 547-553.
- Cauli O, Rodrigo R, Piedrafita B, Boix J, Felipe V (2007). Inflammation and hepatic encephalopathy: ibuprofen restores learning ability in rats with portacaval shunts. *Hepatology*. **46**, 514-519.
- Cauli O, Rodrigo R, Piedrafita B, Llansola M, Mansouri MT, Felipe V (2009). Neuroinflammation contributes to hypokinesia in rats with hepatic encephalopathy: ibuprofen restores its motor activity. *Journal of neuroscience research*. **87**, 1369-1374.
- Clemmesen JO, Larsen FS, Kondrup J, Hansen BA, Ott P (1999). Cerebral herniation in patients with acute liver failure is correlated with arterial ammonia concentration. *Hepatology*. **29**, 648-653.

## VIII. Bibliografia

---

- Company L, Zapater P, Perez-Mateo M, Jover R (2010). Extrapyramidal signs predict the development of overt hepatic encephalopathy in patients with liver cirrhosis. *European journal of gastroenterology & hepatology*. **22**, 519-525.
- Conn HO, Lieberthal MM (1979). The hepatic coma syndromes and lactulose. *Baltimore: Williams and Wilkins*.
- Cooper AJ (1993). Ammonia metabolism in mammals: interorgan relationships. *Advances in experimental medicine and biology*. **341**, 21-37.
- Corbalan R, Chatauret N, Behrends S, Butterworth RF, Felipo V (2002a). Region selective alterations of soluble guanylate cyclase content and modulation in brain of cirrhotic patients. *Hepatology*. **36**, 1155-1162.
- Corbalan R, Montoliu C, Minana MD, Del Olmo JA, Serra MA, Aparisi L, Rodrigo JM, Felipo V (2002b). Altered modulation of soluble guanylate cyclase by nitric oxide in patients with liver disease. *Metabolic brain disease*. **17**, 295-301.
- Cordoba J, Cabrera J, Lataif L, Penev P, Zee P, Blei AT (1998). High prevalence of sleep disturbance in cirrhosis. *Hepatology*. **27**, 339-345.
- Chance B, Schoener B, Oshino R, Itshak F, Nakase Y (1979). Oxidation-reduction ratio studies of mitochondria in freeze-trapped samples. NADH and flavoprotein fluorescence signals. *The Journal of biological chemistry*. **254**, 4764-4771.
- Cheeseman KH, Slater TF (1993). An introduction to free radical biochemistry. *British medical bulletin*. **49**, 481-493.
- Child CG, Turcotte JG (1964). Surgery and portal hypertension. *Major problems in clinical surgery*. **1**, 1-85.
- Chipuk JE, Bouchier-Hayes L, Green DR (2006). Mitochondrial outer membrane permeabilization during apoptosis: the innocent bystander scenario. *Cell death and differentiation*. **13**, 1396-1402.
- Christensen AL (1984). Neuropsychological investigation with Luria's methods. *Scandinavian journal of work, environment & health*. **10 Suppl 1**, 33-34.
- Chung C, Gottstein J, Blei AT (2001). Indomethacin prevents the development of experimental ammonia-induced brain edema in rats after portacaval anastomosis. *Hepatology*. **34**, 249-254.
- Dalle-Donne I, Rossi R, Colombo R, Giustarini D, Milzani A (2006). Biomarkers of oxidative damage in human disease. *Clinical chemistry*. **52**, 601-623.
- Das K, Das K, Datta S, Pal S, Hembram JR, Dhali GK, Santra A, Chowdhury A (2010). Course of disease and survival after onset of decompensation in hepatitis B virus-related cirrhosis. *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver*. **30**, 1033-1042.
- Davies KJ, Quintanilha AT, Brooks GA, Packer L (1982). Free radicals and tissue damage produced by exercise. *Biochemical and biophysical research communications*. **107**, 1198-1205.
- Davies MJ, Slater TF (1987). Studies on the metal-ion and lipoxygenase-catalysed breakdown of hydroperoxides using electron-spin-resonance spectroscopy. *The Biochemical journal*. **245**, 167-173.
- de la Asuncion JG, del Olmo ML, Sastre J, Millan A, Pellin A, Pallardo FV, Viña J (1998). AZT treatment induces molecular and ultrastructural oxidative damage to muscle mitochondria. Prevention by antioxidant vitamins. *The Journal of clinical investigation*. **102**, 4-9.

- Deno PC (1982). Free radical mechanism involved in the formation of sequence-dependent bristanded DNA lesions by the antitumor antibiotics bleomycin. *Chemical Research in Toxicology*. **5**, 311-332
- Dhanda S, Kaur S, Sandhir R (2013). Preventive effect of N-acetyl-L-cysteine on oxidative stress and cognitive impairment in hepatic encephalopathy following bile duct ligation. *Free radical biology & medicine*. **56**, 204-215.
- Dhiman RK, Chawla YK (2009). Minimal hepatic encephalopathy. *Indian journal of gastroenterology : official journal of the Indian Society of Gastroenterology*. **28**, 5-16.
- Ding JM, Chen D, Weber ET, Faiman LE, Rea MA, Gillette MU (1994). Resetting the biological clock: mediation of nocturnal circadian shifts by glutamate and NO. *Science*. **266**, 1713-1717.
- Ding JM, Faiman LE, Hurst WJ, Kuriashkina LR, Gillette MU (1997). Resetting the biological clock: mediation of nocturnal CREB phosphorylation via light, glutamate, and nitric oxide. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. **17**, 667-675.
- Doroshov J, Hochstein P (1982). Redox cycling and the mechanism of action of antibiotics in neoplastic diseases. *Pathology of Oxygen*. New York, Academic Press. 245-253
- Doukas J, Pober JS (1990). IFN-gamma enhances endothelial activation induced by tumor necrosis factor but not IL-1. *Journal of immunology*. **145**, 1727-1733.
- Drose S, Brandt U (2012). Molecular mechanisms of superoxide production by the mitochondrial respiratory chain. *Advances in experimental medicine and biology*. **748**, 145-169.
- EIMlili N, Boix J, Ahabrach H, Rodrigo R, Errami M, Felipe V (2010). Chronic hyperammonemia induces tonic activation of NMDA receptors in cerebellum. *Journal of neurochemistry*. **112**, 1005-1014.
- Erceg S, Monfort P, Hernandez-Viadel M, Llansola M, Montoliu C, Felipe V (2005). Restoration of learning ability in hyperammonemic rats by increasing extracellular cGMP in brain. *Brain research*. **1036**, 115-121.
- Ergün Y, Kurutas EB, Ozdil B, Gunesacar R, Ergün Y (2011). Evaluation of nitrite/nitrate levels in relation to oxidative stress parameters in liver cirrhosis. *Clinics and research in hepatology and gastroenterology*. **35**, 303-308.
- Eriksson AM, Lundgren B, Andersson K, DePierre JW (1992). Is the cytosolic catalase induced by peroxisome proliferators in mouse liver on its way to the peroxisomes? *FEBS letters*. **308**, 211-214.
- Faraci FM, Didion SP (2004). Vascular protection: superoxide dismutase isoforms in the vessel wall. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. **24**, 1367-1373.
- Farina C, Aloisi F, Meinl E (2007). Astrocytes are active players in cerebral innate immunity. *Trends in immunology*. **28**, 138-145.
- Feldmann M, Brennan FM, Foxwell BM, Maini RN (2001). The role of TNF alpha and IL-1 in rheumatoid arthritis. *Current directions in autoimmunity*. **3**, 188-199.
- Felipo V (2013). Hepatic encephalopathy: effects of liver failure on brain function. *Nature reviews. Neuroscience*. **14**, 851-858.
- Felipo V, Butterworth RF (2002). Neurobiology of ammonia. *Progress in neurobiology*. **67**, 259-279.
- Felipo V, Ordone JF, Urios A, El Mlili N, Gimenez-Garzo C, Aguado C, Gonzalez-Lopez O, Giner-Duran R, Serra MA, Wassel A, Rodrigo JM, Salazar J, Montoliu C (2012a). Patients with minimal hepatic encephalopathy show impaired mismatch negativity correlating with reduced performance in attention tests. *Hepatology*. **55**, 530-539.

## VIII. Bibliografía

---

- 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, Jorda E, Montoliu C (2012b). Contribution of hyperammonemia and inflammatory factors to cognitive impairment in minimal hepatic encephalopathy. *Metabolic brain disease*. **27**, 51-58.
- Felipo V, Urios A, Valero P, Sanchez M, Serra MA, Pareja I, Rodriguez F, Gimenez-Garzo C, Sanmartin J, Montoliu C (2013). Serum nitrotyrosine and psychometric tests as indicators of impaired fitness to drive in cirrhotic patients with minimal hepatic encephalopathy. *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver*. **33**, 1478-1489.
- Fenton HJH (1984). Oxidation of tartaric acid in the presence of iron. *Journal of the Chemical Society, Transactions*. **65**, 899-910
- Ferenci P, Lockwood A, Mullen K, Tarter R, Weissenborn K, Blei AT (2002). Hepatic encephalopathy--definition, nomenclature, diagnosis, and quantification: final report of the working party at the 11th World Congresses of Gastroenterology, Vienna, 1998. *Hepatology*. **35**, 716-721.
- Fong Y, Tracey KJ, Moldawer LL, Hesse DG, Manogue KB, Kenney JS, Lee AT, Kuo GC, Allison AC, Lowry SF, et al. (1989). Antibodies to cachectin/tumor necrosis factor reduce interleukin 1 beta and interleukin 6 appearance during lethal bacteremia. *The Journal of experimental medicine*. **170**, 1627-1633.
- Forstrom JW, Zakowski JJ, Tappel AL (1978). Identification of the catalytic site of rat liver glutathione peroxidase as selenocysteine. *Biochemistry*. **17**, 2639-2644.
- Freeman BA, Crapo JD (1982). Biology of disease: free radicals and tissue injury. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. **47**, 412-426.
- Frei B (1994). Reactive oxygen species and antioxidant vitamins: mechanisms of action. *The American journal of medicine*. **97**, 5S-13S; discussion 22S-28S.
- Fridovich I (1974). Superoxide dismutases. *Advances in enzymology and related areas of molecular biology*. **41**, 35-97.
- Fridovich I (1997). Superoxide anion radical (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), superoxide dismutases, and related matters. *The Journal of biological chemistry*. **272**, 18515-18517.
- Friedman SL (2004). Mechanisms of disease: Mechanisms of hepatic fibrosis and therapeutic implications. *Nature clinical practice. Gastroenterology & hepatology*. **1**, 98-105.
- Friedman S, Schiano T (2004). Cirrhosis and its sequelae. In: Goldman L, Ausiello D, eds. *Cecil Textbook of Medicine*. 22nd ed. Philadelphia, Pa.: Saunders. 936-44.
- Fung HB, Kirschenbaum HL (1999). Selective cyclooxygenase-2 inhibitors for the treatment of arthritis. *Clinical therapeutics*. **21**, 1131-1157.
- Furlan R, Bergami A, Lang R, Brambilla E, Franciotta D, Martinelli V, Comi G, Panina P, Martino G (2000). Interferon-beta treatment in multiple sclerosis patients decreases the number of circulating T cells producing interferon-gamma and interleukin-4. *Journal of neuroimmunology*. **111**, 86-92.
- Gattorno M, Piccini A, Lasiglie D, Tassi S, Brisca G, Carta S, Delfino L, Ferlito F, Pelagatti MA, Caroli F, Buoncompagni A, Viola S, Loy A, Sironi M, Vecchi A, Ravelli A, Martini A, Rubartelli A (2008). The pattern of response to anti-interleukin-1 treatment distinguishes two subsets of patients with systemic-onset juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis and rheumatism*. **58**, 1505-1515.
- Gazzard BG, Price H, Dawson AM (1986). Detection of hepatic encephalopathy. *Postgraduate medical journal*. **62**, 163-166.
- Geetha A, Lakshmi Priya MD, Jeyachristy SA, Surendran R (2007). Level of oxidative stress in the red blood cells of patients with liver cirrhosis. *The Indian journal of medical research*. **126**, 204-210.

- Gerli G, Locatelli GF, Mongiat R, Zenoni L, Agostoni A, Moschini G, Zafiroopoulos D, Bruno S, Rossi S, Vignati A, et al. (1992). Erythrocyte antioxidant activity, serum ceruloplasmin, and trace element levels in subjects with alcoholic liver disease. *American journal of clinical pathology*. **97**, 614-618.
- Gerok W, Haussinger D (1984). [Ammonium detoxication and pH regulation by the liver]. *Die Medizinische Welt*. **35**, 28-34.
- Gibson GE, Zimber A, Krook L, Richardson EP, Visek WJ (1974). Brain histology and behavior of mice injected with urease. *Journal of neuropathology and experimental neurology*. **33**, 201-211.
- Giguere JF, Hamel E, Butterworth RF (1992). Increased densities of binding sites for the 'peripheral-type' benzodiazepine receptor ligand [3H]PK 11195 in rat brain following portacaval anastomosis. *Brain research*. **585**, 295-298.
- Goldberg DM, Spooner RJ (1984). Glutathione reductase. *H.U. Bergmeyer (Ed.), Methods of Enzymatic Analysis, Vol. 3, Wiley, New York*. 259-265
- Golden CJ (2001). Stroop Color and Word Test. *Adaptación de TEA Ediciones*.
- Gonzalez-Scarano F, Baltuch G (1999). Microglia as mediators of inflammatory and degenerative diseases. *Annual review of neuroscience*. **22**, 219-240.
- Gordon C, Wofsy D (1990). Effects of recombinant murine tumor necrosis factor-alpha on immune function. *Journal of immunology*. **144**, 1753-1758.
- Görg B, Bidmon HJ, Haussinger D (2013). Gene expression profiling in the cerebral cortex of patients with cirrhosis with and without hepatic encephalopathy. *Hepatology*. **57**, 2436-2447.
- Görg B, Qvartskhava N, Bidmon HJ, Palomero-Gallagher N, Kircheis G, Zilles K, Haussinger D (2010). Oxidative stress markers in the brain of patients with cirrhosis and hepatic encephalopathy. *Hepatology*. **52**, 256-265.
- Gow AJ, Farkouh CR, Munson DA, Posencheg MA, Ischiropoulos H (2004). Biological significance of nitric oxide-mediated protein modifications. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*. **287**, L262-268.
- Green DR, Reed JC (1998). Mitochondria and apoptosis. *Science*. **281**, 1309-1312.
- Greenwald RA, Moy WW (1980). Effect of oxygen-derived free radicals on hyaluronic acid. *Arthritis and rheumatism*. **23**, 455-463.
- Griffith OW, Meister A (1985). Origin and turnover of mitochondrial glutathione. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **82**, 4668-4672.
- Groeneweg M, Quero JC, De Bruijn I, Hartmann IJ, Essink-bot ML, Hop WC, Schalm SW (1998). Subclinical hepatic encephalopathy impairs daily functioning. *Hepatology*. **28**, 45-49.
- Habig WH, Jakoby WB (1981). Assays for differentiation of glutathione S-transferases. *Methods in enzymology*. **77**, 398-405.
- Halestrap AP, Pasdois P (2009). The role of the mitochondrial permeability transition pore in heart disease. *Biochimica et biophysica acta*. **1787**, 1402-1415.
- Halliwell B (1989). Tell me about free radicals, doctor: a review. *Journal of the Royal Society of Medicine*. **82**, 747-752.
- Halliwell B (1991). Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry, and role in human disease. *The American journal of medicine*. **91**, 14S-22S.

## VIII. Bibliografía

---

- Halliwell B (1996). Free radicals, proteins and DNA: oxidative damage versus redox regulation. *Biochemical Society transactions*. **24**, 1023-1027.
- Halliwell B (2001). Role of free radicals in the neurodegenerative diseases: therapeutic implications for antioxidant treatment. *Drugs & aging*. **18**, 685-716.
- Halliwell B (2006). Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? *Journal of neurochemistry*. **97**, 1634-1658.
- Harber F, Weiss J (1934). The catalytic compensation of hydrogen peroxide by iron salts. *Proceedings of the Royal Society of London*. **147**, 332-351
- Harington CR, Mead TH (1935). Synthesis of glutathione. *The Biochemical journal*. **29**, 1602-1611.
- Harman D (2001). Aging: overview. *Annals of the New York Academy of Sciences*. **928**, 1-21.
- Hassan HM, Fridovich I (1978). Superoxide radical and the oxygen enhancement of the toxicity of paraquat in *Escherichia coli*. *The Journal of biological chemistry*. **253**, 8143-8148.
- Hernandez R, Martinez-Lara E, Del Moral ML, Blanco S, Canuelo A, Siles E, Esteban FJ, Pedrosa JA, Peinado MA (2004). Upregulation of endothelial nitric oxide synthase maintains nitric oxide production in the cerebellum of thioacetamide cirrhotic rats. *Neuroscience*. **126**, 879-887.
- Heron M, Hoyert DL, Murphy SL, Xu J, Kochanek KD, Tejada-Vera B (2009). Deaths: final data for 2006. *National vital statistics reports : from the Centers for Disease Control and Prevention, National Center for Health Statistics, National Vital Statistics System*. **57**, 1-134.
- Higuchi Y (2004). Glutathione depletion-induced chromosomal DNA fragmentation associated with apoptosis and necrosis. *Journal of cellular and molecular medicine*. **8**, 455-464.
- Hilgier W, Anderzhanova E, Oja SS, Saransaari P, Albrecht J (2003). Taurine reduces ammonia- and N-methyl-D-aspartate-induced accumulation of cyclic GMP and hydroxyl radicals in microdialysates of the rat striatum. *European journal of pharmacology*. **468**, 21-25.
- Hilsabeck RC, Perry W, Hassanein TI (2002). Neuropsychological impairment in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology*. **35**, 440-446.
- Hille R (1996). The Mononuclear Molybdenum Enzymes. *Chemical reviews*. **96**, 2757-2816.
- Hille R, Nishino T (1995). Flavoprotein structure and mechanism. 4. Xanthine oxidase and xanthine dehydrogenase. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. **9**, 995-1003.
- Holmgren A (1979). Glutathione-dependent synthesis of deoxyribonucleotides. Characterization of the enzymatic mechanism of *Escherichia coli* glutaredoxin. *The Journal of biological chemistry*. **254**, 3672-3678.
- Hopkins FG (1921). On an Autoxidisable Constituent of the Cell. *The Biochemical journal*. **15**, 286-305.
- Hwang C, Sinskey AJ, Lodish HF (1992). Oxidized redox state of glutathione in the endoplasmic reticulum. *Science*. **257**, 1496-1502.
- Ibiza S, Victor VM, Bosca I, Ortega A, Urzainqui A, O'Connor JE, Sanchez-Madrid F, Esplugues JV, Serrador JM (2006). Endothelial nitric oxide synthase regulates T cell receptor signaling at the immunological synapse. *Immunity*. **24**, 753-765.
- Ishikawa T, Zimmer M, Sies H (1986). Energy-linked cardiac transport system for glutathione disulfide. *FEBS letters*. **200**, 128-132.

- Iversen P, Hansen DA, Bender D, Rodell A, Munk OL, Cumming P, Keiding S (2006). Peripheral benzodiazepine receptors in the brain of cirrhosis patients with manifest hepatic encephalopathy. *European journal of nuclear medicine and molecular imaging*. **33**, 810-816.
- Jiang W, Desjardins P, Butterworth RF (2009a). Hypothermia attenuates oxidative/nitrosative stress, encephalopathy and brain edema in acute (ischemic) liver failure. *Neurochemistry international*. **55**, 124-128.
- Jiang W, Desjardins P, Butterworth RF (2009b). Minocycline attenuates oxidative/nitrosative stress and cerebral complications of acute liver failure in rats. *Neurochemistry international*. **55**, 601-605.
- Joebges EM, Heidemann M, Schimke N, Hecker H, Ennen JC, Weissenborn K (2003). Bradykinesia in minimal hepatic encephalopathy is due to disturbances in movement initiation. *Journal of hepatology*. **38**, 273-280.
- Jones EA, Weissenborn K (1997). Neurology and the liver. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*. **63**, 279-293.
- Jover R, Company L, Gutierrez A, Lorente M, Zapater P, Poveda MJ, Such J, Pascual S, Palazon JM, Carnicer F, Ferrandis F, Perez-Mateo M (2005). Clinical significance of extrapyramidal signs in patients with cirrhosis. *Journal of hepatology*. **42**, 659-665.
- Jover R, Company L, Gutierrez A, Zapater P, Perez-Serra J, Girona E, Aparicio JR, Perez-Mateo M (2003). Minimal hepatic encephalopathy and extrapyramidal signs in patients with cirrhosis. *The American journal of gastroenterology*. **98**, 1599-1604.
- Jover R, Rodrigo 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 (2006). Brain edema and inflammatory activation in bile duct ligated rats with diet-induced hyperammonemia: A model of hepatic encephalopathy in cirrhosis. *Hepatology*. **43**, 1257-1266.
- Kahle P, Saal JG, Schaudt K, Zacher J, Fritz P, Pawelec G (1992). Determination of cytokines in synovial fluids: correlation with diagnosis and histomorphological characteristics of synovial tissue. *Annals of the rheumatic diseases*. **51**, 731-734.
- Kalyanaraman B (2013). Teaching the basics of redox biology to medical and graduate students: Oxidants, antioxidants and disease mechanisms. *Redox biology*. **1**, 244-257.
- Kamath PS, Wiesner RH, Malinchoc M, Kremers W, Therneau TM, Kosberg CL, D'Amico G, Dickson ER, Kim WR (2001). A model to predict survival in patients with end-stage liver disease. *Hepatology*. **33**, 464-470.
- Kaminsky Y, Suslikov A, Kosenko E (2010). Specific and pronounced impacts of lisinopril and lisinopril plus simvastatin on erythrocyte antioxidant enzymes. *Journal of clinical pharmacology*. **50**, 180-187.
- Ketterer B (1986). Detoxication reactions of glutathione and glutathione transferases. *Xenobiotica; the fate of foreign compounds in biological systems*. **16**, 957-973.
- Kinnula VL, Crapo JD, Raivio KO (1995). Generation and disposal of reactive oxygen metabolites in the lung. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. **73**, 3-19.
- Kircheis G, Wettstein M, Timmermann L, Schnitzler A, Haussinger D (2002). Critical flicker frequency for quantification of low-grade hepatic encephalopathy. *Hepatology*. **35**, 357-366.
- Kosenko E, Kaminski Y, Lopata O, Muravyov N, Felipe V (1999). Blocking NMDA receptors prevents the oxidative stress induced by acute ammonia intoxication. *Free radical biology & medicine*. **26**, 1369-1374.

## VIII. Bibliografia

---

- Kosenko E, Kaminsky Y, Kaminsky A, Valencia M, Lee L, Hermenegildo C, Felipo V (1997). Superoxide production and antioxidant enzymes in ammonia intoxication in rats. *Free radical research*. **27**, 637-644.
- Kosenko E, Venediktova N, Kaminsky Y, Montoliu C, Felipo V (2003). Sources of oxygen radicals in brain in acute ammonia intoxication in vivo. *Brain research*. **981**, 193-200.
- Kosower NS, Kosower EM (1978). The glutathione status of cells. *International review of cytology*. **54**, 109-160.
- Kowaltowski AJ (2000). Alternative mitochondrial functions in cell physiopathology: beyond ATP production. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas / Sociedade Brasileira de Biofisica ... [et al.]*. **33**, 241-250.
- Krajcovicova-Kudlackova M, Dusinska M, Valachovicova M, Blazicek P, Paukova V (2006). Products of DNA, protein and lipid oxidative damage in relation to vitamin C plasma concentration. *Physiological research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca*. **55**, 227-231.
- Krieger S, Jauss M, Jansen O, Theilmann L, Geissler M, Krieger D (1996). Neuropsychiatric profile and hyperintense globus pallidus on T1-weighted magnetic resonance images in liver cirrhosis. *Gastroenterology*. **111**, 147-155.
- Lavoie J, Layrargues GP, Butterworth RF (1990). Increased densities of peripheral-type benzodiazepine receptors in brain autopsy samples from cirrhotic patients with hepatic encephalopathy. *Hepatology*. **11**, 874-878.
- Lawrence RA, Burk RF (1976). Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *Biochemical and biophysical research communications*. **71**, 952-958.
- Ledeboer A, Breve JJ, Poole S, Tilders FJ, Van Dam AM (2000). Interleukin-10, interleukin-4, and transforming growth factor-beta differentially regulate lipopolysaccharide-induced production of pro-inflammatory cytokines and nitric oxide in co-cultures of rat astroglial and microglial cells. *Glia*. **30**, 134-142.
- Lee SH, Soyoola E, Chanmugam P, Hart S, Sun W, Zhong H, Liou S, Simmons D, Hwang D (1992). Selective expression of mitogen-inducible cyclooxygenase in macrophages stimulated with lipopolysaccharide. *The Journal of biological chemistry*. **267**, 25934-25938.
- Lehnardt S (2010). Innate immunity and neuroinflammation in the CNS: the role of microglia in Toll-like receptor-mediated neuronal injury. *Glia*. **58**, 253-263.
- Levi G, Minghetti L, Aloisi F (1998). Regulation of prostanoid synthesis in microglial cells and effects of prostaglandin E2 on microglial functions. *Biochimie*. **80**, 899-904.
- Linnane AW, Marzuki S, Ozawa T, Tanaka M (1989). Mitochondrial DNA mutations as an important contributor to ageing and degenerative diseases. *Lancet*. **1**, 642-645.
- Linton PJ, Dorshkind K (2004). Age-related changes in lymphocyte development and function. *Nature immunology*. **5**, 133-139.
- Liochev SI, Fridovich I (1994). The role of O<sub>2</sub><sup>-</sup> in the production of HO<sub>2</sub><sup>·</sup>: in vitro and in vivo. *Free radical biology & medicine*. **16**, 29-33.
- Liu XM, Peyton KJ, Ensenat D, Wang H, Hannink M, Alam J, Durante W (2007). Nitric oxide stimulates heme oxygenase-1 gene transcription via the Nrf2/ARE complex to promote vascular smooth muscle cell survival. *Cardiovascular research*. **75**, 381-389.
- Lockwood AH (2000). "What's in a name?" Improving the care of cirrhotics. *Journal of hepatology*. **32**, 859-861.



- Lockwood AH, Murphy BW, Donnelly KZ, Mahl TC, Perini S (1993). Positron-emission tomographic localization of abnormalities of brain metabolism in patients with minimal hepatic encephalopathy. *Hepatology*. **18**, 1061-1068.
- Lu SC (2009). Regulation of glutathione synthesis. *Molecular aspects of medicine*. **30**, 42-59.
- Maccioni RB, Rojo LE, Fernandez JA, Kuljis RO (2009). The role of neuroimmunomodulation in Alzheimer's disease. *Annals of the New York Academy of Sciences*. **1153**, 240-246.
- MacMillan-Crow LA, Thompson JA (1999). Tyrosine modifications and inactivation of active site manganese superoxide dismutase mutant (Y34F) by peroxynitrite. *Archives of biochemistry and biophysics*. **366**, 82-88.
- Male D, Brostoff J, Roth D, Roitt I (2012). Immunology, 8th Edition. *Elsevier (Ed.)*.
- Margis R, Dunand C, Teixeira FK, Margis-Pinheiro M (2008). Glutathione peroxidase family - an evolutionary overview. *The FEBS journal*. **275**, 3959-3970.
- Marini JC, Broussard SR (2006). Hyperammonemia increases sensitivity to LPS. *Molecular genetics and metabolism*. **88**, 131-137.
- Marklund SL (1984). Extracellular superoxide dismutase and other superoxide dismutase isoenzymes in tissues from nine mammalian species. *The Biochemical journal*. **222**, 649-655.
- Marklund SL, Holme E, Hellner L (1982). Superoxide dismutase in extracellular fluids. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. **126**, 41-51.
- Marley R, Harry D, Anand R, Fernando B, Davies S, Moore K (1997). 8-Isoprostaglandin F2 alpha, a product of lipid peroxidation, increases portal pressure in normal and cirrhotic rats. *Gastroenterology*. **112**, 208-213.
- Marshall KA, Reist M, Jenner P, Halliwell B (1999). The neuronal toxicity of sulfite plus peroxynitrite is enhanced by glutathione depletion: implications for Parkinson's disease. *Free radical biology & medicine*. **27**, 515-520.
- Mason RP (1982). Free radical intermediates in the metabolism of toxicological significance. *Free radicals biology. W.A. Pryor. New York, Academic Press*. 212-165
- McCord JM, Fridovich I (1969). Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). *The Journal of biological chemistry*. **244**, 6049-6055.
- McPhail MJ, Bajaj JS, Thomas HC, Taylor-Robinson SD (2010). Pathogenesis and diagnosis of hepatic encephalopathy. *Expert review of gastroenterology & hepatology*. **4**, 365-378.
- Mechtcheriakov S, Graziadei IW, Rettenbacher M, Schuster I, Hinterhuber H, Vogel W, Marksteiner J (2005). Diagnostic value of fine motor deficits in patients with low-grade hepatic encephalopathy. *World journal of gastroenterology : WJG*. **11**, 2777-2780.
- Michalak A, Butterworth RF (1997). Ornithine transcarbamylase deficiency: pathogenesis of the cerebral disorder and new prospects for therapy. *Metabolic brain disease*. **12**, 171-182.
- Miquel J, Economos AC, Fleming J, Johnson JE, Jr. (1980). Mitochondrial role in cell aging. *Experimental gerontology*. **15**, 575-591.
- Mollace V, Muscoli C, Masini E, Cuzzocrea S, Salvemini D (2005). Modulation of prostaglandin biosynthesis by nitric oxide and nitric oxide donors. *Pharmacological reviews*. **57**, 217-252.
- Moncada S, Palmer RM, Higgs EA (1991). Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacological reviews*. **43**, 109-142.

## VIII. Bibliografia

---

- Monfort P, Corbalan R, Martinez L, Lopez-Talavera J, Cordoba J, Felipo V (2001). Altered content and modulation of soluble guanylate cyclase in the cerebellum of rats with portacaval anastomosis. *Neuroscience*. **104**, 1119-1125.
- Montoliu C, Cauli O, Urios A, EIMlili N, Serra MA, Giner-Duran R, Gonzalez-Lopez O, Del Olmo JA, Wassel A, Rodrigo JM, Felipo V (2011). 3-nitro-tyrosine as a peripheral biomarker of minimal hepatic encephalopathy in patients with liver cirrhosis. *The American journal of gastroenterology*. **106**, 1629-1637.
- Montoliu C, Piedrafita B, Serra MA, del Olmo JA, Ferrandez A, Rodrigo JM, Felipo V (2007). Activation of soluble guanylate cyclase by nitric oxide in lymphocytes correlates with minimal hepatic encephalopathy in cirrhotic patients. *Journal of molecular medicine*. **85**, 237-245.
- Montoliu C, Piedrafita B, Serra MA, del Olmo JA, Urios A, Rodrigo JM, Felipo V (2009). IL-6 and IL-18 in blood may discriminate cirrhotic patients with and without minimal hepatic encephalopathy. *Journal of clinical gastroenterology*. **43**, 272-279.
- Moshage H, Kok B, Huizenga JR, Jansen PL (1995). Nitrite and nitrate determinations in plasma: a critical evaluation. *Clinical chemistry*. **41**, 892-896.
- Msall M, Batshaw ML, Suss R, Brusilow SW, Mellits ED (1984). Neurologic outcome in children with inborn errors of urea synthesis. Outcome of urea-cycle enzymopathies. *The New England journal of medicine*. **310**, 1500-1505.
- Murthy CR, Rama Rao KV, Bai G, Norenberg MD (2001). Ammonia-induced production of free radicals in primary cultures of rat astrocytes. *Journal of neuroscience research*. **66**, 282-288.
- Muscoli C, Dagostino C, Ilari S, Lauro F, Gliozzi M, Bardhi E, Palma E, Mollace V, Salvemini D (2013). Posttranslational nitration of tyrosine residues modulates glutamate transmission and contributes to N-methyl-D-aspartate-mediated thermal hyperalgesia. *Mediators of inflammation*. **2013**, 950947.
- Nakanishi K, Yoshimoto T, Tsutsui H, Okamura H (2001). Interleukin-18 regulates both Th1 and Th2 responses. *Annual review of immunology*. **19**, 423-474.
- Nalini G, Hariprasad C, Narayanan VA (1999). Oxidative stress in alcoholic liver disease. *The Indian journal of medical research*. **110**, 200-203.
- Negru T, Ghiea V, Pasarica D (1999). Oxidative injury and other metabolic disorders in hepatic encephalopathy. *Romanian journal of physiology : physiological sciences / [Academia de Stiinte Medicale]*. **36**, 29-36.
- Nordmann R (1994). Alcohol and antioxidant systems. *Alcohol and alcoholism*. **29**, 513-522.
- Norenberg MD (1987). The role of astrocytes in hepatic encephalopathy. *Neurochemical pathology*. **6**, 13-33.
- Norenberg MD, Jayakumar AR, Rama Rao KV (2004). Oxidative stress in the pathogenesis of hepatic encephalopathy. *Metabolic brain disease*. **19**, 313-329.
- Norenberg MD, Jayakumar AR, Rama Rao KV, Panickar KS (2007). New concepts in the mechanism of ammonia-induced astrocyte swelling. *Metabolic brain disease*. **22**, 219-234.
- Nozik-Grayck E, Suliman HB, Piantadosi CA (2005). Extracellular superoxide dismutase. *The international journal of biochemistry & cell biology*. **37**, 2466-2471.
- O'Connor JE, Costell M (1990). New roles of carnitine metabolism in ammonia cytotoxicity. *Advances in experimental medicine and biology*. **272**, 183-195.

- Ochoa S (1983). Regulation of protein synthesis initiation in eucaryotes. *Archives of biochemistry and biophysics*. **223**, 325-349.
- Odeh M, Sabo E, Srujo I, Oliven A (2004). Serum levels of tumor necrosis factor-alpha correlate with severity of hepatic encephalopathy due to chronic liver failure. *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver*. **24**, 110-116.
- Oltra AM, Carbonell F, Tormos C, Iradi A, Saez GT (2001). Antioxidant enzyme activities and the production of MDA and 8-oxo-dG in chronic lymphocytic leukemia. *Free radical biology & medicine*. **30**, 1286-1292.
- Orrenius S, Moldeus P (1984). The multiple roles of glutathione in drug metabolism. *Trends in Pharmacological Sciences*. **5**, 432-435
- Pacifici RE, Davies KJ (1991). Protein, lipid and DNA repair systems in oxidative stress: the free-radical theory of aging revisited. *Gerontology*. **37**, 166-180.
- Pacher P, Beckman JS, Liaudet L (2007). Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiological reviews*. **87**, 315-424.
- Pajares MA, Corrales F, Duran C, Mato JM, Alvarez L (1992a). How is rat liver S-adenosylmethionine synthetase regulated? *FEBS letters*. **309**, 1-4.
- Pajares MA, Duran C, Corrales F, Pliego MM, Mato JM (1992b). Modulation of rat liver S-adenosylmethionine synthetase activity by glutathione. *The Journal of biological chemistry*. **267**, 17598-17605.
- Pape HC, McCormick DA (1995). Electrophysiological and pharmacological properties of interneurons in the cat dorsal lateral geniculate nucleus. *Neuroscience*. **68**, 1105-1125.
- Patel RP, Levonen A, Crawford JH, Darley-USmar VM (2000). Mechanisms of the pro- and anti-oxidant actions of nitric oxide in atherosclerosis. *Cardiovascular research*. **47**, 465-474.
- Paul F, Muller J, Christe W, Steinmuller T, Poewe W, Wissel J (2004). Postural hand tremor before and following liver transplantation and immunosuppression with cyclosporine or tacrolimus in patients without clinical signs of hepatic encephalopathy. *Clinical transplantation*. **18**, 429-433.
- Postlethwait EM, Langford SD, Jacobson LM, Bidani A (1995). NO<sub>2</sub> reactive absorption substrates in rat pulmonary surface lining fluids. *Free radical biology & medicine*. **19**, 553-563.
- Prasad S, Dhiman RK, Duseja A, Chawla YK, Sharma A, Agarwal R (2007). Lactulose improves cognitive functions and health-related quality of life in patients with cirrhosis who have minimal hepatic encephalopathy. *Hepatology*. **45**, 549-559.
- Prasad TK, Anderson MD, Stewart CR (1994). Acclimation, Hydrogen Peroxide, and Abscisic Acid Protect Mitochondria against Irreversible Chilling Injury in Maize Seedlings. *Plant physiology*. **105**, 619-627.
- Puca FM, Antonaci F, Panella C, Guglielmi FW, Barone M, Francavilla A, Cerutti R (1989). Psychomotor dysfunctions in alcoholic and post-necrotic cirrhotic patients without overt encephalopathy. *Acta neurologica Scandinavica*. **79**, 280-287.
- Radi R, Tan S, Prodanov E, Evans RA, Parks DA (1992). Inhibition of xanthine oxidase by uric acid and its influence on superoxide radical production. *Biochimica et biophysica acta*. **1122**, 178-182.
- Rama Rao KV, Jayakumar AR, Norenberg DM (2003). Ammonia neurotoxicity: role of the mitochondrial permeability transition. *Metabolic brain disease*. **18**, 113-127.
- Rao VL (2002). Nitric oxide in hepatic encephalopathy and hyperammonemia. *Neurochemistry international*. **41**, 161-170.

## VIII. Bibliografía

---

- Rao VL, Audet RM, Butterworth RF (1995). Increased nitric oxide synthase activities and L-[3H]arginine uptake in brain following portacaval anastomosis. *Journal of neurochemistry*. **65**, 677-678.
- Reddy ST, Herschman HR (1994). Ligand-induced prostaglandin synthesis requires expression of the TIS10/PGS-2 prostaglandin synthase gene in murine fibroblasts and macrophages. *The Journal of biological chemistry*. **269**, 15473-15480.
- Rehnstrom S, Simert G, Hansson JA, Johnson G, Vang J (1977). Chronic hepatic encephalopathy. A psychometrical study. *Scandinavian journal of gastroenterology*. **12**, 305-311.
- Ridnour LA, Thomas DD, Mancardi D, Espey MG, Miranda KM, Paolucci N, Feelisch M, Fukuto J, Wink DA (2004). The chemistry of nitrosative stress induced by nitric oxide and reactive nitrogen oxide species. Putting perspective on stressful biological situations. *Biological chemistry*. **385**, 1-10.
- Rickwood DW, Wilson MT, Darley-Usmar VM (1987). Isolation and characteristics of intact mitochondria. *In mitochondria: A Practical Approach pp. 4-6, IRL PRESS, Oxford*.
- Riordan SM, Williams R (1997). Treatment of hepatic encephalopathy. *The New England journal of medicine*. **337**, 473-479.
- Rodrigo J, Alonso D, Fernandez A, Serrano J, Lopez J (2000). [Nitric oxide: synthesis, neuroprotection and neurotoxicity]. *Anales del sistema sanitario de Navarra*. **23**, 195-235.
- Rodrigo R, Cauli O, Gomez-Pinedo U, Agusti A, Hernandez-Rabaza V, Garcia-Verdugo JM, Felipe V (2010). Hyperammonemia induces neuroinflammation that contributes to cognitive impairment in rats with hepatic encephalopathy. *Gastroenterology*. **139**, 675-684.
- Rodrigo R, Jover R, Candela A, Compan A, Saez-Valero J, Erceg S, Felipe V (2005). Bile duct ligation plus hyperammonemia in rats reproduces the alterations in the modulation of soluble guanylate cyclase by nitric oxide in brain of cirrhotic patients. *Neuroscience*. **130**, 435-443.
- Rodrigo R, Montoliu C, Chatauret N, Butterworth R, Behrends S, Del Olmo JA, Serra MA, Rodrigo JM, Erceg S, Felipe V (2004). Alterations in soluble guanylate cyclase content and modulation by nitric oxide in liver disease. *Neurochemistry international*. **45**, 947-953.
- Rolando N, Wade J, Davalos M, Wendon J, Philpott-Howard J, Williams R (2000). The systemic inflammatory response syndrome in acute liver failure. *Hepatology*. **32**, 734-739.
- Roman E, Cordoba J, Torrens M, Torras X, Villanueva C, Vargas V, Guarner C, Soriano G (2011). Minimal hepatic encephalopathy is associated with falls. *The American journal of gastroenterology*. **106**, 476-482.
- Romero-Gomez M, Cordoba J, Jover R, del Olmo JA, Fernandez A, Flavià M, Company L, Poveda MJ, Felipe V (2006). Tablas de normalidad de la población española para los tests psicométricos utilizados en el diagnóstico de la encefalopatía hepática mínima. *Medicina Clínica (Barcelona)*. **127**, 246-249
- Romero-Gomez M, Cordoba J, Jover R, del Olmo JA, Ramirez M, Rey R, de Madaria E, Montoliu C, Nunez D, Flavia M, Company L, Rodrigo JM, Felipe V (2007). Value of the critical flicker frequency in patients with minimal hepatic encephalopathy. *Hepatology*. **45**, 879-885.
- Ryter SW, Choi AM (2002). Heme oxygenase-1: molecular mechanisms of gene expression in oxygen-related stress. *Antioxidants & redox signaling*. **4**, 625-632.
- Saraste M (1999). Oxidative phosphorylation at the fin de siecle. *Science*. **283**, 1488-1493.
- Sastre J, Asensi M, Gasco E, Pallardo FV, Ferrero JA, Furukawa T, Viña J (1992). Exhaustive physical exercise causes oxidation of glutathione status in blood: prevention by antioxidant administration. *The American journal of physiology*. **263**, R992-995.

- Sastre J, Martin JA, Gomez-Cabrera MC, Pereda J, Borrás C, Pallardo FV, Viña J (2005). Age-associated oxidative damage leads to absence of gamma-cystathionase in over 50% of rat lenses: relevance in cataractogenesis. *Free radical biology & medicine*. **38**, 575-582.
- Sastre J, Pallardo FV, Pla R, Pellin A, Juan G, O'Connor JE, Estrela JM, Miquel J, Viña J (1996). Aging of the liver: age-associated mitochondrial damage in intact hepatocytes. *Hepatology*. **24**, 1199-1205.
- Saugstad OD (1990). Oxygen toxicity in the neonatal period. *Acta paediatrica Scandinavica*. **79**, 881-892.
- Sawara K, Desjardins P, Chatauret N, Kato A, Suzuki K, Butterworth RF (2009). Alterations in expression of genes coding for proteins of the neurovascular unit in ischemic liver failure. *Neurochemistry international*. **55**, 119-123.
- Sawyer DT (1988). The redox thermodynamics for dioxygen species (O<sub>2</sub>, O<sub>2</sub><sup>-</sup>, HOO·, HOOH, and HOO<sup>-</sup>) and monooxygen species (O, O<sup>-</sup>, ·OH, and -OH) in water and aprotic solvents. *Basic life sciences*. **49**, 11-20.
- Schomerus H, Hamster W (1998). Neuropsychological aspects of portal-systemic encephalopathy. *Metabolic brain disease*. **13**, 361-377.
- Schomerus H, Hamster W, Blunck H, Reinhard U, Mayer K, Dolle W (1981). Latent portasystemic encephalopathy. I. Nature of cerebral functional defects and their effect on fitness to drive. *Digestive diseases and sciences*. **26**, 622-630.
- Schroder JM, Sticherling M, Henneicke HH, Preissner WC, Christophers E (1990). IL-1 alpha or tumor necrosis factor-alpha stimulate release of three NAP-1/IL-8-related neutrophil chemotactic proteins in human dermal fibroblasts. *Journal of immunology*. **144**, 2223-2232.
- Schuppan D, Afdhal NH (2008). Liver cirrhosis. *Lancet*. **371**, 838-851.
- Seiler N (1993). Is ammonia a pathogenetic factor in Alzheimer's disease? *Neurochemical research*. **18**, 235-245.
- Seiler N (2002). Ammonia and Alzheimer's disease. *Neurochemistry international*. **41**, 189-207.
- Shapiro HM (1988). Practical flow cytometry. *John Wiley & Sons (Ed.)*
- Shawcross DL, Davies NA, Williams R, Jalan R (2004). Systemic inflammatory response exacerbates the neuropsychological effects of induced hyperammonemia in cirrhosis. *Journal of hepatology*. **40**, 247-254.
- Shawcross DL, Sharifi Y, Canavan JB, Yeoman AD, Abeles RD, Taylor NJ, Auzinger G, Bernal W, Wendon JA (2011). Infection and systemic inflammation, not ammonia, are associated with Grade 3/4 hepatic encephalopathy, but not mortality in cirrhosis. *Journal of hepatology*. **54**, 640-649.
- Sherlock S, Summerskill WH, White LP, Phear EA (1954). Portal-systemic encephalopathy; neurological complications of liver disease. *Lancet*. **267**, 454-457.
- Shih VE (1978). Urea cycle disorders and other congenital hyperammonemic syndromes. *The Metabolic Basis of Inherited Diseases, McGrawHill, New York*. 362-386.
- Shih VE, Tanaka K (1978). Plasma and urine amino acid changes in rats treated with hypoglycin. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. **88**, 539-543.
- Sies H (1986). Biochemistry of oxidative stress. *Angewandte Chem*. **25**, 1058-1071
- Sies H (1993). Strategies of antioxidant defense. *European journal of biochemistry / FEBS*. **215**, 213-219.
- Simic MG, Taylor KA (1988). Introduction to peroxidation and antioxidation mechanisms. *Basic life sciences*. **49**, 1-10.

## VIII. Bibliografia

---

- Simon LS (1999). Role and regulation of cyclooxygenase-2 during inflammation. *The American journal of medicine*. **106**, 375-425.
- Siqueira C, de Moura MC, Pedro AJ, Rocha P (2008). Elevated nitric oxide and 3',5' cyclic guanosine monophosphate levels in patients with alcoholic cirrhosis. *World journal of gastroenterology : WJG*. **14**, 236-242.
- Skulachev VP (1996). Role of uncoupled and non-coupled oxidations in maintenance of safely low levels of oxygen and its one-electron reductants. *Quarterly reviews of biophysics*. **29**, 169-202.
- Slade R, Crissman K, Norwood J, Hatch G (1993). Comparison of antioxidant substances in bronchoalveolar lavage cells and fluid from humans, guinea pigs, and rats. *Experimental lung research*. **19**, 469-484.
- Slowik A, Ciecko-Michalska I, Bogdal J, Szczudlik A (2001). [The diagnosis of subclinical hepatic encephalopathy]. *Przegląd lekarski*. **58**, 1059-1062.
- Sofroniew MV, Vinters HV (2010). Astrocytes: biology and pathology. *Acta neuropathologica*. **119**, 7-35.
- Song G, Dhodda VK, Blei AT, Dempsey RJ, Rao VL (2002). GeneChip analysis shows altered mRNA expression of transcripts of neurotransmitter and signal transduction pathways in the cerebral cortex of portacaval shunted rats. *Journal of neuroscience research*. **68**, 730-737.
- Spahr L, Bresson-Hadni S, Amann P, Kern I, Golaz O, Frossard JL, Hadengue A (2007). Allopurinol, oxidative stress and intestinal permeability in patients with cirrhosis: an open-label pilot study. *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver*. **27**, 54-60.
- Spahr L, Butterworth RF, Fontaine S, Bui L, Therrien G, Milette PC, Lebrun LH, Zayed J, Leblanc A, Pomier-Layrargues G (1996). Increased blood manganese in cirrhotic patients: relationship to pallidal magnetic resonance signal hyperintensity and neurological symptoms. *Hepatology*. **24**, 1116-1120.
- Spahr L, Vingerhoets F, Lazeyras F, Delavelle J, DuPasquier R, Giostra E, Mentha G, Terrier F, Hadengue A (2000). Magnetic resonance imaging and proton spectroscopic alterations correlate with parkinsonian signs in patients with cirrhosis. *Gastroenterology*. **119**, 774-781.
- Stadtman ER (1992). Protein oxidation and aging. *Science*. **257**, 1220-1224.
- Striz I, Krasna E, Honsova E, Lacha J, Petrickova K, Jaresova M, Lodererova A, Bohmova R, Valhova S, Slavcev A, Vitko S (2005). Interleukin 18 (IL-18) upregulation in acute rejection of kidney allograft. *Immunology letters*. **99**, 30-35.
- Stroop JR (1935). Studies of interference in serial verbal reactions. *Journal of Experimental Psychology*. **18**, 643-662
- Suarez I, Bodega G, Arilla E, Felipe V, Fernandez B (2006). The expression of nNOS, iNOS and nitrotyrosine is increased in the rat cerebral cortex in experimental hepatic encephalopathy. *Neuropathology and applied neurobiology*. **32**, 594-604.
- Suarez I, Bodega G, Rubio M, Felipe V, Fernandez B (2005). Neuronal and inducible nitric oxide synthase expression in the rat cerebellum following portacaval anastomosis. *Brain research*. **1047**, 205-213.
- Sultana R, Butterfield DA (2010). Role of oxidative stress in the progression of Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's disease : JAD*. **19**, 341-353.
- Sultana R, Poon HF, Cai J, Pierce WM, Merchant M, Klein JB, Markesbery WR, Butterfield DA (2006). Identification of nitrated proteins in Alzheimer's disease brain using a redox proteomics approach. *Neurobiology of disease*. **22**, 76-87.

- Suzuki M, Grisham MB, Granger DN (1991). Leukocyte-endothelial cell adhesive interactions: role of xanthine oxidase-derived oxidants. *Journal of leukocyte biology*. **50**, 488-494.
- Szekely CA, Thorne JE, Zandi PP, Ek M, Messias E, Breitner JC, Goodman SN (2004). Nonsteroidal anti-inflammatory drugs for the prevention of Alzheimer's disease: a systematic review. *Neuroepidemiology*. **23**, 159-169.
- Szuster-Ciesielska A, Daniluk J, Kandefer-Szerszen M (2002). Oxidative stress in the blood of patients with alcohol-related liver cirrhosis. *Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research*. **8**, CR419-424.
- Takada A, Nei J, Matsuda Y, Kanayama R (1982). Clinicopathological study of alcoholic fibrosis. *The American journal of gastroenterology*. **77**, 660-666.
- Tateishi N, Higashi T, Shinya S, Naruse A, Sakamoto Y (1974). Studies on the regulation of glutathione level in rat liver. *Journal of biochemistry*. **75**, 93-103.
- Terradez P, Asensi M, Lasso de la Vega MC, Puertes IR, Viña J, Estrela JM (1993). Depletion of tumour glutathione in vivo by buthionine sulphoximine: modulation by the rate of cellular proliferation and inhibition of cancer growth. *The Biochemical journal*. **292 ( Pt 2)**, 477-483.
- Tewes U (1991). HAWIE-R. Hamburg-Wechsler-Intelligenztest für Erwachsene. *Revision, Verlag Hans Huber. Bern-Stuttgart-Toronto*.
- Timmermann L, Butz M, Gross J, Kircheis G, Häussinger D, Schnitzler A (2005). Neural synchronization in hepatic encephalopathy. *Metabolic brain disease*. **20**, 337-346.
- Timmermann L, Gross J, Butz M, Kircheis G, Häussinger D, Schnitzler A (2004). Pathological oscillatory coupling within the human motor system in different tremor syndromes as revealed by magnetoencephalography. *Neurology & clinical neurophysiology : NCN*. **2004**, 26.
- Timmermann L, Gross J, Kircheis G, Häussinger D, Schnitzler A (2002). Cortical origin of mini-asterixis in hepatic encephalopathy. *Neurology*. **58**, 295-298.
- Tolbert NE, Essner E (1981). Microbodies: peroxisomes and glyoxysomes. *The Journal of cell biology*. **91**, 271s-283s.
- Torres LL, Quaglio NB, de Souza GT, Garcia RT, Dati LM, Moreira WL, Loureiro AP, de Souza-Talarico JN, Smid J, Porto CS, Bottino CM, Nitrini R, Barros SB, Camarini R, Marcourakis T (2011). Peripheral oxidative stress biomarkers in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's disease : JAD*. **26**, 59-68.
- Tracey KJ, Fong Y, Hesse DG, Manogue KR, Lee AT, Kuo GC, Lowry SF, Cerami A (1987). Anti-cachectin/TNF monoclonal antibodies prevent septic shock during lethal bacteraemia. *Nature*. **330**, 662-664.
- Trachootham D, Lu W, Ogasawara MA, Nilsa RD, Huang P (2008). Redox regulation of cell survival. *Antioxidants & redox signaling*. **10**, 1343-1374.
- Trimm JL, Salama G, Abramson JJ (1986). Sulfhydryl oxidation induces rapid calcium release from sarcoplasmic reticulum vesicles. *The Journal of biological chemistry*. **261**, 16092-16098.
- Uribe M, Marquez MA, Garcia-Ramos G, Escobedo V, Murillo H, Guevara L, Lisker R (1980). Treatment of chronic portal-systemic encephalopathy with lactose in lactase-deficient patients. *Digestive diseases and sciences*. **25**, 924-928.
- Vaquero J, Polson J, Chung C, Helenowski I, Schiodt FV, Reisch J, Lee WM, Blei AT (2003). Infection and the progression of hepatic encephalopathy in acute liver failure. *Gastroenterology*. **125**, 755-764.

## VIII. Bibliografía

---

- Videla L (2003). Citoquinas, estrés oxidativo y patogénesis. *Medwave*
- Viña J, Hems R, Krebs HA (1978). Maintenance of glutathione content in isolated hepatocytes. *The Biochemical journal*. **170**, 627-630.
- Viña J, Sastre J, Anton V, Bruseghini L, Esteras A, Asensi M (1992). Effect of aging on glutathione metabolism. Protection by antioxidants. *Exs*. **62**, 136-144.
- Viña JR, Palacin M, Puertes IR, Hernandez R, Viña J (1989). Role of the gamma-glutamyl cycle in the regulation of amino acid translocation. *The American journal of physiology*. **257**, E916-922.
- Vladimirov Yu A, Puchkova TV, Putvinsky AV, Parnev OM (1986). Electrical stability of artificial membranes. *General physiology and biophysics*. **5**, 231-242.
- Vonkeman HE, van de Laar MA (2010). Nonsteroidal anti-inflammatory drugs: adverse effects and their prevention. *Seminars in arthritis and rheumatism*. **39**, 294-312.
- Waggiallah H, Alzohairy M (2011). The effect of oxidative stress on human red cells glutathione peroxidase, glutathione reductase level, and prevalence of anemia among diabetics. *North American journal of medical sciences*. **3**, 344-347.
- Wahllander A, Soboll S, Sies H, Linke I, Muller M (1979). Hepatic mitochondrial and cytosolic glutathione content and the subcellular distribution of GSH-S-transferases. *FEBS letters*. **97**, 138-140.
- Warskulat U, Gorg B, Bidmon HJ, Muller HW, Schliess F, Häussinger D (2002). Ammonia-induced heme oxygenase-1 expression in cultured rat astrocytes and rat brain in vivo. *Glia*. **40**, 324-336.
- Wassmann S, Wassmann K, Nickenig G (2006). Regulation of antioxidant and oxidant enzymes in vascular cells and implications for vascular disease. *Current hypertension reports*. **8**, 69-78.
- Weisiger RA, Fridovich I (1973). Mitochondrial superoxide dismutase. Site of synthesis and intramitochondrial localization. *The Journal of biological chemistry*. **248**, 4793-4796.
- Weissenborn K, Bokemeyer M, Krause J, Ennen J, Ahl B (2005a). Neurological and neuropsychiatric syndromes associated with liver disease. *Aids*. **19 Suppl 3**, S93-98.
- Weissenborn K, Ennen JC, Schomerus H, Ruckert N, Hecker H (2001). Neuropsychological characterization of hepatic encephalopathy. *Journal of hepatology*. **34**, 768-773.
- Weissenborn K, Giewekemeyer K, Heidenreich S, Bokemeyer M, Berding G, Ahl B (2005b). Attention, memory, and cognitive function in hepatic encephalopathy. *Metabolic brain disease*. **20**, 359-367.
- Weissenborn K, Heidenreich S, Giewekemeyer K, Ruckert N, Hecker H (2003). Memory function in early hepatic encephalopathy. *Journal of hepatology*. **39**, 320-325.
- Wolff SP, Dean RT (1987). Glucose autoxidation and protein modification. The potential role of 'autoxidative glycosylation' in diabetes. *The Biochemical journal*. **245**, 243-250.
- Wright G, Jalan R (2007). Ammonia and inflammation in the pathogenesis of hepatic encephalopathy: Pandora's box? *Hepatology*. **46**, 291-294.
- Yamamoto Y, Yamashita S, Fujisawa A, Kokura S, Yoshikawa T (1998). Oxidative stress in patients with hepatitis, cirrhosis, and hepatoma evaluated by plasma antioxidants. *Biochemical and biophysical research communications*. **247**, 166-170.
- Ye Y, Perez-Polo JR, Birnbaum Y (2010). Protecting against ischemia-reperfusion injury: antiplatelet drugs, statins, and their potential interactions. *Annals of the New York Academy of Sciences*. **1207**, 76-82.



- Yen CL, Liaw YF (1990). Somatosensory evoked potentials and number connection test in the detection of subclinical hepatic encephalopathy. *Hepato-gastroenterology*. **37**, 332-334.
- Yim MB, Chock PB, Stadtman ER (1990). Copper, zinc superoxide dismutase catalyzes hydroxyl radical production from hydrogen peroxide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **87**, 5006-5010.
- Yokota S, Geppert TD, Lipsky PE (1988). Enhancement of antigen- and mitogen-induced human T lymphocyte proliferation by tumor necrosis factor-alpha. *Journal of immunology*. **140**, 531-536.
- Zimniak P (2011). Relationship of electrophilic stress to aging. *Free radical biology & medicine*. **51**, 1087-1105.