

i21763665



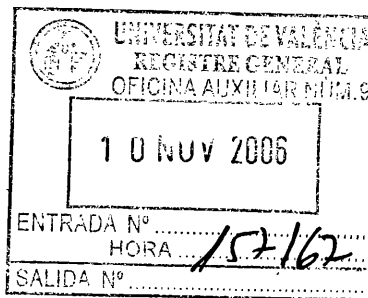
BID T 2058

**UNIVERSIDAD DE VALENCIA  
FACULTAD DE FARMACIA**

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN PRINCIPE FELIPE**



UNIVERSITAT DE VALÈNCIA



***“Alteraciones motoras en  
hiperamonemia y encefalopatía  
hepática: papel de los receptores de  
glutamato”***

***Tesis doctoral***

***Presentada por:  
Omar Cauli***

***Dirigida por:  
Dr. Vicente Felipo Orts***

***Valencia, 2006***

UMI Number: U603038

All rights reserved

INFORMATION TO ALL USERS

The quality of this reproduction is dependent upon the quality of the copy submitted.

In the unlikely event that the author did not send a complete manuscript and there are missing pages, these will be noted. Also, if material had to be removed, a note will indicate the deletion.



UMI U603038

Published by ProQuest LLC 2014. Copyright in the Dissertation held by the Author.  
Microform Edition © ProQuest LLC.

All rights reserved. This work is protected against  
unauthorized copying under Title 17, United States Code.



ProQuest LLC  
789 East Eisenhower Parkway  
P.O. Box 1346  
Ann Arbor, MI 48106-1346





## **AGRADECIMIENTOS**

*La tesis que presento es el resultado del trabajo de muchas personas a las que quiero agradecerse.*

*Gracias al Dr. Felipo por haber confiado en mí cuando le escribí desde Italia para realizar la tesis en su grupo de investigación y por sus numerosos y valiosos consejos.*

*Gracias a mis compañeros de laboratorio que he tenido la suerte de conocer en estos años, en particular quiero destacar los que conozco desde el principio: Slaven, Marta, Virginia, Regina, Carmina, Pili, Blanca, Nisrin, Ana, Rosa, Maribel, Mar, Paqui y Mari Carmen y también a los compañeros incorporados recientemente: Isabel, Jordi, Jesús, Amparo.*

*Gracias a Maria José Agulló por su apoyo y profesionalidad en el cuidado de los animales.*

*Gracias a mi tutor, el Dr. Paco Olucha por su constante disponibilidad.*

*Gracias a mi mujer Isa y a mi familia por haber creído siempre en mis posibilidades.*

*Y por último pero en realidad es lo primero, la tesis va dedicada a mi hijo Alessandro, la luz de mis ojos.*



## ÍNDICE

### I. INTRODUCCIÓN

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1.Hiperamonemia y encefalopatía hepática .....</b>   | <b>3</b>  |
| <b>1.1 Metabolismo y toxicidad del amonio .....</b>   | <b>3</b>  |
| <b>1.2Glutamina .....</b>   | <b>5</b>  |
| <b>1.3 Situaciones clínicas de hiperamonemi.....</b>  | <b>.8</b> |
| <b>1.4 Encefalopatía hepática.....</b>  | <b>11</b> |
| <b>1.5 Hiperamonemia y encefalopatía hepática .....</b>   | <b>17</b> |
| <b>2 Alteraciones neurológicas en encefalopatía hepática.....</b>   | <b>20</b> |
| <b>2.1 Alteraciones cognitivas .....</b>  | <b>20</b> |
| <b>2.2 Alteraciones motoras en encefalopatía hepática .....</b>   | <b>28</b> |
| <b>3. Descripción de algunas alteraciones motoras en pacientes<br/>con encefalopatía hepática.....</b>              | <b>31</b> |
| <b>3.1 Aquinesia.....</b>   | <b>31</b> |
| <b>3.2 Bradiquinesia.....</b>   | <b>32</b> |
| <b>3.3 Asterixis.....</b>   | <b>34</b> |
| <b>3.4 Rigidez .....</b>  | <b>37</b> |
| <b>3.5 Alteraciones de la postura .....</b>   | <b>37</b> |
| <b>3.6 Distonía.....</b>  | <b>38</b> |
| <b>4. Hipótesis sobre los mecanismos de las alteraciones<br/>motoras a nivel de los ganglios basales en EH.....</b> | <b>39</b> |
| <b>4.1. Acumulación de manganeso .....</b>  | <b>40</b> |
| <b>4.2 Alteraciones en los niveles de dopamina y de sus<br/>receptores .....</b>                                    | <b>42</b> |

|  |           |
|--|-----------|
| <b>5 Alteraciones motoras relacionadas con la vía cortico-espinal y con el cerebelo.....</b>                   | <b>42</b> |
| <b>5.1 Vía cortico-espinal.....</b>  | <b>42</b> |
| <b>5.2 Alteraciones motoras de tipo cerebelar .....</b>  | <b>43</b> |
| <b>5.3 Otras alteraciones neurológicas asociadas a alteraciones en los ganglios basales.....</b>               | <b>45</b> |
| <b>6 Alteraciones motoras en modelos animales de encefalopatía hepática.....</b>                               | <b>47</b> |
| <b>6.1 Modelos animales de encefalopatía hepática aguda.....</b>   | <b>47</b> |
| <b>6.2 Modelos animales de encefalopatía hepática crónica ....</b>   | <b>47</b> |
| <b>7 Alteraciones en la neurotransmisión glutamatérgica en enfermedades hepáticas e hiperamonemia .....</b>    | <b>48</b> |
| <b>7.1 Receptores de glutamato.....</b>  | <b>50</b> |
| <b>7.1.1 Receptores ionotrópicos.....</b>  | <b>51</b> |
| <b>7.1.1.1 Receptores NMDA .....</b>   | <b>51</b> |
| <b>7.2 RECEPTORES METABOTRÓPICOS DE GLUTAMATO .....</b>  | <b>53</b> |
| <b>7.2.1 Clasificación y propiedades .....</b>   | <b>53</b> |
| <b>7.2.2 Distribución de los receptores mGlu .....</b>   | <b>57</b> |
| <b>7.2.3 Mecanismos de transducción de señales asociados a los receptores mGlu .....</b>                       | <b>61</b> |
| <b>7.2.3.1 Activación de la fosfolipasa C y liberación de Ca<sup>2+</sup> de almacenes intracelulares.....</b> | <b>61</b> |
| <b>7.2.3.2 Inhibición de la adenilato ciclasa .....</b>  | <b>62</b> |

|   |           |
|---|-----------|
| <b>7.2.3.3. Aumento en la formación de AMPc .....</b>   | <b>63</b> |
| <b>7.2.3.4. Aumento en la formación de GMPc .....</b>   | <b>63</b> |
| <b>7.2.3.5. Activación de la fosfolipasa D .....</b>  | <b>64</b> |
| <b>7.2.3.6. Activación de la fosfolipasa A2 .....</b>   | <b>64</b> |
| <b>7.2.3.7. Regulación de canales de Ca<sup>2+</sup> .....</b>  | <b>65</b> |
| <b>7.2.3.8. Regulación de canales de K<sup>+</sup> .....</b>  | <b>66</b> |
| <b>7.2.3.9. Regulación de la función de receptores ionotrópicos<br/>por los mGluRs .....</b>                        | <b>67</b> |
| <b>7.2.4 Papeles fisiológicos de los receptores mGlu .....</b>  | <b>68</b> |
| <b>7.2.4.1 Modulación de la excitabilidad neuronal .....</b>  | <b>68</b> |
| <b>7.2.4.2 Modulación de la transmisión sináptica .....</b>   | <b>69</b> |
| <b>7.2.4.3 Regulación de la plasticidad sináptica .....</b>   | <b>71</b> |
| <b>8. Receptores metabotrópicos y modulación de la actividad<br/>motora .....</b>                                   | <b>73</b> |
| <b>9. Efecto de la hiperamonemia sobre los receptores<br/>metabotrópicos de glutamato .....</b>                     | <b>75</b> |
| <b>10. Anatomía funcional de los Ganglios Basales .....</b>   | <b>77</b> |
| <b>10.1 Modelo actual de funcionamiento de los Ganglios<br/>Basales .....</b>                                       | <b>78</b> |
| <b>10.2 Las neuronas espinosas medianas como centro<br/>integrador de la información en el estriado .....</b>       | <b>82</b> |
| <b>10.3 La salida de la información de los ganglios basales:<br/>eferencias del complejo GPi/SNr y pálido .....</b> | <b>85</b> |

## **II. OBJETIVOS**

|                        |           |
|------------------------|-----------|
| <b>Objetivos .....</b> | <b>91</b> |
|------------------------|-----------|

## **III. MATERIALES Y METODOS**

|  |            |
|--|------------|
| <b>1. Animales de experimentación .....</b>  | <b>97</b>  |
| <b>2. Modelo de hiperamonemia crónica sin fallo hepático .....</b>   | <b>97</b>  |
| <b>3. Modelo animal de fallo hepático: anastomosis<br/>porta-cava .....</b>  | <b>98</b>  |
| <b>4. Cirugía para colocación de las cánulas y la guía para la<br/>sonda de microdiálisis cerebral in vivo .....</b> | <b>100</b> |
| <b>5. Microdiálisis cerebral <i>in vivo</i> .....</b>  | <b>103</b> |
| <b>6. Compuestos utilizados .....</b>  | <b>105</b> |
| <b>7. Determinación de dopamina, glutamato y GABA .....</b>  | <b>105</b> |
| <b>8. Inmunohistoquímica .....</b>   | <b>108</b> |
| <b>9. “Immunoblotting” .....</b>   | <b>111</b> |
| <b>10. Verificación histológica.....</b>   | <b>113</b> |
| <b>11. Análisis estadístico .....</b>  | <b>114</b> |

## **IV. RESULTADOS**

|   |            |
|---|------------|
| <b>1. La activación de mGluRs en NAcc de ratas con fallo<br/>hepático crónico activa un circuito neuronal diferente que en<br/>las ratas control e induce un mayor aumento de la actividad<br/>motora .....</b> | <b>119</b> |
|---|------------|

|  |            |
|--|------------|
| <b>1.1 Efectos motores inducidos por la inyección de DHPG, agonista de los mGluRs de grupo I, en el NAcc en ratas con fallo hepático crónico (modelo de la anastomosis porta-cava).....</b>            | <b>119</b> |
| <b>1.2 Efectos de la inyección de DHPG sobre la concentración extracelular de dopamina y glutamato en el NAcc .....</b>  | <b>123</b> |
| <b>1.3 La administración de DHPG en el NAcc induce un aumento significativo de la concentración extracelular de GABA en el pálido ventral (VP) en ratas control pero no en las PCS.....</b>            | <b>125</b> |
| <b>1.4 La administración de DHPG en el NAcc induce una disminución significativa de la concentración extracelular de GABA en el tálamo medio-dorsal (MDT) en ratas control pero no en las PCS.....</b> | <b>127</b> |
| <b>1.5 La administración de DHPG en el NAcc induce un aumento de la concentración extracelular de glutamato en la corteza prefrontal (PFCx) tanto en ratas control como en PCS .....</b>               | <b>129</b> |
| <b>1.6 La administración de DHPG en el NAcc induce un aumento de la concentración extracelular de GABA en la corteza prefrontal (PFCx) en las ratas control pero no en las PCS .....</b>               | <b>131</b> |
| <b>1.7 La administración de DHPG en el NAcc induce un aumento significativo de la concentración extracelular de</b>  |            |



|   |            |
|---|------------|
| <b>GABA en la sustancia negra pars reticulata (SNr) en las ratas PCS pero no en las control.....</b>  | <b>134</b> |
| <b>1.8 La administración de DHPG en el NAcc induce una disminución significativa de la concentración extracelular de GABA en el tálamo ventro-medial (VMT) en las ratas PCS pero no en las control.....</b> | <b>136</b> |
| <b>1.9 El aumento de la actividad motora inducido por DHPG en el NAcc en las ratas PCS está mediado por el aumento de glutamato en el NAcc .....</b>  | <b>139</b> |
| <b>1.10 El aumento de GABA extracelular en la SNr inducido por DHPG en las ratas PCS está mediado por el aumento de glutamato en el NAcc .....</b>  | <b>142</b> |
| <b>1.11 El aumento de la expresión de c-Fos confirma la activación diferencial de los dos circuitos neuronales en ratas control y PCS .....</b>   | <b>144</b> |
| <b>2. Papel de la hiperamonemia en las alteraciones motoras inducidas por DHPG en el NAcc.....</b>  | <b>155</b> |
| <b>2.1 Efectos motores inducidos por la inyección de DHPG el NAcc en ratas hiperamonémicas.....</b>   | <b>155</b> |
| <b>2.2 Efectos de la inyección de DHPG sobre la concentración extracelular de dopamina y glutamato en el NAcc .....</b>   | <b>159</b> |
| <b>2.3 La administración de DHPG en el NAcc induce un aumento del GABA extracelular en el pálido ventral (VP) tanto en ratas control como hiperamonémicas.....</b>  | <b>161</b> |

|   |            |
|---|------------|
| <b>2.4 La inyección de DHPG en el NAcc disminuye la concentración extracelular de GABA en el tálamo medio-dorsal tanto en ratas control como hiperamonémicas .....</b>                              | <b>165</b> |
| <b>2.5 La administración de DHPG en el NAcc induce un aumento de glutamato extracelular en la corteza prefrontal (mPFCx) tanto en ratas control como hiperamonémicas ..</b>                         | <b>167</b> |
| <b>2.6 La administración de DHPG en el NAcc induce un aumento de la concentración de GABA extracelular en la corteza prefrontal (PFCx) en las ratas control pero no en las hiperamonémicas.....</b> | <b>169</b> |
| <b>2.7 La administración de DHPG en el NAcc induce un aumento de GABA extracelular en la sustancia negra pars reticulata (SNr) en las ratas hiperamonémicas pero no en las control.....</b>         | <b>171</b> |
| <b>2.8 La administración de DHPG en el NAcc induce una disminución del GABA extracelular en el tálamo ventromedial (VMT) en las ratas hiperamonémicas pero no en las control.....</b>               | <b>174</b> |
| <b>2.9 El aumento de la actividad motora inducido por DHPG en el NAcc en las ratas hiperamonémicas está mediado por el aumento de glutamato en el NAcc .....</b>                                    | <b>176</b> |
| <b>2.10 El aumento de GABA extracelular en la SNr inducido por DHPG en las ratas hiperamonémicas está mediado por el aumento de glutamato en el NAcc .....</b>                                      | <b>179</b> |

|  |            |
|--|------------|
| <b>2.11 El aumento de la expresión de c-Fos confirma la activación de dos circuitos neuronales en ratas hiperamonémicas.....</b> | <b>183</b> |
| <b>3. Papel del glutamato extracelular y de la activación de los mGluRs en SNr en la hipolocomoción en ratas PCS .....</b>       | <b>193</b> |

## **V. DISCUSIÓN**

|  |            |
|--|------------|
| <b>Discusión .....</b>   | <b>219</b> |
| <b>1. La inducción de actividad motora por estimulación de los mGluRs del grupo I en el NAcc es mayor en ratas con fallo hepático que en las ratas control.....</b>                        | <b>225</b> |
| <b>2. La hiperamonemia y el fallo hepático crónicos alteran las respuestas neuroquímicas inducidas por activación de los mGluRs del grupo I en el NAcc .....</b>                           | <b>227</b> |
| <b>3. Los circuitos neuronales activados por la estimulación de los mGluRs en el NAcc son diferentes en ratas control, con fallo hepático o con hiperamonemia sin fallo hepático .....</b> | <b>234</b> |
| <b>4. la hipolocomoción en ratas con fallo hepático crónico es debida al aumento de glutamato y a la activación de mGluR1 en SNr .....</b>   | <b>240</b> |
| <b>5. Posibles implicaciones terapéuticas .....</b>  | <b>246</b> |

**VI. CONCLUSIONES**

**Conclusiones ..... 253**

**VII. REFERENCIAS**



## **ABREVIATURAS**

t-ACPD    Ácido (1*S*,3*R*)-1-Aminociclopentan-1,3-dicarboxílico

AMPA    Ácido  $\alpha$ -Amino-3-hidroxi-5-metil-4-  
isoxazolepropiónico

AMPc    Adenosin 3',5'- monofosfato

CNQX    6-Cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione

CPCCOEt    Ester etílico del ácido 7-  
(Hidroximino)ciclopropa[b]chromen-1a-carboxílico

DA    Dopamina

DAG    Diacilglicerol

DHPG    3,5-Dihidroxifenilglicina

EAAC-11    Transportador neuronal de glutamato

EST    Estradio

GABA    Ácido  $\gamma$ -hidroxi-butírico

GLT-1    Transportador glial de glutamato

GMPc    Guanosin 3',5'- monofosfato

Gpe    Globo pálido segmento externo

Gpi    Globo pálido segmento interno

|       |  |
|-------|--|
| IP3   | Inositol fosfolípidos                  |
| LCA   | Líquido cefaloraquídeo                 |
| LTP   | Potenciación a largo plazo             |
| MDT   | Tálamo medio-dorsal                    |
| mGluR | Receptores metabotrópicos de glutamato |
| mPFCx | Corteza prefrontal medial              |
| NAcc  | Núcleo accumbens                       |
| NMDA  | Ácido N-metil-D-aspartico              |
| PBS   | Solución salina                        |
| PCS   | Anastomosis portacava                  |
| PKC   | Proteína quinasa C                     |
| PLA2  | fosfolipasa A2                         |
| PLC   | fosfolipasa C                          |
| PMC   | Corteza motora primaria                |
| SNc   | Sustancia negra <i>pars compacta</i>   |
| SNr   | Sustancia negra <i>pars reticulata</i> |
| VMT   | Tálamo ventro-medial                   |
| VP    | Globo pálido ventral                   |







# **I. INTRODUCCIÓN**



## **1. Hiperamonemia y encefalopatía hepática**

### **1.1 Metabolismo y toxicidad del amonio**

El amonio tiene un papel fundamental en la homeostasis del nitrógeno y participa en el catabolismo y anabolismo de compuestos importantes para el organismo. Es un producto de la degradación de aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos y otros compuestos, y es el principal producto del metabolismo nitrogenado en todas las células del organismo (Datta et al., 1976; Frisell et al., 1982). Tras las reacciones de desaminación de los aminoácidos, el amonio producido debe ser excretado. Diferentes organismos, lo excretan de diferentes formas, los organismos ureotélicos excretan urea, los uricotélicos ácido úrico y los amoniotélicos amoniaco.

En la especie humana y mamíferos, el amonio es un compuesto muy tóxico que se elimina principalmente en el hígado mediante su incorporación en urea, en el llamado ciclo de la urea. Ésta pasa al torrente sanguíneo y es eliminada en la orina.

El hígado es el único órgano que expresa todos los enzimas del ciclo de la urea. El resto de tejidos no pueden eliminar el amonio incorporándolo en urea. Para prevenir los efectos tóxicos de los niveles altos de amonio, estos tejidos lo incorporan en glutamina. La glutamina permite almacenar el amonio en forma no tóxica de manera temporal, mantenerlo dentro de niveles aceptables y transportarlo hasta el hígado para su eliminación. El proceso de detoxificación del amonio en tejidos no hepáticos es el siguiente: el amonio se une al glutamato mediante una reacción catalizada por la glutamina sintetasa, formando glutamina, que pasa a la corriente sanguínea, desde donde la captura el hígado, que la hidroliza de nuevo en glutamato y amonio por acción de la glutaminasa. Este amonio es entonces incorporado en urea y eliminado en la orina.

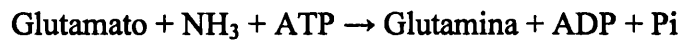
Los niveles de amonio en sangre ( $\approx 100 \mu\text{M}$  en el hombre,  $\approx 150 \mu\text{M}$  en la rata) están estrictamente regulados. Su concentración es el resultado del equilibrio entre su formación y degradación por diferentes sistemas. Además de los del ciclo de la urea, otros

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

## **1.2 Glutamina**

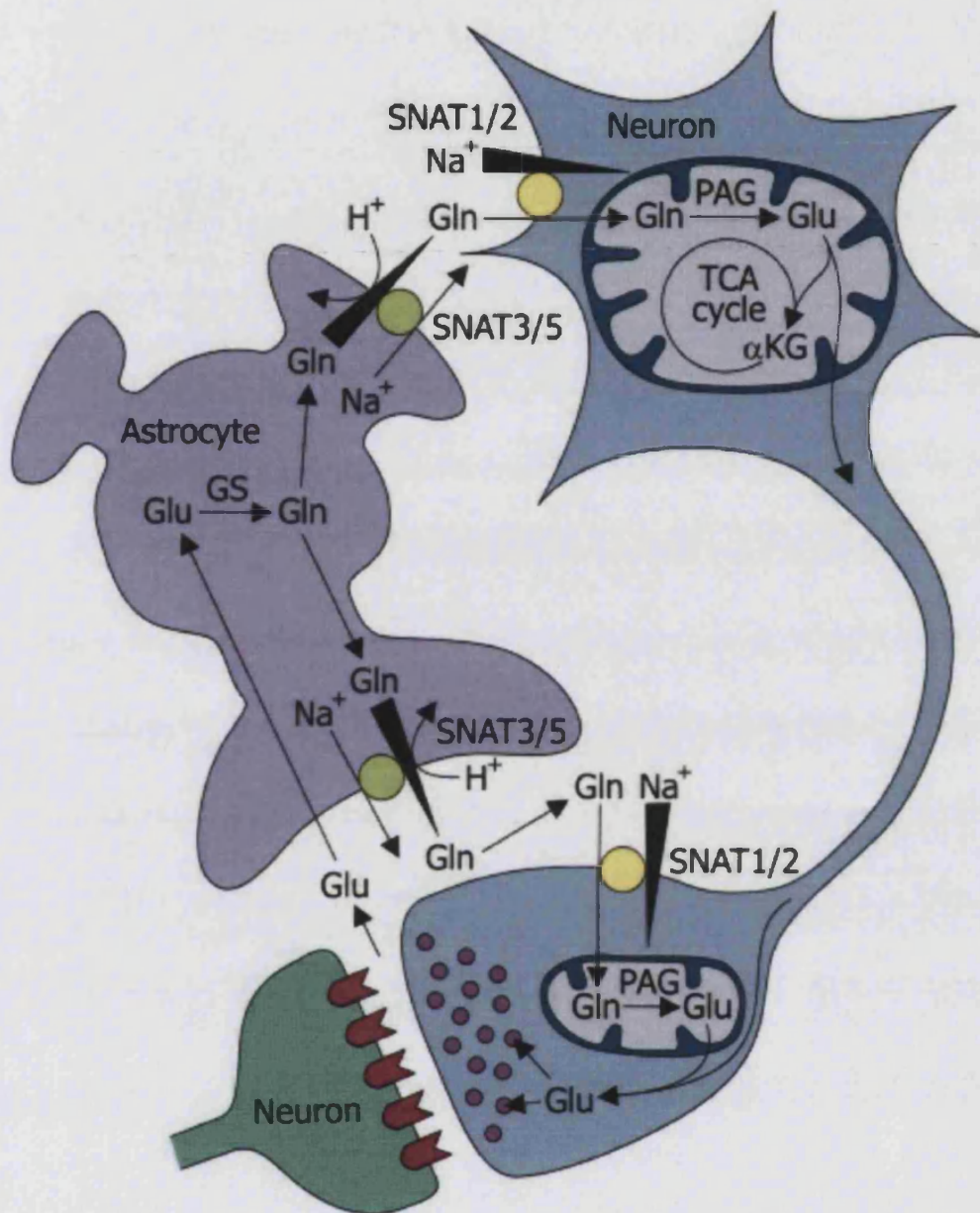
La glutamina sintetasa esta presente en gran cantidad en el hígado y en el cerebro. También se encuentra en músculo esquelético, corazón, riñón y otros órganos y se considera la enzima principal encargada de la eliminación del exceso de amonio fuera del hígado. La glutamina sintetasa tiene un papel muy importante en el sistema nervioso central (SNC) donde se localiza en los astrocitos (Martinez-Hernandez et al., 1977; Norenberg y Martinez-Hernandez, 1979), jugando un papel esencial en el ciclo glutamato-glutamina entre astrocitos y neuronas (Figura 1).

La formación de glutamina por la glutamina sintetasa mediante la incorporación de una molécula de amonio a una de glutamato es el principal mecanismo por el que se detoxifica el amonio en cerebro.



La glutamina es liberada al torrente sanguíneo y sirve como un transportador no tóxico del amonio hasta el hígado (Figura 1).

Por tanto, la incorporación en urea es el mecanismo último de eliminación de la mayor parte del amonio en humanos y otros animales urotélicos. Cuando esta eliminación de amonio no se produce adecuadamente por alguna razón, los niveles de amonio en sangre y tejidos aumentan conduciendo a estados de hiperamonemia.



**Figura 1. Ciclo glutamato-glutamina**

GS: glutamina sintetasa; PAG: glutaminasa; SNAT: transportador de glutamina; Glu: glutamato; Gln: glutamina; TCA: acidos tricarboxilicos; αKG: α-cetoglutarato



### **1.3 Situaciones clínicas de hiperamonemia**

Existen muchas situaciones patológicas que van asociadas a estados de hiperamonemia. La más frecuente es el fallo hepático crónico (cirrosis hepática, hepatitis,...). El fallo hepático agudo es menos frecuente y conduce a niveles muy elevados de hiperamonemia, debidos a la no detoxificación del amonio como consecuencia de la muerte de las células hepáticas.

El fallo hepático crónico puede tener diferentes causas: consumo de alcohol, infección por virus, autoinmune, etc, y conduce a una disminución de la eliminación del amonio en el hígado y a hiperamonemia. En el fallo hepático crónico el principal factor responsable de la hiperamonemia es la deficiente circulación de la sangre a través del hígado, lo que disminuye la metabolización del amonio. La derivación porto-sistémica de la circulación de la sangre ocurre tras una intervención quirúrgica en un paciente con una enfermedad hepática crónica o espontáneamente en pacientes cirróticos debido a la hipertensión portal. La 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.

Otro factor que contribuye a la hiperamonemia en los pacientes con cirrosis hepática es el aumento de la producción de amonio debido al aumento de la glutaminasa intestinal (Romero-Gomez et al, 2004).

La hiperamonemia puede ser también debida a errores congénitos de enzimas del ciclo de la urea como, por ejemplo: en ornitina transcarbamilasa (que es la más frecuente), carbamil fosfato sintetasa, argininasuccinato sintetasa, argininasuccinasa y arginasa. También puede producir hiperamonemia la deficiencia en acetilglutamato sintetasa que no forma parte del ciclo de la urea propiamente dicho pero sintetiza acetilglutamato, un activador esencial para la actividad de la carbamil fosfato sintetasa. En estas situaciones los niveles de amonio en sangre pueden llegar a valores del orden de 1 mM y se pueden producir alteraciones neurológicas severas.

Los niños con errores congénitos del ciclo de la urea parecen normales tras su nacimiento, pero desarrollan rápidamente hiperamonemia y, si ésta no se trata con una terapia adecuada, pueden llegar a morir. Si se tratan adecuadamente pueden sobrevivir, pero la hiperamonemia en el periodo neonatal suele provocar daños en el sistema nervioso central y producir retraso mental, existiendo una correlación inversa entre el coeficiente intelectual (IQ) y la duración y grado de hiperamonemia neonatal (Msall et al, 1984).

También se puede presentar hiperamonemia neonatal en niños con asfixia o con parto prematuro (Ballard et al., 1978; Yoshino et al, 1991).

Otras situaciones que cursan con hiperamonemia son el síndrome de Reye, acidemias orgánicas o deficiencias de carnitina. También se puede producir hiperamonemia como consecuencia de algunos tratamientos terapéuticos como por ejemplo el tratamiento con valproato (antiepiléptico y

antipsicótico), la hemodiálisis o el tratamiento de algunas leucemias.

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

#### **1.4 Encefalopatía hepática**

La encefalopatía hepática (EH) es un síndrome neuropsiquiátrico complejo que refleja una alteración funcional del sistema nervioso central que se presenta en pacientes con enfermedades hepáticas crónicas o agudas. La EH se define como una depresión global de la función del sistema nervioso central subsiguiente a un fallo hepático y que puede progresar en diferentes estadios hasta el coma (Adams y Foley 1953; Gazzard 1986). La EH puede ser reversible o conducir a la muerte. La

patogénesis de la EH todavía no está esclarecida. La causa de la EH se debe más a un fallo en la neurotransmisión que a una disminución del metabolismo energético del SNC.

La EH se clasifica en 3 tipos: A, B y C (Ferenci et al., 2002):

- A) Aguda, suele ocurrir en el marco de un fallo hepático fulminante con necrosis masiva del hígado y una rápida progresión de los síntomas. Entre las causas cabe destacar las hepatitis virales agudas, intoxicación por paracetamol y reacciones idiosincrásicas a fármacos. El grado de mortalidad en la EH aguda (Tipo A) es muy elevado y se debe frecuentemente a un edema cerebral masivo citotóxico y vasogénico.
- B) Crónica, por desviación porto-sistémica sin enfermedad hepatocelular intrínseca. Se han descrito muchos casos entre la población japonesa (Watanabe 2000).
- C) Crónica, asociada a cirrosis hepática y hipertensión portal o desviaciones porto-sistémicas. Es la más frecuente.

Las desviaciones porto-sistémicas pueden ser congénitas o acompañar a enfermedades crónicas del hígado, generalmente cirrosis, con una apreciable desviación de la sangre portal a la circulación sistémica (Encefalopatía Porto-Sistémica, PSE). En este caso, los episodios de encefalopatía se producen como consecuencia de determinados factores desencadenantes (hemorragia digestiva, alta ingesta de proteínas, estreñimiento, infección) y son habitualmente reversibles cuando el factor desencadenante es eliminado.

La desviación porto-sistémica también se realiza en los hospitales para tratar problemas como la hemorragia digestiva secundaria a ruptura de várices esofagogástricas. Esta es una complicación muy frecuente y severa de los pacientes con cirrosis hepática e hipertensión portal. La mortalidad por EH continúa siendo elevada.

La EH es un factor predictivo de mortalidad en los pacientes cirróticos: después de 3 años desde el primer episodio de

encefalopatía la mortalidad está estimada en un 60-80% de los casos.

Las encefalopatías hepáticas de tipo B y C pueden ser clínicamente evidentes (encefalopatía hepática clínica). La encefalopatía hepática clínica a su vez se clasifica en tres formas según el patrón temporal de su manifestación: ocasional, recurrente y persistente. La EH de tipo 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 de tipo recurrente se caracteriza por episodios múltiples de encefalopatía intercalados por periodos en los que la situación neurológica del paciente es aparentemente normal. Se manifiesta en pacientes que tienen tendencia a desarrollar encefalopatía hepática. La forma persistente se caracteriza por alteraciones neuropsiquiátricas evidentes y continuas, aunque de duración

variable en el tiempo y aparece sin una clara causa desencadenante.

Pacientes sin signos evidentes de EH clínica pueden presentar diversos déficits cognitivos (percepción visuo-espacial, atención, concentración) que no son detectables en un examen neurológico rutinario pero se ponen de manifiesto cuando se realizan tests psicométricos o neurofisiológicos adecuados.

Este tipo de EH se ha denominado encefalopatía hepática subclínica o latente, un término que hoy en día ha sido reemplazado por EH mínima (Lockwood et al., 1993; Schomerus y Hamster, 1998; Lockwood, 2000; Ferenci et al., 2002) y disminuye la calidad de vida de los pacientes (Slowik et al., 2001). Se han utilizado diversas baterías de pruebas psicotécnicas para detectar y valorar la EH mínima. Se está intentando llegar a un consenso para utilizar la misma batería de tests en todos los hospitales, habiéndose propuesto como batería de referencia la denominada PHES (psychometric hepatic



encephalopathy score), compuesta por 5 tests (Weissenborn et al., 2001).

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

Los síntomas tempranos de la EH incluyen alteraciones del ciclo sueño-vigilia, función mental enlentecida, apatía, pérdida de apetito y en algunas ocasiones, alteraciones psicológicas como euforia y depresión, letárgia y desorientación intermitente (McCrea et al., 1996; Amodio et al., 1999). Los síntomas pueden progresar conduciendo a somnolencia, pérdida de capacidad para realizar algunas tareas mentales, desorientación, amnesia. En casos mas graves los pacientes pueden entrar en coma, que puede ser reversible o conducir a la muerte (Ferenci, 1991).

## **1.5 Hiperamonemia y encefalopatía hepática**

Existen datos tanto científicos como clínicos que apoyan la idea de que la hiperamonemia juega un papel esencial en el desarrollo de la encefalopatía hepática aguda y crónica:

1. Los factores capaces de desencadenar la EH (ingesta proteica, hemorragia intestinal,...) en los pacientes cirróticos van asociados a aumento de los niveles de amonio.
2. Se producen cuadros clínicos similares a los de la EH también en situaciones de deficiencias congénitas en enzimas del ciclo de la urea, en la que la detoxificación del amonio está disminuida conduciendo a hiperamonemia pero no se producen otras alteraciones asociadas al fallo hepático.
3. Los tratamientos que revierten la EH van dirigidos a reducir los niveles de amonio: reducción de la ingesta proteica, reducción de la absorción del amonio intestinal por acidificación del lumen con disacáridos no

absorbibles (lactulosa, lactosa o lactitol), control con antibióticos de la flora bacteriana intestinal productora de amonio.

4. Existe una buena correlación entre la gravedad de los síntomas neurológicos en los pacientes y la concentración arterial de amonio que presentan (Clemmensen *et al.* 1999)
5. La exposición del cerebro a niveles altos de amonio produce alteraciones neuropatológicas similares a los observados en la encefalopatía hepática:

Tanto en la EH aguda como en la exposición aguda a dosis altas de 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 (Clemmensen *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 y 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.

## **2 Alteraciones neurológicas en encefalopatía hepática**

### **2.1 Alteraciones cognitivas**

En los pacientes con encefalopatía hepática se observa una disminución del consumo metabólico cerebral tanto de oxígeno como de glucosa, reflejando una disminución de la actividad cerebral, que se correlaciona con el grado de deterioro neurológico (Hawkins y Mans, 1994). La disminución del consumo de glucosa y oxígeno en el cerebro se debe, probablemente, a una disminución en la demanda energética ya que hay una actividad neuronal reducida. Se ha comprobado (Lockwood *et al.*, 1997) que en la encefalopatía hepática el deterioro neurológico es anterior a la disminución de los niveles de compuestos con fosfatos ricoenergéticos (ATP, fosfocreatina), lo cual sugiere que la encefalopatía hepática es consecuencia de una disminución de la actividad neuronal por un fallo en la neurotransmisión más que por un fallo primario de energía en el cerebro.

El desarrollo de la EH es consecuencia de la disminución de la eliminación hepática de sustancias tóxicas como el amonio. Esto, unido a un aumento en la permeabilidad de la barrera hematoencefálica a estas sustancias tóxicas conduce a alteraciones en la neurotransmisión cerebral.

Se han descrito alteraciones en los distintos sistemas de neurotransmisión en encefalopatía hepática:

- Sistema GABAérgico (Schafer y Jones, 1982; Baraldi et al., 1984; Butterworth y Giguère, 1986; Maddison et al., 1987; Butterworth et al., 1988; Roy et al., 1988; Ha y Basile, 1996).

- Sistema serotoninérgico (Knell et al., 1974; Jellinger et al., 1978, Gripon et al., 1986; Batshaw y Brusilow, 1977; Bergeron et al., 1989; Lozeva et al., 2004).

- Sistema monoaminérgico (Jellinger et al., 1978; Mans y Hawkins, 1986; Mans et al., 1987; Bergeron et al., 1989; Bergqvist et al., 1995).

- Sistema glutamatérgico (Butterworth, 1992; Hermenegildo et al., 1996; Miñana et al., 1997; Felipo y Butterworth 2002; Monfort et al., 2002).

La encefalopatía hepática crónica se desarrolla lentamente y los síntomas incluyen: cambios en la personalidad, pérdida de atención, alteraciones en los ritmos de sueño-vigilia y en la función y coordinación motoras, disminución de la capacidad intelectual, cambios en el estado conciencia, olvidos, confusión, desorientación, delirio (confusión aguda con un nivel fluctuante del estado de conciencia), cambios en el temperamento, disminución de la agudeza mental, somnolencia durante el día, reducción de la capacidad de autocuidado, deterioro del lenguaje, deterioro de la escritura o pérdida de otros movimientos finos de la mano, letárgia y ataxia progresiva, estupor y en algunos casos coma. Dentro de estos signos y síntomas clínicos cabe destacar que las manifestaciones clínicas de encefalopatía hepática crónica no se manifiestan todas en

todos los pacientes, y que su presencia varía con el curso de la enfermedad hepática y de la encefalopatía.

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.

Las manifestaciones neuropsicológicas clínicas de la EH se pueden clasificar en cuatro grados. En la Tabla 1 se presentan los criterios de West-Haven para la estadificación del estado mental en paciente con EH.

Se ha comprobado que los pacientes cirróticos obtienen peores resultados que individuos controles tanto en pruebas de inteligencia, aprendizaje y memoria, como de percepción motora y espacial (Puca et al., 1989). La etiología de la cirrosis no tiene ninguna influencia sobre los resultados obtenidos en estas pruebas (Rehnstrom et al., 1977).



**Tabla 1. Criterios de West Haven para la estadificación del estado mental en encefalopatía hepática (Conn y Lieberthal, 1979)**

| <b>Gra</b> | <b>Sintomatología</b>  |
|------------|--|
| 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.<br>Cambios obvios de la personalidad.   |
| 3          | Somnolencia a semiestupor, pero con respuesta a estímulos. Confusión. Desorientación importante.   |
| 4          | Coma<br>Sin posibilidad de realizar pruebas de función mental.   |

Uno de los estudios más completos sobre alteraciones en la EH mínima es el realizado por Hamster (1982). Realizó en sujetos

sanos, pacientes con enfermedades hepáticas y pacientes con otras enfermedades (e.g: diabetes) 30 pruebas psicométricas que incluyen evaluación del nivel intelectual, función psicomotora, percepción visual y capacidades visuo-constructivas. Con los resultados obtenidos estableció una batería con los tests en los que los pacientes con enfermedad hepática obtuvieron resultados significativamente peores que los controles o pacientes con otras enfermedades. El objetivo de esta batería es distinguir los pacientes con EH mínima de los sujetos sanos o con otras encefalopatías no hepáticas. Weissenborn et al., (2001) realizaron un estudio similar y ampliaron la lista de los tests incluyendo los de atención. Encontraron que la capacidad de atención está disminuida en los pacientes cirróticos.

Estos estudios son la base de la batería de tests psicométricos que se está usando en práctica clínica para diagnosticar la encefalopatía hepática (PHES, hepatic encephalopathy score).

La escritura también se ve claramente afectada en los pacientes, siendo muchas veces ilegible (Mechtcheriakov et al., 2005). Este

signo se utiliza a veces como índice del progreso del paciente. El habla de algunos de estos pacientes es lenta y monótona (Yang et al., 1998). Los pacientes con EH fallan particularmente en una prueba, establecida para detectar alteraciones psicomotoras, consistente en dibujar una línea (line tracing test) dentro de un “sistema de las calles” de 5 mm de anchura sin cruzar el borde (Schomerus y Hamster, 2001).

Los pacientes también presentan fallos en la realización de pruebas simples que evalúan la memoria visual a corto plazo como reproducir figuras geométricas o de pruebas que evalúan la coordinación motora como construir una estrella con 5 palillos o escribir palabras cortas (Weissenborn et al., 2001).

Las alteraciones en la capacidad de atención, coordinación motora, etc, tienen importantes consecuencias en la vida diaria de los pacientes. Por ejemplo, en la mayoría de los pacientes cirróticos con EH mínima se encontraron alteraciones en la capacidad de conducir vehículos (Schomerus et al., 1981).

En los pacientes la función mental se deteriora lentamente. Al principio de la enfermedad la mayoría de pacientes están bien orientados en el tiempo y el espacio, responden lentamente, tienen dificultad para formular ideas, y sus respuestas son a menudo irrelevantes o carentes de sentido.

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.

Estas alteraciones neurológicas parecen ser consecuencia de alteraciones en la neurotransmisión producidas por sustancias como el amonio que, al no ser adecuadamente detoxificadas en el hígado, alcanzan el cerebro, alterando su función. En el cerebro estas sustancias alteran la función de los sistemas de

neurotransmisión, incluyendo la glutamatérgica, que modula procesos de actividad y coordinación motoras.

## **2.2 Alteraciones motoras en encefalopatía hepática**

En pacientes con encefalopatía hepática crónica se presentan frecuentemente alteraciones en actividad y coordinación motoras (Tabla 2).

En los pacientes con EH se han hallado otras alteraciones motoras no reunidas en la clasificación de West-Haven. Muchas enfermedades inducen trastornos del movimiento (Alarcón y Jiménez-Roldan 2005) que se pueden considerar debidos a alteraciones en uno o mas 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. En los pacientes con EH crónica se han descrito alteraciones y síntomas relacionados con los 3 niveles de organización.

**Tabla 2. Alteraciones neuromusculares en pacientes con encefalopatía hepática (clasificación West-Haven)**

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

<sup>a</sup> *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*

<sup>b</sup> *Temblor de las manos en forma de aleteo*

<sup>c</sup> *ausencia o irregularidad en la coordinación de los movimientos musculares*

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

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

<sup>f</sup> *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, como si aún estuviera mirando hacia delante en la posición inicial.*

Manifestaciones clínicas motoras relacionadas con un malfuncionamiento de los ganglios basales (signos extrapiramidales) se han descrito incluso 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 y Weissenborn 1997; Weissenborn et al., 2005).

### **3. Descripción de algunas alteraciones motoras en pacientes con encefalopatía hepática**

#### **3.1 Aquinesia**

La **aquinesia** es el término utilizado para definir la pobreza del número de actos motores. Es un síntoma muy invalidante presente en un buen porcentaje (mas del 50%) de pacientes cirróticos (Jones and Weissenborn 1997; Jover et al., 2005; Spahr et al., 1996; 2000). Puede afectar a cualquier grupo muscular, siendo muy típico, al menos en las fases iniciales, que afecte más a los movimientos automáticos e involuntarios. Los movimientos voluntarios, intencionales, menos automatizados, están relativamente preservados. La aquinesia afecta con frecuencia 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 inexpresiva y con disminución del parpadeo) (Ferenci et al., 2002).



### **3.2 Bradiquinesia**

La **bradiquinesia** significa 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 (que quizás refleje un tiempo de reacción prolongado), debilidad y fatigabilidad al reiterar los movimientos, enlentecimiento en la realización de las tareas, etc., que afecta a muchos aspectos motores de su vida diaria, tales como vestirse, asearse, comer, realización de 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 (Jones y Weissenborn 1997; Joebges et al., 2003; Spahr et al., 1996). Incluso en pacientes que no muestran alteraciones significativas en la exploración neurológica, pero presentan encefalopatía hepática mínima, es posible observar

bradiquinesia, un signo característico de la enfermedad de Parkinson. Se ha postulado que la bradiquinesia está relacionada con la acumulación de manganeso en los ganglios basales.

Joebges et al., (2003) investigaron las características del movimiento en pacientes con encefalopatía hepática mínima o con grados leves de encefalopatía (grado 1). Para ello grabaron diversos movimientos estandarizados de brazos, dedos o manos, y los sometieron a un análisis por ordenador. Éste es un método frecuentemente utilizado en el estudio del movimiento en diversas enfermedades neurológicas que permite investigar la fisiopatología del trastorno. Se incluyeron 36 cirróticos, 18 controles sanos y 16 sujetos con enfermedad de Parkinson. La principal observación fue que los pacientes con encefalopatía hepática necesitaban mas tiempo para alcanzar la velocidad máxima del movimiento, pero ésta no estaba disminuida. A diferencia de ellos, la bradiquinesia de los sujetos con enfermedad de Parkinson se caracterizaba por una disminución de la velocidad máxima del movimiento. Estos resultados

indican que la bradiquinesia en la encefalopatía hepática mínima o leve es debida a una dificultad en el inicio del movimiento. Este proceso se origina en el área de asociación premotora. Se ha sugerido una disminución del consumo de glucosa en esta área y alteraciones neurofisiológicas consistentes con una disfunción neuronal. Estos hallazgos señalan la región del córtex cingulado como fundamental en la patogenia de la bradiquinesia en encefalopatía hepática mínima.

### **3.3 Asterixis**

El temblor más característico que presentan los pacientes con EH es la **asterixis** llamada también temblor intencional (en inglés “flapping tremor”) (Jones and Weissenborn 1997; Paul et al., 2004; Timmermann et al., 2002; 2003; 2004; Uribe et al., 1980). Más que un temblor, la asterixis es desde el punto de vista neurológico un mioclono negativo (Jones and Weissenborn 1997). Se refiere a sacudidas repentinas e involuntarias de un músculo o grupo de músculos. Los tirones o jalones mioclónicos generalmente son causados por contracciones musculares

repentinas llamadas mioclonos positivos, o por un relajamiento muscular llamado mioclono negativo. Las sacudidas mioclónicas pueden ocurrir solas o en secuencia, siguiendo un patrón o sin ningún patrón. Pueden ocurrir infrecuentemente, o muchas veces por minuto. Los mioclonos ocasionalmente ocurren como respuesta a un evento externo o cuando una persona trata de realizar un movimiento. Las contracciones no pueden ser controladas por la persona que las padece. La asterixis fue ya descrita en un paciente con encefalopatía hepática por Adams y Foley en 1949. La asterixis no es característica solo de la EH y se presenta en diversas encefalopatías incluyendo intoxicaciones exógenas, sepsis, desórdenes electrolíticos, hipoxia, hipercapnica y uremia entre otros. La asterixis es un temblor diferente al temblor presente en los pacientes con enfermedad de Parkinson ya que en estos el temblor se manifiesta principalmente en posición de reposo y desaparece cuando se realiza un movimiento.

Estudios efectuados por Timmermann y cols (2002; 2003) proponen que una posible causa de la asterixis en los pacientes con EH sería una alteración del acomplamiento talamocortical. Para que se produzca una respuesta motora, tanto estimuladora como inhibidora, es necesario que se trasmita una señal a las áreas corticales implicadas en la correcta ejecución del movimiento. Muchas de las señales llegan a la corteza a través del tálamo, que recibe información de los ganglios basales, del cerebelo y de la medula espinal entre otros. En los pacientes con EH las neuronas glutamatérgicas que originan en el tálamo y proyectan a la corteza motora primaria descargan con frecuencias más bajas que en sujetos normales tras la administración de impulsos electromagnéticos (Timmermann et al., 2003). Lesiones unilaterales del tálamo ventro-lateral inducen asterixis unilaterales (Stell et al., 1994). Por otra parte, dado que el talamo ventro-lateral recibe información (vía glutamatergica) desde el cerebelo y que desordenes a nivel cerebelar causan temblores, no se puede excluir que alteraciones

a nivel de las aferencias cerebelares al tálamo contribuyan a la asterixis.

### **3.4 Rigidez**

La **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. Clínicamente, la rigidez tiene un aspecto subjetivo, que el paciente experimenta como sensación de "estar envarado" o de "algo que le comprime los músculos" y le frena su movimiento.

### **3.5 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. En fases poco avanzadas es difícil diferenciarla de la postura que puede considerarse normal en las personas de

edad avanzada. Los reflejos de corrección postural están enlentecidos, con retrasos en las contracciones musculares correctoras del desequilibrio y la consiguiente inestabilidad.

### **3.6 Distonía**

La **distonía** es un deterioro del tono muscular. La distonía se define como un trastorno dominado por contracciones musculares sostenidas, que frecuentemente originan movimientos repetitivos y de torsión, que pueden inducir posturas anómalas de una o más áreas corporales. La distonía es otro síntoma que puede aparecer en un porcentaje pequeño de paciente cirróticos con EH y aparece en grados de EH altos (Cadranel et al., 2001).

#### **4. Hipótesis sobre los mecanismos de las alteraciones motoras a nivel de los ganglios basales en EH.**

Algunas alteraciones motoras en EH podrían ser debidas a alteraciones a nivel de los ganglios basales como indica el hecho de que las alteraciones del flujo sanguíneo a nivel de los ganglios basales se correlacionan bien con la disminución de la capacidad para realizar tareas que implican una cierta agilidad motora (Catafau et al., 2000).

La hiperamonemia crónica debida al fallo hepático parecer ser el factor clave en las alteraciones neurológicas de tipo motor dado que el grado de deficiencias motoras se correlaciona bien con los niveles de amonio en sangre (Balata et al., 2003; Kulisevsky et al., 1992; Nicolao et al., 2003; Ong et al., 2003; Taylor-Robinson et al., 1995). Los mecanismos que conducen a la alteración en la función de los ganglios basales en pacientes con EH no se conocen. Se han propuesto diferentes hipótesis al respecto:



#### **4.1. Acumulación de manganeso**

En los pacientes con problemas extrapiramidales, las imágenes de resonancia magnética cerebral muestran un elevada hiperintensidad de las señales pesadas en T1 en núcleos de los ganglios basales como el globo pálido, el putamen y la sustancia negra (Kulisevsky et al., 1992; Norton et al., 1994; Krieger et al., 1996; Spahr et al., 1996; ; Taylor-Robinson et al., 1996; Maeda et al., 1997; Skehan et al., 1997; Layrargues et al., 1998; Morgan 1998; Rose et al., 1999; Burkhard et al., 2003; Shah et al., 2003 ).

La hiperintensidad en las imágenes pesadas en T1 ha sido atribuida a la deposición de manganeso en las áreas cerebrales hiperintensas (Zeneroli et al., 1991; Hauser et al., 1994; Krieger et al., 1996; Cordoba et al., 2002; Herrero-Hernandez et al., 2002).

El manganeso ya se había propuesto como causante de un síndrome parkinsoniano en 1837, solo 20 años después de que James Parkinson describiera la enfermedad que hoy lleva su

nombre. Desde ese entonces se han descrito problemas psiquiátricos causados por el manganeso ("manganese madness"), que son generalmente seguidos al cabo de unos meses por alteraciones motoras. Estas consisten en distonía, parkinsonismo, retropulsión, y una marcha característica llamada "Cock-walk" que se manifiesta por una marcha sobre los dedos de los pies, con los codos flexionados y la columna vertebral erecta. La intoxicación por manganeso ha sido descrita en mineros, fundidores, trabajadores implicados en la manufactura de pilas secas, por ingestión accidental de permanganato potásico y por utilización de concentraciones incorrectas de manganeso en la nutrición parenteral.

La posible contribución del manganeso a las alteraciones motoras en EH así como el posible origen del manganeso y de su deposición aún no están claramente establecidos.

## **4.2 Alteraciones en los niveles de dopamina y de sus receptores**

Otra hipótesis que se ha considerado sobre las causas de las alteraciones motoras con origen en los ganglios basales es una alteración en la neurotransmisión dopaminérgica. En pacientes y en modelos animales se ha observado una disminución de la concentración de dopamina y de receptores dopaminérgicos de tipo D2 en estas áreas cerebrales (Zeneroli et al., 1981; Baraldi et al., 1983; Mousseau et al., 1993).

## **5. Alteraciones motoras relacionadas con la vía cortico-espinal y con el cerebelo.**

### **5.1 Vía cortico-espinal**

En pacientes cirróticos se han descrito alteraciones de la vía cortico-espinal que muestra hiperintensidad en imágenes de resonancia magnética pesadas en T2 (Nolano et al., 1997; Cordoba et al., 2003). Además esta hiperintensidad en las imágenes de resonancia magnética pesadas en T2 se

correlaciona con un aumento del tiempo necesario para la conducción del impulso nervioso motor desde la corteza motora a los músculos de los dedos de la mano, con un aumento del umbral de estimulación, o sea, un aumento de la intensidad de la estimulación necesaria para obtener una respuesta motora en los dedos de la mano, y una disminución de la amplitud de los potenciales motores evocados que se inducen estimulando la corteza motora.

## **5.2 Alteraciones motoras de tipo cerebelar**

Los pacientes que sobreviven a uno o varios episodios de coma hepático, presentan en ocasiones secuelas neurológicas que incluyen anomalías en funciones motoras reguladas por el cerebelo, como disartria, un desorden neurológico consistente en una inhabilidad en el habla y en articular correctamente las palabras. También pueden presentar ataxia (incoordinación de los movimientos). Estas anomalías se pueden presentar también en ausencia de episodios de coma. A medida que el deterioro neurológico avanza, se reúnen en un síndrome común una

disartria bastante característica, ataxia leve y marcha inestable con ampliación de la base de sustentación (Powell et al., 1990; Tarter et al., 1992; Ueki et al., 2002; Park and Heo, 2004).

Otra alteración neurológica presente en los pacientes con EH atribuible a un mal funcionamiento de los circuitos cerebelares es la **disdiadocoquinesia** que es la inhabilidad para ejecutar movimientos rápidos repetidos como levantar y bajar el brazo (Joebges et al., 2003). Otro síntoma que puede tener origen en un mal funcionamiento del cerebelo es el **nistagmo** que es un movimiento patológico rítmico e involuntario de los ojos (descrito en grado III de EH; Rai et al., 1976). Las oscilaciones pueden ser horizontales, verticales, giratorias o mixtas. El nistagmo más característico consiste en movimientos rítmicos, más rápidos en una dirección que en la contraria.

Otro signo cerebelar que puede manifestarse en los pacientes con EH es la **dismetría** (Mechtcheriakov et al., 2005) que es una apreciación incorrecta de la distancia en los movimientos o actos musculares o de la extensión de los mismos. La dismetría o

hipermetría se traduce en una falta del sentido de la medida en la ejecución de los movimientos, tanto en lo referente al tiempo como al espacio. La dismetría es un síntoma de lesiones cerebelosas, ya que el cerebelo es el órgano que controla la fuerza de un movimiento, ajustando la fuerza, la velocidad y la extensión a la finalidad que se propone dicho movimiento sin excederse en ningún aspecto. La dismetria puede ponerse de manifiesto en la exploración clínica realizando pruebas tales como poner en contacto dedo-nariz, talón-rodilla, o similares. Cuando el movimiento implica desplazamiento de la extremidad en distintos planos, la dismetría se presenta en cada uno de los sentidos produciendo el fenómeno conocido como descomposición del movimiento.

### **5.3 Otras alteraciones neurológicas asociadas a alteraciones en los ganglios basales.**

Jover y cols (2005) demostraron una correlación positiva entre signos extrapiramidales en pacientes con encefalopatía hepática mínima y deterioro cognitivo medido con test neuropsicológicos

que no requieren agilidad manual. Estos datos sugieren que además de las alteraciones motoras, las alteraciones funcionales a nivel de los ganglios basales contribuyen a otras alteraciones neurológicas (cognitivas) que disminuyen la calidad de vida de estos pacientes (Weissenborn y Kolbe 1998; Marchesini et al., 2001). Últimamente se ha hipotetizado que también las alteraciones psiquiátricas presentes en los pacientes con EH como depresión, ansiedad y fatiga crónica pueden ser causadas por alteraciones a nivel de los ganglios basales (Weissenborn y Kolbe 1998).

## **6 Alteraciones motoras en modelos animales de encefalopatía hepática**

### **6.1 Modelos animales de encefalopatía hepática aguda**

En los modelos animales de encefalopatía hepática aguda en roedores se ha observado una disminución de la actividad motora tanto en los modelos en los que el fallo hepático agudo se induce por vía quirúrgica (e.g. isquemia del hígado) (Yano et al., 2005) como por inyección de hepatotoxinas como tioacetamida, galactosamina o azoximetano (Gammal et al., 1990; Steindl et al., 1991; Yurdaydin et al., 1996; Chu et al., 2001; Belanger et al., 2006).

### **6.2 Modelos animales de encefalopatía hepática crónica**

Se ha descrito una disminución de la actividad motora en modelos de encefalopatía hepática crónica como el de anastomosis porta-cava (Bengtsson et al., 1986; Martin 1986; Bergqvist et al., 1995; Steindl et al., 1996; Theander et al., 1996; Sergeeva et al., 2005) o en ratas cirróticas por ligadura del conducto biliar (Chan et al., 2004; Jover et al., 2006). Además



se ha demostrado que la hiperamonemia potencia las alteraciones motoras presentes en las ratas cirróticas por ligadura del conducto biliar (Jover et al., 2006) sugiriendo que la hiperamonemia contribuye al enlentecimiento motor presente tras el fallo hepático crónico.

## **7 Alteraciones en la neurotransmisión glutamatérgica en enfermedades hepáticas e hiperamonemia**

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

neurotransmisores más relevante durante la formación y el desarrollo del SNC, estando involucrado en procesos fisiológicos tan diversos como la proliferación, maduración y supervivencia neuronal, la migración neuronal, la formación, remodelación y eliminación de sinapsis, y el establecimiento y refinamiento de las conexiones neuronales.

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

El glutamato se forma en las terminales nerviosas principalmente por desaminación de la glutamina por acción de la glutaminasa localizada en mitocondrias. El glutamato se transporta y se almacena en las vesículas presinápticas. Una vez

liberado en el espacio sináptico el glutamato puede activar distintos tipos de receptores.

### **7.1 Receptores de glutamato**

Las acciones fisiológicas del glutamato están mediadas por la activación de dos tipos de receptores: ionotrópicos y metabotrópicos.

En general los receptores ionotrópicos de glutamato (iGlu) están involucrados en la neurotransmisión rápida en el cerebro. Los receptores iGlu forman un canal catiónico que permite el paso selectivo de iones sodio ( $\text{Na}^+$ ), potasio ( $\text{K}^+$ ) o, en el caso de los receptores NMDA y algunos subtipos de los AMPA, calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ), produciendo una despolarización de la neurona.

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

### **7.1.1 Receptores ionotrópicos**

Los receptores ionotrópicos son canales iónicos regulados por ligando. La unión del neurotransmisor al receptor provoca la apertura del canal con el consiguiente paso de iones. Los receptores ionotrópicos de glutamato se clasifican en 3 tipos según la afinidad que presentan para unir distintos agonistas: NMDA (N-metil-D-aspartato), AMPA (ácido  $\alpha$ -Amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropionico) y kainato (ácido kainico).

#### *7.1.1.1 Receptores NMDA.*

Su activación produce la apertura de canales iónicos que permiten la entrada en la neurona post-sináptica de  $\text{Ca}^{++}$  y  $\text{Na}^+$  y la salida de iones  $\text{K}^+$ . Para su activación no sólo se requiere la unión de glutamato al receptor sino también la unión de glicina, que actúa como co-agonista (Mayer et al., 1984 ; Nowak et al., 1984 ; Johnson y Ascher, 1987; Greenamyre y Porter, 1994). En condiciones normales el canal del receptor NMDA, está bloqueado por  $\text{Mg}^{2+}$ . Es necesaria la despolarización para

eliminar el bloqueo por  $Mg^{2+}$  dependiente de voltaje y que así el canal iónico del receptor NMDA permita en presencia del ligando el paso de  $Ca^{2+}$ .

El receptor NMDA está implicado en procesos de aprendizaje y en el almacenamiento de información a largo plazo. Sin embargo, su activación patológica, por ejemplo por liberación excesiva de glutamato, produce brotes epilépticos (fenómeno "Kindling") y puede conducir a la degeneración y la muerte neuronal (Choi, 1988), jugando un importante papel en el daño neuronal que se produce en la isquemia cerebral.

La inhibición, bloqueo o hipofuncionalidad del receptor NMDA puede conducir a síntomas psicóticos y se presume que tiene una importante participación en el mecanismo patológico de la esquizofrenia (Owens y Risch, 1995).

## **7.2 RECEPTORES METABOTRÓPICOS DE GLUTAMATO**

### ***7.2.1 Clasificación y propiedades***

La familia de los receptores mGlu está constituida por ocho subtipos (mGluR 1-8) que se clasifican en tres grandes grupos atendiendo a la homología de su secuencia de aminoácidos, a los mecanismos de transducción de señales asociados y a sus propiedades farmacológicas (Tabla 3). Algunos subtipos de mGluR pueden presentar más de una isoforma.

El grupo I está constituido por mGluR 1 y mGluR 5. Su activación activa la fosfolipasa C y estimula la hidrólisis de fosfolípidos y la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelulares. Son activados selectivamente por (S)-3,5-dihidroxifenilglicina (S-3,5- DHPG).

El grupo II está constituido por mGluR 2 y mGluR 3 que modulan la formación de AMPc, disminuyéndola. Los mGluRs de grupo II son activados selectivamente por (2S,1'S,2'S)-2-(Carboxycyclopropyl) glycine (L-CCG-I).

El grupo III está constituido por los mGluR 4 ,6 ,7 y 8. La activación de estos receptores también inhibe la formación de AMPc y son activados selectivamente por L-(+)-2-amino-4-fosfobutirato (L-AP4).

**Tabla 3. Clasificación de los mGluRs**

| Grupo | Subtipo | Isoforma      | Mecanismo de transducción   | Agonistas selectivos   |
|-------|---------|---------------|---|--|
| I     | mGlu1   | a, b, c, d, e | Gq ↑ PLC ↓ CCDV<br>↑ Ca <sup>2+</sup> ↑ LCCDV<br>↓ K <sup>+</sup> | Quis > ABHxD-I ><br>3,5-DHPG > DHPmP ><br>1S,1R-ACPD         |
|       | mGlu5   | a, b          |   |  |
| II    | mGlu2   |               | Gi/o ↓ AD<br>↓ CCDV<br>↑ K <sup>+</sup>                           | LY379268 = LY389795<br>> LY-354740 ><br>L-F2CCG-I > S-4MeGlu |
|       | mGlu3   |               |   |  |
| III   | mGlu4   | a, b          | Gi/o ↓ AD<br>↓ CCDV<br>↑ K <sup>+</sup>                           | L-AP4 > L-SOP<br>L-CCG-I > 1S,3S-ACPD<br>> 1S,3R-ACPD        |
|       | mGlu6   |               |   |  |
|       | mGlu7   | a, b          |   |  |
|       | mGlu8   | a, b          |   |  |

PLC: fosfolipasa C; CCDV: canales de calcio dependientes del voltaje; L-CCDV: canales de calcio dependiente de voltaje de tipo L; AD: adenilato ciclase; Quis: ácido quisqualico; ABHxD-I: ácido (1S,2S,4S,5S)-2-Aminobiciclo[2.1.1]hexeno-2,5-dicarboxílico; 3-5-DHPG: 3- dihydro-fenilglicina; DHPmP: ácido (RS)-amino(3,5-dihydroxifenil)metilfosfinico; LY379268:

ácido (-)-2-oxa-4-aminobicyclohexan-4,6-dicarboxílico;  
LY389795: ácido (-)-2-tio-4-aminobicyclo[3.1.0]-hexan-4,6-  
dicarboxílico; LY354740: ácido (+)-2-  
aminobicyclo[3.1.0]hexan-2,6dicarboxílico; L-F2CCG-I:  
2S,1'S,2'S)-2-(2-carboxy-3,3-difluorociclopropil)glicina; S-  
4MeGlu: ácido S-4 metil-glutamico; L-AP4: ácido L(+)-2-  
Amino-4-fosfonobutírico; L-SOP: L-serina-O-fosfato; L-CCG-  
I: 2S,1'S,2'S)-2-(Carboxiciclopropil)glicina; ACPD: ácido 1-  
aminociclopentan-1,3-dicarboxílico.

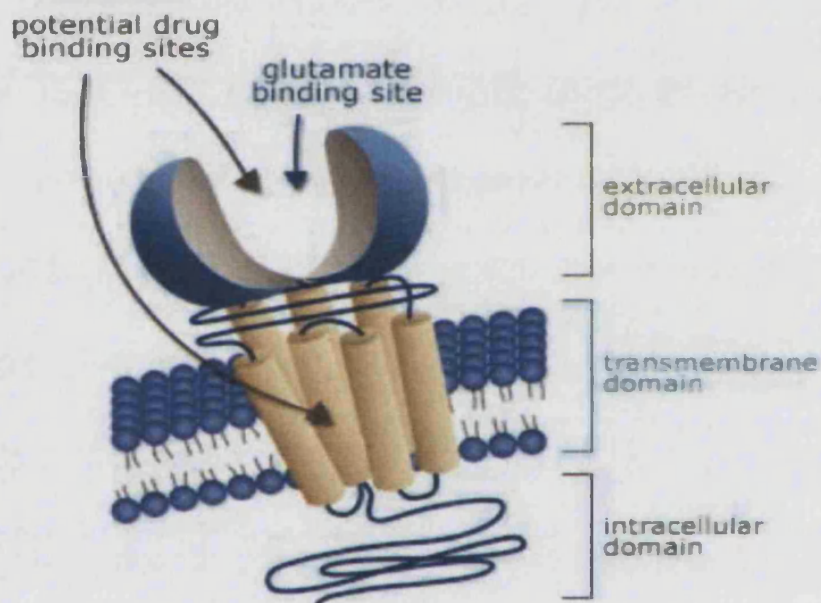
Los receptores mGlu de un mismo grupo comparten una homología de secuencia de aminoácidos de alrededor del 60-70%, mientras que se reduce a un 40-45% cuando se comparan miembros de diferentes grupos.

Desde el punto de vista molecular, los receptores mGlu son proteínas integrales de membrana formadas por una única cadena polipeptídica. Estos receptores presentan un gran extremo aminoterminal que se extiende en el espacio extracelular, una porción central constituida por siete segmentos transmembrana con estructura  $\alpha$ -helicoidal unidos por tres bucles intracelulares y tres extracelulares, y un extremo carboxiterminal localizado intracelularmente. Los residuos



aminoacídicos del segundo y tercer bucle intracelular constituyen la región más importante para la activación y el acoplamiento del receptor a la proteína G (Fig. 2).

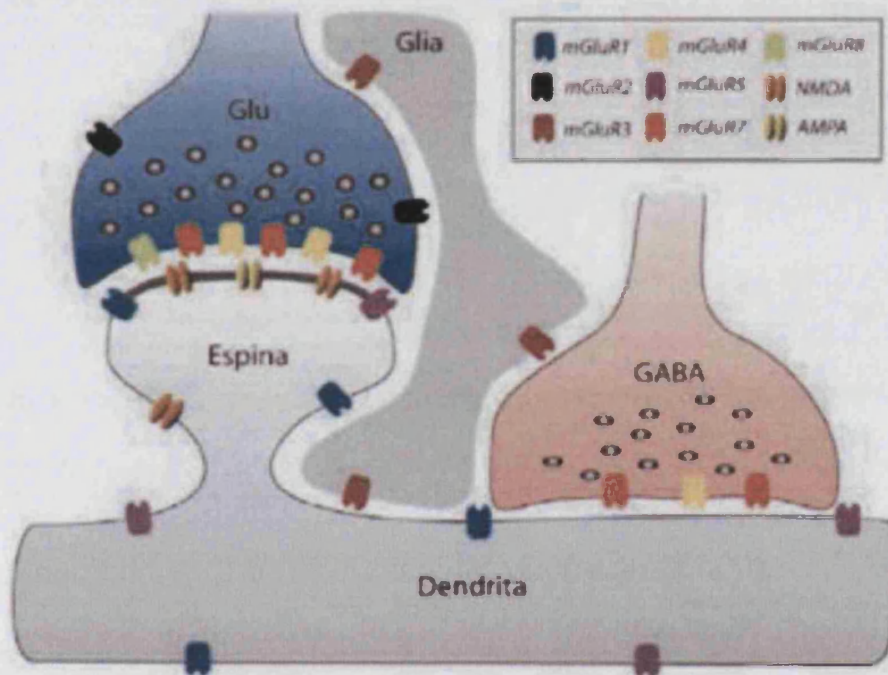
**Figura 2. Estructura de los mGluRs**



Por su parte, los residuos del extremo carboxiloterminales están implicados en la desensibilización inducida por la proteína quinasa C (PKC) y en la interacción con proteínas intracelulares como la calmodulina, Homer o proteínas con dominios PDZ.

### 7.2.2 Distribución de los receptores mGlu

Los estudios de hibridación *in situ* e inmunohistoquímica revelan que los receptores mGlu se encuentran ampliamente distribuidos en el SNC (Testa et al., 1994). Sin embargo, los patrones de expresión y localización de los distintos subtipos son bastante diferentes (Fig. 3).



**Figura 3 Localización de los receptores mGlu en una teórica sinapsis glutamatergica.**

Los receptores del grupo I (mGlu1 y mGlu5) se localizan a nivel postsináptico, preferentemente en los bordes de la densidad postsináptica. Los receptores del grupo II (mGlu2 y mGlu3) se localizan tanto a nivel presináptico como postsináptico, mientras

que los del grupo III (mGlu4, mGlu7 y mGlu8) se localizan a nivel presináptico. Sin embargo, mientras mGlu4, mGlu7 y mGlu8 se localizan en la zona activa del terminal presináptico, mGlu2 y mGlu3 lo hacen fuera del lugar de liberación del neurotransmisor. mGlu3 se localiza también en células gliales. Los receptores ionotrópicos se localizan principalmente lo largo de la densidad postsináptica.

Los receptores mGlu del grupo I (mGluR 1 y mGluR 5) se localizan mayoritariamente a nivel postsináptico en cuerpos celulares, troncos dendríticos y espinas dendríticas (Testa et al., 1994; 1998) aunque se han descrito también mGluRs a nivel presináptico en el estriado de primates (Paquet y Smith, 2003). Su rasgo más característico es que se localizan fuera de la densidad postsináptica de las sinapsis glutamatérgicas (Testa et al., 1994), a diferencia de la distribución mayoritariamente sináptica de los receptores ionotrópicos (Fig. 3). Concretamente los mGluR 1 y 5 se concentran en los bordes de las sinapsis glutamatérgicas, la denominada localización perisináptica, así como en la membrana extrasináptica de espinas dendríticas (Lujan et al., 1996) (Fig. 3). Evidencias bioquímicas y electrofisiológicas también sugieren que algún subtipo de este

grupo podría localizarse presinápticamente (Cartmell y Schoepp 2000). Los mGluRs 5 pero no los mGluRs 1 se encuentran también en células gliales.

Los receptores mGlu del grupo II se localizan tanto a nivel postsináptico como presináptico, dependiendo de la región cerebral (Lujan et al., 1997) (Fig. 3). Así, en regiones como el hipocampo, mGluR 2 se localiza mayoritariamente a nivel presináptico, mientras que en el cerebelo se localiza tanto a nivel presináptico como postsináptico. En su localización postsináptica, parece que mGluR 2 no se asocia directamente con sinapsis glutamatérgicas, sino que se distribuye aleatoriamente por la membrana plasmática de los troncos dendríticos (Lujan et al., 1997). Por el contrario, mGluR 3 parece asociarse con sinapsis glutamatérgicas (Tamaru et al., 2001). En su localización presináptica, mGluR 2 y mGluR 3 se localizan en la membrana plasmática de la terminación nerviosa, pero no se encuentran en el lugar donde se produce la liberación del neurotransmisor (Shigemoto et al., 1997; Tamaru et al.,

2001) (Fig. 3). Además de su localización neuronal, se ha demostrado la presencia de mGluR 3 en células gliales (Tamaru et al., 2001).

Los receptores mGlu del grupo III se localizan fundamentalmente a nivel presináptico (Shigemoto et al., 1997) (Fig. 3). Los subtipos mGluR 7 y mGluR 8 se distribuyen por todo el SNC, mientras que mGluR 6 se localiza únicamente a nivel postsináptico en las células bipolares de la retina. Estos receptores se localizan mayoritariamente en la especialización presináptica de los terminales axónicos, y en muy baja proporción en la membrana plasmática de la terminación nerviosa (Fig. 3). Aunque en la mayoría de las áreas cerebrales mGluR 7 es principalmente presináptico, en la retina parece localizarse tanto presináptica como postsinápticamente (Brandstatter et al., 1996). También se ha descrito la localización de mGluR 4, mGluR 7 y mGluR 8 en la zona presináptica de los terminales axónicos que establecen sinapsis GABAérgicas (Dalezios et al., 2002; Somogyi et al., 2003).

### **7.2.3 Mecanismos de transducción de señales asociados a los receptores mGlu**

Los receptores mGlu presentan una amplia variedad de mecanismos de transducción de señales que a continuación resumimos.

#### ***7.2.3.1 Activación de la fosfolipasa C y liberación de $Ca^{2+}$ de almacenes intracelulares***

Los receptores mGlu del grupo I activan, a través de una proteína G tipo G q/11, la fosfolipasa C (PLC). Esta enzima hidroliza inositol fosfolípidos dando lugar a la formación de los segundos mensajeros diacilglicerol e inositol trisfosfato (IP 3) (Masu et al., 1991; Pin y Duvoisin 1995). El IP3, mediante su unión a receptores específicos localizados en el retículo endoplasmático, estimula la liberación de  $Ca^{2+}$  de dicho compartimento al citosol. El diacilglicerol, junto con el  $Ca^{2+}$  liberado, activa la proteína quinasa C (PKC), que a su vez

fosforila diferentes proteínas, y continua la transmisión de la señal (Masu et al., 1991; Pin y Duvoisin 1995).

Existen evidencias que indican que los agonistas del grupo II también aumentan la actividad de la PLC y, de este modo, la concentración de  $Ca^{2+}$  en citosol (mediante la estimulación de los receptores IP 3) y la activación de la PKC. La PLC parece estar activada, en este caso, por la subunidad  $\beta\gamma$  de las proteínas G tipo G o/i.

#### *7.2.3.2 Inhibición de la adenilato ciclasa*

La activación de los receptores mGlu del grupo II y III inhibe la adenilato ciclasa (AC), reduciendo la formación de AMPc estimulada con forskolina (Prezeau et al., 1992; 1994; Schoepp et al., 1995). La inhibición producida por los receptores mGlu del grupo II es superior a la de los receptores del grupo III y se previene en presencia de toxina pertúsica, lo que sugiere que la proteína G involucrada es de tipo Gi.

#### *7.2.3.3. Aumento en la formación de AMPc*

Los receptores mGlu del grupo I y II pueden también activar la adenilato ciclasa, a través de proteínas tipo Gs (Winder et al., 1993). Asimismo, pueden potenciar la formación de AMPc en respuesta a activación de receptores de adenosina, adrenérgicos, VIP y prostaglandinas E<sub>2</sub>, asociados también a proteínas tipo Gs (Winder et al., 1993). El AMPc activa la proteína quinasa A (PKA), la cual fosforila proteínas intracelulares (Masu et al., 1991) por tanto los mGluRs que modulan los niveles de AMPc pueden modular la actividad de la PKA y la fosforilación de sus sustratos.

#### *7.2.3.4. Aumento en la formación de GMPc*

La activación de los receptores mGlu de grupo I y II produce un aumento en los niveles de GMPc en cortes de cerebelo, respuesta que puede bloquearse mediante inhibidores de la enzima óxido nítrico sintasa (NOS). Esto sugiere que la activación de los mGluRs de grupo I y II conduce a una activación de la NOS, que aumenta la formación de óxido



nítrico que, a su vez, activa la guanilato ciclasa soluble, que forma GMPc (Okada 1992).

#### *7.2.3.5. Activación de la fosfolipasa D*

Se ha descrito que la activación de receptores mGlu conduce a la activación de la fosfolipasa D (PLD) en cortes de hipocampo. El perfil farmacológico de este receptor asociado a PLD indica que se trata de un nuevo miembro no clonado hasta la fecha (Holler et al., 1993).

#### *7.2.3.6. Activación de la fosfolipasa A 2*

La activación de los receptores mGlu del grupo I puede potenciar la actividad de la fosfolipasa A (PLA<sub>2</sub>), dando lugar a un aumento de los niveles de ácido araquidónico en cultivos de neuronas y células gliales corticales (Kim et al., 1995). Se ha sugerido que esta respuesta podría cumplir un importante papel en la comunicación glía-neurona mediante la inhibición de la actividad de los transportadores de glutamato astrocitarios.

#### *7.2.3.7. Regulación de canales de Ca<sup>2+</sup>*

Diversos tipos de canales de Ca<sup>2+</sup>, concretamente los tipos N, L, R y P/Q, se inhiben o se activan tras la activación de receptores mGlu (Masu et al., 1991; Pin and Duvoisin 1995). Esta regulación depende del tipo de receptor, del tipo celular en el que se expresan y del tipo de canal de Ca<sup>2+</sup> (Millan et al., 2002). Así por ejemplo, la activación de mGluRs conduce a la inhibición de las corrientes de Ca<sup>2+</sup> tipo N en neuronas. En la corteza cerebral esta inhibición parece estar mediada por receptores mGlu del grupo I y II. En cultivo de células granulares de cerebelo parece estarlo por los mGluRs del grupo I y III, y en el bulbo olfatorio por los mGluRs del grupo III (Masu et al., 1991; Pin and Duvoisin 1995). Finalmente, la activación de los receptores mGlu del grupo III conduce a la inhibición de canales de Ca<sup>2+</sup> tipo P/Q, mientras que los canales de Ca<sup>2+</sup> tipo L se inhiben por la activación de mGluRs de grupos I, II o III. La regulación de los canales de Ca<sup>2+</sup> por mGluRs puede llevarse a cabo mediante la producción de

segundos mensajeros o bien mediante una interacción directa entre la subunidad beta de la proteína G y el canal de  $\text{Ca}^{2+}$ .

#### 7.2.3.8. *Regulación de canales de $\text{K}^+$*

La activación de los receptores mGlu puede inhibir o potenciar diversas corrientes de  $\text{K}^+$ , como las corrientes lentas post-hiperpolarizantes de  $\text{K}^+$  dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$  (IAHP), la corriente inactivante lenta de  $\text{K}^+$  dependiente de voltaje (IM), la corriente de potasio saliente (IK), las corrientes producidas por la familia GIRK de canales rectificadores entrantes y las corrientes lentas de  $\text{K}^+$  independiente y dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  (Masu et al., 1991; Pin and Duvoisin 1995). En cuanto a los mecanismos moleculares de regulación, las evidencias indican que la PKA, la PKC y la tirosin quinasa participan en la inhibición de la IAHP, que parece estar mediada por los receptores del grupo I. La inhibición de los canales GIRK se lleva a cabo por interacción directa entre la subunidad beta de la proteína G y el canal de  $\text{K}^+$ .

#### *7.2.3.9. Regulación de la función de receptores ionotrópicos por los mGluRs.*

Los principales receptores ionotrópicos implicados en la transmisión sináptica rápida, los receptores AMPA, NMDA o GABA-A, pueden ser regulados por los receptores mGlu. Así, la activación de los receptores mGlu del grupo I inhibe las corrientes mediadas por los receptores GABA-A y potencia las respuestas mediadas por AMPA en el núcleo del tracto solitario (Glaum and Miller 1992), y las corrientes mediadas por AMPA y NMDA en la médula espinal (Bleakman et al., 1992). La activación de mGluRs puede potenciar o reducir las respuestas a la activación de receptores NMDA dependiendo del área cerebral y de la composición de subunidades del receptor NMDA (Colwell and Levine 1994; Nicoletti et al., 1999; Guo et al., 2004). Por tanto, el efecto regulador por los mGluRs de los receptores ionotrópicos varía según la población neuronal y parece desempeñar un importante papel en la modulación de la

transmisión excitadora e inhibidora en diferentes regiones del SNC.

#### ***7.2.4 Papeles fisiológicos de los receptores mGlu***

La activación de los receptores mGlu induce una amplia variedad de cambios en la fisiología neuronal. Algunos de ellos se resumen a continuación.

##### ***7.2.4.1 Modulación de la excitabilidad neuronal***

Los mGlu del grupo I parecen participar en la modulación de la excitabilidad neuronal en varias áreas del SNC (Bordi y Ugolini 1999; Pin y Duvoisin 1995) a través de la modulación de la actividad de diversos canales iónicos (ver apartados 7.2.3.7, 8 y 9). Esta modulación por mGluRs puede dar como resultado una despolarización de la membrana, un incremento de la resistencia o una reducción en la frecuencia de disparo. Los mGluRs pueden producir sobre las membranas neuronales tanto efectos excitadores como inhibidores (Bordi and Ugolini 1999; Pin and Duvoisin 1995). Se han observado efectos hiperpolarizantes de los mGluRs en las células de Purkinje del cerebelo, que son

mediados por la modulación de canales de  $K^+$  dependientes de  $Ca^{2+}$  (Batchelor y Garthwaite 1993). Aunque se desconoce el papel fisiológico, cabría pensar que dicho efecto podría prevenir un exceso de excitación por parte de las células de Purkinje, lo que las protegería frente a la excitotoxicidad.

#### *7.2.4.2 Modulación de la transmisión sináptica*

Uno de los efectos fisiológicos mejor caracterizados de los agonistas de los receptores mGlu es la modulación de la neurotransmisión en las sinapsis glutamatérgicas (Gereau y Conn 1995). Este efecto está mediado por receptores mGlu presinápticos que actúan como autorreceptores y disminuyen la liberación de glutamato. Los receptores que participan en este proceso son los del grupo II y III, mientras que la participación del grupo I sólo se ha podido observar en el hipocampo. Parece que la activación de los receptores mGlu reduce la liberación de glutamato de los terminales presinápticos porque induce una inhibición de los canales de  $Ca^{2+}$  dependientes de voltaje. Los

receptores mGlu del grupo I pueden tanto facilitar como inhibir la liberación de glutamato (Rodríguez-Moreno et al., 1998).

En hipocampo la estimulación de los mGluRs de grupo I, activa la fosfolipasa C que hidroliza inositol fosfolípidos de membrana y forma diacilglicerol (DAG) e inositol trifosfato (IP3). El aumento de IP3 conduce a un aumento de  $Ca^{2+}$  intracelular y, como consecuencia, de la liberación de glutamato. El DAG por su parte activa la proteína quinasa C (PKC) que fosforila los mGluRs, desensibilizándolos. Cuando los mGluRs de grupo I en el estado fosforilado son estimulados por agonistas activan vías de transducción de señales diferentes que conducen a la inhibición de la liberación de glutamato (Rodríguez-Moreno et al., 1998).

En ciertas condiciones, la activación de los receptores mGlu del grupo II también puede aumentar la liberación de glutamato (Rodríguez-Moreno et al., 1998). Por ejemplo, en presencia de ácido araquidónico aumenta la liberación de glutamato inducida por L-AP4 en sinaptosomas (Herrero et al., 1992).

Los receptores mGlu presinápticos también reducen la liberación de GABA y la transmisión sináptica inhibitora en varias regiones del SNC (Gereau y Conn 1995). Los mGluRs del grupo I inhiben la liberación de GABA en el hipocampo, mientras que los del grupo II y III lo hacen en todo el SNC.

Además de regular la liberación de glutamato y GABA, los receptores mGlu pueden regular la transmisión excitadora e inhibitora modulando la función de receptores ionotrópicos de glutamato y GABA (ver apartado 7.3.2.9). A diferencia de la regulación en la liberación de neurotransmisores, la modulación de receptores ionotrópicos permite a los receptores mGlu ejercer un control selectivo de componentes específicos de la transmisión sináptica.

#### *7.2.4.3 Regulación de la plasticidad sináptica*

La potenciación a largo plazo (LTP) y la depresión a largo plazo (LTD), dos formas de plasticidad sináptica, son cambios persistentes en la eficacia sináptica, considerados modelos de mecanismos subyacentes en los procesos de aprendizaje y



memoria. La LTP se ha estudiado extensamente en el hipocampo, donde su inducción requiere la coactivación de los receptores NMDA y mGlu del grupo I (Bashir et al., 1993; Pin and Duvoisin 1995). En este caso, la activación de los receptores mGlu modula las respuestas mediadas por los receptores NMDA, potencia la respuesta de los receptores AMPA y reorganiza su localización en la sinapsis (Masu et al., 1993). Por su parte, la LTD se ha estudiado ampliamente en el cerebelo. Se produce tras la activación de los receptores mGlu del grupo I y la estimulación de las fibras trepadoras, y requiere la activación de la PKC, la liberación de  $Ca^{2+}$  de almacenes intracelulares y la activación de la vía del óxido nítrico/ GMPc (Aiba et al., 1994; Conquet et al., 1994).

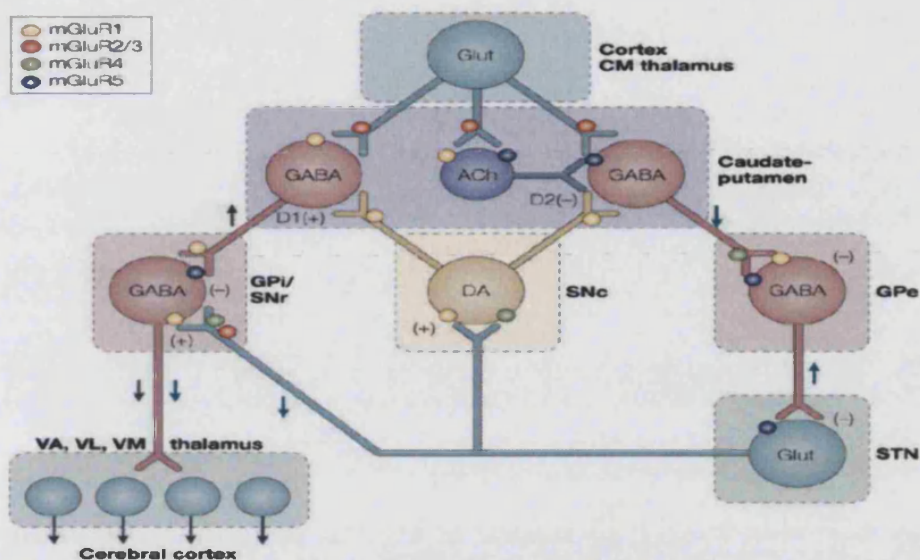
## **8. Receptores metabotrópicos y modulación de la actividad motora**

Los mGluRs tienen una importante función en la modulación de la actividad motora y se expresan abundantemente en los ganglios basales (Fig. 4). La actividad motora está controlada entre otras áreas cerebrales por el estriado. En esta área cerebral el sistema dopaminérgico es el principal implicado en el control de la actividad motora, aunque, otros sistemas de neurotransmisión como glutamato, GABA y acetilcolina también la modulan aumentando o disminuyendo la liberación de dopamina. Además se puede estimular o inhibir la actividad motora despolarizando o hiperpolarizando las neuronas del estriado que proyectan al pálido y a la sustancia negra y que presentan diferentes subtipos de receptores glutamatergicos, GABA-érgicos y colinérgicos.

La activación de mGluRs modula la actividad locomotora inducida por activación de los receptores de dopamina. La depleción de dopamina previene completamente la inducción de

activación motora por la administración en el núcleo accumbens del agonista de mGluRs, t-ACPD (Meeker et al., 1998). Estos datos sugieren que la modulación de la actividad motora por mGluRs en situaciones fisiológicas está mediada por el sistema dopaminérgico. De hecho la administración intra-estriatal de DHPG (agonista de los mGluRs de grupo I) induce un aumento de dopamina en el espacio extracelular en el núcleo accumbens (Bruton et al., 1999; Hu et al., 1999).

La activación de mGluR 1 en núcleo accumbens, caudatoputamen o área ventral tegmental induce un aumento de la actividad motora (Kearney et al., 1997; Swanson y Kalivas, 2000; Wang y Mao, 2000). En cambio, el bloqueo de mGluR 5 en los ganglios basales o la administración por vía sistémica de antagonistas de este receptor normaliza la actividad motora en modelos animales de enfermedad de Parkinson que presentan hipoquinesia (Coccorello et al., 2004; Kachroo et al., 2005; Oueslati et al., 2005).



**Figura 4. Distribución de los mGluRs en los circuitos de los ganglios basales (Conn et al., 2005).** CM: centromedial; Gpi: globo pálido interno; SNr: sustancia negra *pars reticulata*; VA: antero-ventral; VL: ventro-lateral; VM: ventro-medial; STN: núcleo subtalámico; Gpe: globo pálido externo

## 9. Efecto de la hiperamonemia sobre los receptores metabotrópicos de glutamato.

Existen estudios de varios grupos sobre las alteraciones en los receptores ionotópicos de glutamato en hiperamonemia y encefalopatía hepática. Sin embargo hay pocos estudios acerca de los efectos de la hiperamonemia y el fallo hepático sobre los mGluRs. Lombardi *et al.* (1994) mostraron que el amonio (2–4

mM) disminuye la hidrólisis de inositol fosfolípidos y potencia la disminución de AMPc inducidos por t-ACPD (agonista de los mGluRs de los grupos I y II) en cortes de corteza cerebral. Estos datos sugieren que el amonio administrado de forma aguda inhibe vías de transducción de señales asociadas a los mGluRs del grupo I y potencia las asociadas a los del grupo II. Nuestro grupo ha mostrado (Saez et al., 1999) que la exposición crónica a amonio altera vías de transducción de señales asociadas a los mGluRs en neuronas de cerebelo en cultivo. La activación de mGluRs con t-ACPD (agonista de los mGluRs de grupo I y II), induce un aumento en la fosforilación de MAP-2. En cambio, cuando estas neuronas se exponen crónicamente a amonio, el t-ACPD, en lugar de un aumento induce una disminución de la fosforilación de MAP-2 (Saez et al., 1999). La activación de los mGluR 5 aumenta la fosforilación de MAP-2 en los cultivos control, y la disminuye en los cultivos expuestos crónicamente a amonio. Estos datos indican que vías de transducción de señales asociadas a los mGluRs del grupo I

(mGluR 1 y 5) se alteran en situaciones de hiperamonemia crónica.

## **10. Anatomía funcional de los Ganglios Basales**

La corteza cerebral de los mamíferos se encuentra masivamente interconectada con dos estructuras subcorticales que modulan las funciones motoras: el cerebelo y los ganglios basales. Ambas estructuras transmiten la información procesada a la corteza cerebral a través de los núcleos talámicos, cerrando así el circuito (Allen 1974). La manera en que los ganglios basales procesan la información recibida ha sido denominada desde su descripción en los 80 como "modelo actual de organización de los ganglios basales" (Alexander 1986). Se trata de un modelo no definitivo con muchos puntos aun por aclarar y que todavía no puede explicar completamente muchos de los resultados descritos (Parent y Ciccetti, 1998) .

## **10.1 Modelo actual de funcionamiento de los Ganglios**

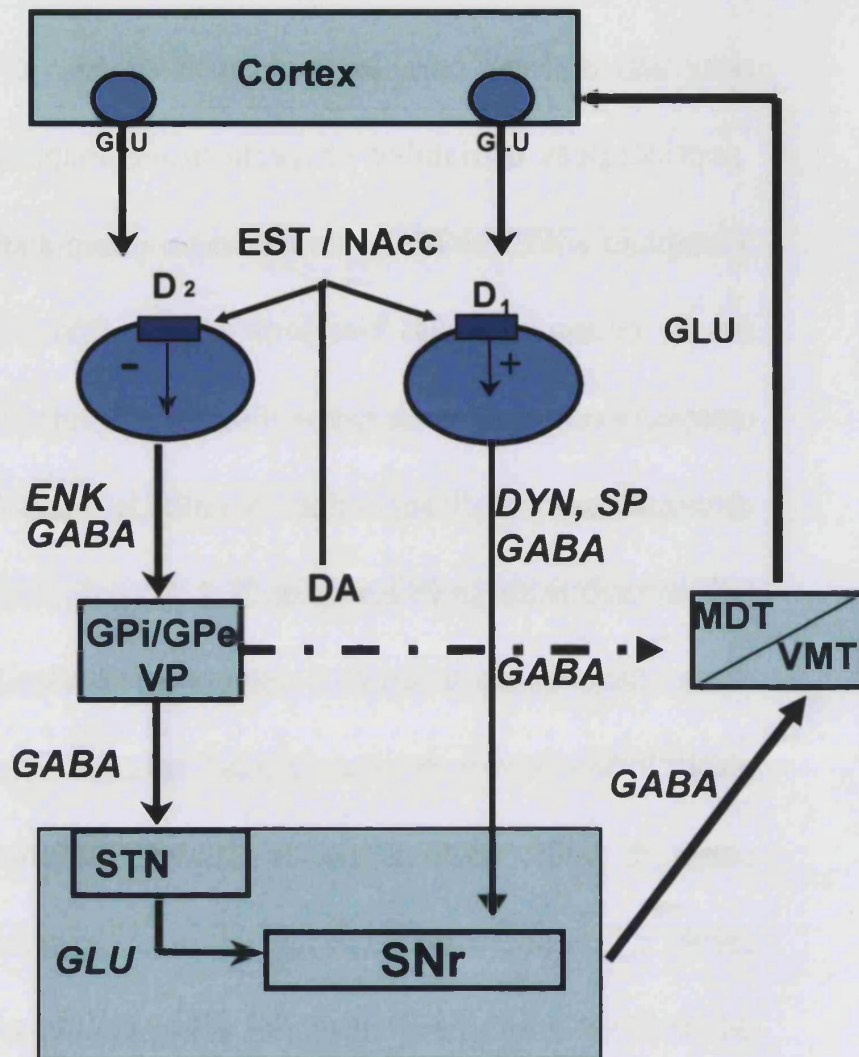
### **Basales**

El Estriado (EST) incluye una parte dorsal (núcleos caudato y putamen) y una parte ventral, que está ocupada por el núcleo accumbens (NAcc). El estriado constituye la entrada al circuito de los ganglios basales (GB) y recibe múltiples aferencias, la mayoría glutamatergicas de la corteza cerebral, pero también del hipocampo, tálamo y amígdala. Los principales núcleos de salida del circuito son el segmento interno del globo pálido (GPi) y la sustancia nigra pars reticulata (SNr) (Fig. 5). Estas dos últimas estructuras ejercen una influencia inhibitoria tónica mediada por GABA sobre las neuronas premotoras excitatorias localizadas en las laminas dorsal y ventral del tálamo respectivamente. Entre el núcleo de entrada y las estructuras de salida (GPi y SNr) existen dos sistemas paralelos de proyección originados en diferentes poblaciones neuronales del EST denominados como "vía directa" y "vía indirecta" (Fig.5).

La vía directa compuesta por neuronas GABA-érgicas y peptidérgicas estriatales proyecta monosinápticamente sobre el complejo GPi/SNr. La vía indirecta compuesta por originada otras neuronas GABA-érgicas y encefalinérgicas estriatales proyecta polisinápticamente sobre el complejo GPi/SNr pasando previamente por el segmento externo del globo pálido (GPe) y núcleo subtalámico (STN) (Fig.5).

Esta secuencia indirecta esta constituida por eferencias inhibitorias GABA-érgicas del EST sobre el GPe, de este ultimo sobre el STN y una eferencia final excitatoria glutamatérgica sobre el complejo GPi/SNr (Albin 1989). También existen proyecciones GABA-érgicas del globo pálido al tálamo medio-dorsal que no pasan por la GPi/SNr.





**Figura 5. Vías “directa” (estriato-nigral) e “indirecta” (estriato-palido-subtálamo-nigral) del estriado y sus conexiones con las áreas talámicas. EST: estriado; Nacc: núcleo accumbens; ENK: encefalina; DYN: dinorfina; SP: sustancia P; GPi/GPe: globo pálido segmento interno y externo; VP: globo pálido ventral; STN: núcleo subtalámico; SNr: sustancia negra *pars reticulata*; mDT: tálamo medio-dorsal; VMT; tálamo ventral medial.**

El balance adecuado entre la función de ambos circuitos es necesario para una función motora correcta. La alteración en el balance entre la activación de ambos circuitos resultaría en alteraciones en la descarga del complejo GPi/SNr dando lugar a la aparición de bradiquinesia o hiperquinesia. La bradiquinesia o aquinesia resultaría de una inhibición GABAérgica aumentada de las neuronas premotoras talámicas como resultado de una excesiva descarga de GABA del complejo GPi/SNr. Esto ocurre por ejemplo tras la degeneración de la vía nigro-estriatal. Como consecuencia de la disminución de DA estriatal disminuye la activación de las neuronas gabaérgicas y encefalinérgicas de la vía indirecta con consecuente hipoactividad del GPe y posterior marcada hiperactividad del STN que libera mas glutamato en la SNr (Albin 1989). El aumento de glutamato en la SNr determina un aumento de la liberación de GABA en las neuronas talámicas.

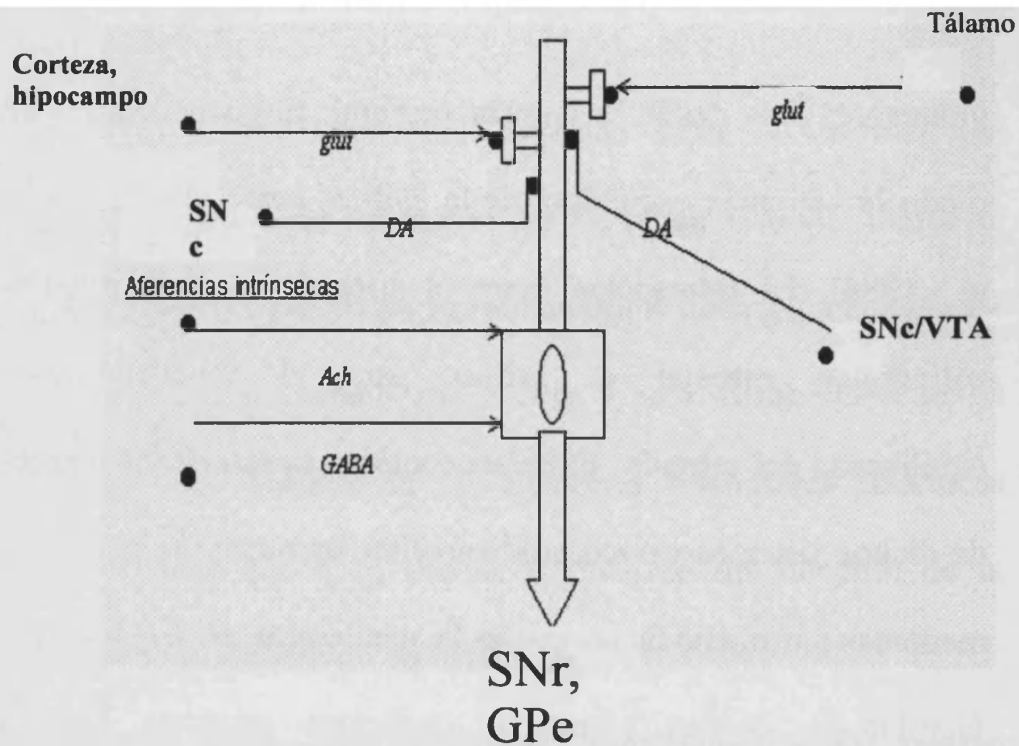
Por otro lado en los trastornos hipercinéticos, como por ejemplo la corea de Huntington, la degeneración de las subpoblaciones

de neuronas estriatales que proyectan sobre la vía indirecta induce una marcada inhibición del GPe que a su vez inhibe el STN. La inhibición del núcleo subtalámico determina una menor liberación de glutamato en la SNr y una disminución de la liberación de GABA en las neuronas premotoras talámicas (Albin 1989) que a su vez se traduce en un aumento de la liberación de glutamato en la corteza.

#### **10.2 Las neuronas espinosas medianas como centro integrador de la información en el estriado.**

Más del 95% de la población neuronal del estriado está formada por las neuronas espinosas medianas que son la diana de la mayoría de las aferencias extrínsecas e intrínsecas del mismo y que constituyen el centro integrador de la información debido a sus arborizaciones que realizan simultáneamente sinapsis con aferencias extrínsecas e intrínsecas (Kemp y Powell 1971) (Fig. 6). Estudios electrofisiológicos han demostrado que fibras nigroestriatales dopaminérgicas hacen sinapsis colaterales con las mismas neuronas espinosas medianas que reciben axones

glutamatérgicos desde la corteza cerebral, modulando de este modo la aferencia excitadora de la corteza cerebral (Bouyer et al., 1984). La interacción entre el sistema dopaminérgico y colinérgico estriatal es crítica para el funcionamiento equilibrado del estriado. El balance adecuado entre las acciones de dichos sistemas parece producirse en las neuronas espinosas medianas por medio de las cuales la acetilcolina ejerce un efecto facilitatorio de las aferencias corticales mientras que la dopamina ejerce un efecto inhibitorio (Lehman 1983).



**Figura 6. Neurona Espinosa Mediana como centro integrador de centro de la información en el estriado.** Representación tomada de Parent y col. (1995), en la que se muestra el papel crucial de las neuronas espinosas medianas como integradoras de aferencias externas e internas. Se destaca que las aferencias extrínsecas terminan distalmente en las dendritas, mientras que las internas lo hacen en la unión somatodendrítica. Las aferencias dopaminérgicas ejercen un papel crucial como moduladoras de las aferencias glutamatérgicas corticales y talámicas.

### **10.3 La salida de la información de los ganglios basales: eferencias del complejo GPI/SNr y pálido.**

*Núcleos talámico mediales*: La eferencia más importante parece ser la dirigida a los núcleos ventral anterior / ventromedial y medio-dorsal ipsilateral del tálamo (Mogenson et al., 1980), siendo estos núcleos considerados los principales reguladores de la transmisión de la información de los ganglios basales hacia la corteza. Son eferencias GABA-érgicas mediante las que, como se ha explicado en apartado 10.1, el circuito de los ganglios basales ejerce una activación cortical mediada por una disminución de la liberación de GABA en los núcleos talámicos (Fig.5).

En cambio las fibras GABA-érgicas que originan en el pálido ventral proyectan al tálamo mediodorsal y de allí a las áreas corticales frontales, principalmente a la corteza prefrontal (Young et al. 1984; Churchill et al. 1996; Zahm et al. 1996). Estas conexiones han sido implicadas tanto en funciones motoras como cognitivas (Alesinsky, 2001; McFarland et al., 2004).

*Núcleo centromedial del tálamo*: El papel de las eferencias del GPi hacia el núcleo centromedial del tálamo no está perfectamente determinado. Este núcleo del tálamo proyecta nuevamente sobre la porción sensorimotora del estriado y en menor medida sobre la corteza cerebral. Las eferencias del núcleo centromedial, esencialmente glutamatérgicas proporcionarían a las neuronas espinosas centromedianas una información adicional para la regulación del procesamiento de la información sensorimotora.

*Habenula*: Existen evidencias anatómicas que sugieren que la habenula podría funcionar como una interfase en la transmisión de la información desde el circuito de los ganglios basales hacia el sistema límbico.

*Núcleos pedúnculo pontinos*: Se ha sugerido que la conexión de los núcleos de salida de los ganglios basales sobre los núcleos pedunculopontinos constituye una vía de salida al circuito cerrado corteza-ganglios basales-corteza. Esta salida permite la posibilidad de que la información procesada en el circuito tenga

acceso rápido y directo a las motoneuronas. Los núcleos pedunculopontinos presentan eferencias excitatorias mediadas por acetilcolina principalmente sobre la pars compacta de la sustancia negra. Recientemente se han descubierto conexiones de los núcleos pedunculopontinos con los núcleos cerebelosos profundos ofreciendo la posibilidad de que los mismos actúen como interfase de comunicación entre el cerebelo y los ganglios basales (Garcia-Rill, 1986; Pahapill y Lozano, 2000).

Colículo superior; Eferencias GABAérgicas principalmente desde la sustancia nigra pars reticulata a los núcleos tectales conectaría la información proveniente los ganglios basales con el sistema motor y particularmente con el haz tectoespinal que controlaría los movimientos de la cabeza y los ojos.

Los principales datos que emergen de estas observaciones anatómicas son, por un lado, la existencia de intrincadas conexiones de antero y retroalimentación (feed-forward and feed-back) de todas las partes del circuito cortico-gangliobasal-tálamo-cortical, y por otro, el papel central del núcleo



ventrolateral, ventromedial y medio-dorsal del tálamo en la modulación del circuito.

El tálamo ventral en particular es un eslabón vital en un sistema de fibras ascendentes no solamente desde los ganglios basales sino también desde el cerebelo y las cortezas precentral y premotora. En realidad, parecería que la mayor parte de la influencia de los ganglios basales y del cerebelo en la actividad motora está canalizada, a través de sistemas separados, hacia la hilera ventral de los núcleos talámicos, que sirve para integrar los impulsos de los ganglios basales y del cerebelo y hacer que estos impulsos alcancen a través de las fibras talamocorticales el sistema corticoespinal y las otras vías descendentes cortico-espinales que finalmente controlan la ejecución de los actos motores.

## **II. OBJETIVO**



## Objetivos

Los pacientes con encefalopatía hepática presentan alteraciones neurológicas de tipo motor. Algunas de estas alteraciones (hipoquinesia, bradiquinesia, rigidez) sugieren una alteración funcional de los circuitos de los ganglios basales. Estudios de imágenes de resonancia magnética y de flujo cerebral corroboran la existencia de alteraciones en los ganglios basales. No se conocen las bases moleculares de dichas alteraciones. Su esclarecimiento permitiría identificar nuevas dianas terapéuticas para el tratamiento de las alteraciones motoras, lo que mejoraría la calidad de vida de los pacientes con fallo hepático y EH.

El glutamato en el núcleo accumbens (NAcc) y en la sustancia negra *pars reticulata* (SNr) tienen un papel crucial en la modulación de la actividad motora. El fallo hepático y la hiperamonemia que se instaura tras el, alteran la neurotransmisión glutamatérgica a diferentes niveles. En cultivos primarios de neuronas, la exposición crónica a amonio altera vías de transducción de señales asociadas a los mGluRs.

Nuestro objetivo consiste en averiguar si las respuestas motoras moduladas por mGluRs en NAcc y SNr están alteradas en modelos animales de fallo hepático crónico (ratas con anastomosis porta-cava) y si la hiperamonemia es el factor responsable en las alteraciones observadas.

Para alcanzar estos objetivos finales abordamos los siguientes objetivos concretos:

1) Estudio de las posibles alteraciones en las respuestas motoras inducidas por estimulación de los mGluRs de grupo I, con DHPG, en el NAcc en ratas con anastomosis porta-cava (PCS) y ratas hiperamonémicas sin fallo hepático.

2) estudio por microdiálisis cerebral *in vivo* en animales despiertos de las posibles alteraciones en los cambios en los niveles extracelulares de los neurotransmisores dopamina y glutamato inducidas por la activación de mGluRs del grupo I en el NAcc de ratas PCS y en ratas con hiperamonemia crónica sin fallo hepático.

- 3) Estudio de los circuitos neuronales implicados en las respuestas motoras inducidas por el DHPG en el NAcc en ratas control, PCS e hiperamonémicas.
- 4) Estudio de las respuestas motoras inducidas por la activación (con DHPG) o el bloqueo (con CPCCOEt) de los mGluRs en la SNr en ratas control y PCS.
- 5) Estudio del circuito neuronal implicado en dichas respuestas.
- 6) Analizar por “immunoblotting” el efecto de la hiperamonemia y el fallo hepático crónicos sobre el contenido de proteínas cruciales en la neurotransmisión glutamatérgica como los transportadores de glutamato (EAAC-1 y GLT-1) y los receptores de glutamato (NMDA, mGluRs) en la SNr y en la corteza motora primaria.



### **III. MATERIALES Y METODOS**





## **1. Animales de experimentación**

Se utilizaron ratas albinas macho de la cepa Wistar (*Rattus norvegicus*) suministradas por Iffa Credo (Lyon, Francia) con un peso comprendido entre 250- 350 gramos. Los animales se estabularon en jaulas en un ambiente controlado: ciclo de 12 horas de luz (7h-19h) y 12 h de oscuridad (19h-7h) y  $22 \pm 2$  °C de temperatura. Los animales se alimentaron con piensos comerciales y tuvieron libre acceso a agua y comida. El cuidado y tratamiento de los animales se realizó siguiendo la legislación española sobre “Protección de los Animales Utilizados para Experimentos y Otros Propósitos Científicos”, de acuerdo con las normas de la Unión Europea (O.J. de E.C. L358/1 18/12/1986).

## **2. Modelo de hiperamonemia crónica sin fallo hepático**

Este modelo fue desarrollado hace años en nuestro laboratorio (Felipo et al., 1988; Azorín et al., 1989). Consiste en la administración durante 3-5 semanas a las ratas de una dieta rica en amonio (20% acetato amónico p/p) y produce un estado de

hiperamonemia sostenida en el que los niveles de amonio en sangre ( $\approx 430 \mu\text{M}$ ) son unas tres veces más altos que en las ratas control ( $\approx 150 \mu\text{M}$ ). En cerebro, hígado y músculo los aumentos de los niveles de amonio son del 41, 37 y 50%, respectivamente. Los niveles de urea en sangre ( $\approx 16 \text{ mM}$ ) y la eliminación de urea ( $25 \text{ mmoles}/24 \text{ h}$ ) en orina son aproximadamente el doble de los valores correspondientes a animales control.

### **3. Modelo animal de fallo hepático: anastomosis porta-cava**

Se llevó a cabo en ratas Wistar macho de 150-175 gr. Los animales se anestesiaron con halotano y se les practicó una anastomosis porta-cava utilizando la técnica de Lee y Fisher (1961). Se clamparon la vena cava inferior y la vena porta, durante no más de 15 minutos. Durante este tiempo se hizo la operación quirúrgica que consistió en cortar la vena cava inferior y acoplarla y suturarla con una pequeña incisión (del diámetro de la vena cava inferior) en la vena porta. A continuación se evaluó el intestino para ver si existía cianosis, y

si ésta persistía el animal se sacrificaba. Si la operación resultaba satisfactoria se suturaba el abdomen de la rata y ésta se devolvía a la jaula individual. Las ratas control operadas *sham* tuvieron la vena cava inferior y la porta clampadas durante 15 min.

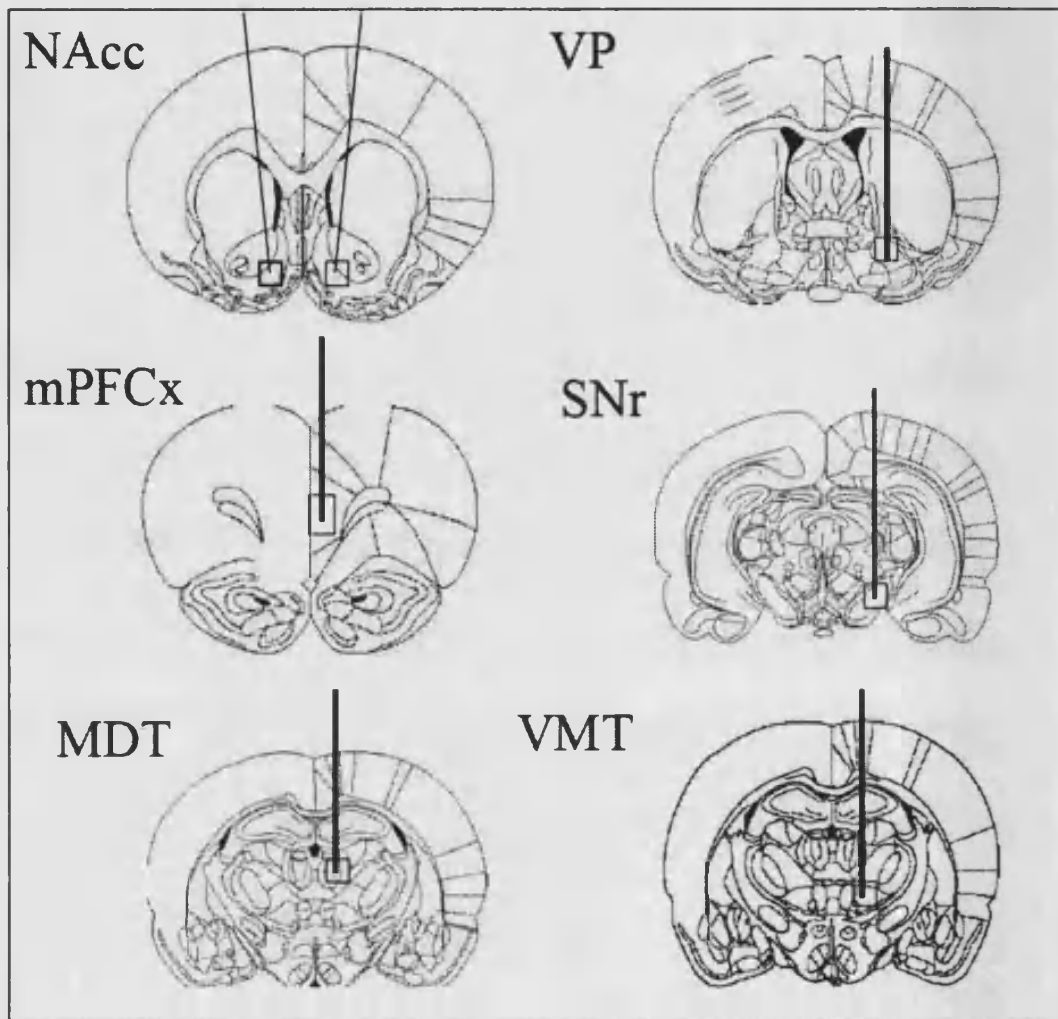
Para corroborar el éxito de la operación la anastomosis se examina el animal al sacrificarlo comprobando que el hígado está atrofiado y la anastomosis es permeable. Además, como una medida del grado de atrofia del hígado, se determinó en cada rata la relación entre el peso del hígado y el peso corporal. La relación entre el peso de hígado y el peso corporal de las ratas control es  $\approx 0.03$ . Cuando la operación es satisfactoria esta relación en las ratas con anastomosis porta cava es mucho menor ( $\approx 0.02$ ) que en las ratas control (*sham*). Los cambios en el peso corporal tras la anastomosis fueron similares a los que se describen en la literatura para este modelo animal.

#### **4. Cirugía para colocación de las cánulas y la guía para la sonda de microdiálisis cerebral *in vivo*.**

Cuatro semanas después de la anastomosis porta-cava o la dieta conteniendo amonio, se anestesiaron las ratas mediante la administración de halotano. Se colocó la cabeza del animal en un sistema de estereotaxia para implantar las cánulas (26 G, Plastic One, Roanoke, VA, USA) en el NAcc (estudio 1) o en la SNr (estudio 2) y la guía (CMA 11, Solna, Suecia) para la sonda de microdiálisis cerebral *in vivo* a nivel del NAcc, VP, SNr, MDT, VMT y mPFCx en el estudio 1; y en el VMT y PMC (corteza motora primaria) en el estudio 2.

Se realizó una incisión sagital de aproximadamente 2.5 cm para dejar la superficie del cráneo al descubierto y con ayuda de una espátula, suavemente, se raspó para quitar el tejido conectivo y de este modo permitir posteriormente una buena adhesión del cemento dental a la superficie del cráneo. A continuación, se perforarán tres agujeros (1 mm Ø) en el cráneo para permitir el acceso vertical a las áreas cerebrales de interés de las cánulas y

de la guía. Las coordenadas (según el atlas de Paxinos y Watson (1996)) donde se colocó la guía de microdiálisis fueron 1 mm por encima del punto final de colocación: NAcc: AP +1.6, ML - 1.4, DV 5.1; VP: AP - 0.3, ML - 2.25, DV - 7.9 ; SNr: AP - 5.5, ML - 2.3, DV - 6.6; MDT: AP - 2.8 , ML - 0.7 , DV -4.4; VMT: AP - 2.3, ML - 1.4, DV - 6.6; mPFCx: AP 3.7, ML - 0.8 , DV - 2.5; PMC: AP +1.6, ML - 3, DV - 1 (esquema 1). Los animales se dejaron durante un periodo 48-72 horas para que se recuperasen antes de realizar los experimentos de microdiálisis cerebral.



**Esquema 1. Localización de las sonda de microdialisis y de las cánulas (Paxina y Watson, 1996).**

## 5. Microdiálisis cerebral *in vivo*

El día del experimento se retiró el estilete de la guía y se introdujo la sonda de microdiálisis que se implantó cuidadosamente en el animal despierto. La sonda se perfundió continuamente con líquido cefalorraquídeo artificial (LCA) a un flujo de 3  $\mu\text{l}/\text{min}$ , utilizando una bomba de microperfusión. La composición del LCA fue en mM: NaCl 145, KCl 3.0,  $\text{CaCl}_2$  2.26, tamponado a pH 7.4 con tampón fosfato 2 mM, (Hermenegildo et al., 1998) y filtrado a través de filtros Milipore de 0.45  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro. Las sondas se perfundieron continuamente durante un periodo de estabilización de 2 horas. Transcurrido este periodo de estabilización se recogieron muestras con un colector de fracciones, cada 20 minutos (60  $\mu\text{l}$ ) y se almacenaron a  $-80^\circ\text{C}$  hasta su análisis. Una vez tomadas las muestras basales, se administró, a través de las cánulas y con un inyector de 33G (Plastic One, Roanoke, VA, USA) DHPG (10 o 30 nmol/parte), CNQX (10 nmol/parte) o CPCCOEt (10 nmol/parte). La técnica de microdiálisis cerebral *in vivo* se



emplea ampliamente para estudiar la concentración extracelular de neurotransmisores. Esta técnica presenta varias ventajas tales como poder obtener muestras del animal *in vivo*, despierto y en movimiento libre por lo que se puede utilizar para estudiar las respuestas neuroquímicas en cerebro *in vivo* a la administración de una droga en una determinada área cerebral, incluso de diferentes drogas simultáneamente en diferentes áreas cerebrales o periféricamente y medir simultáneamente, como en nuestro caso, la actividad motora. Otra de las ventajas de esta técnica es que permite llevar a cabo estudios farmacocinéticos y estudiar la correlación de los cambios neuroquímicos y/o metabólicos con el comportamiento del animal lo cual no es posible cuando esta determinación se realiza en muestras obtenidas *post-mortem*.

## 6. Compuestos utilizados

| compuesto | actividad                          | Sitio de infusión |
|-----------|------------------------------------|-------------------|
| DHPG      | Agonista de los mGluRs de grupo I  | NAcc o SNr        |
| CPCCOEt   | Antagonista de los mGluR 1         | SNr               |
| CNQX      | Antagonista de los receptores AMPA | NAcc              |

DHPG: (S)-3,5-Dihidroxifenilglicina; CPCCOEt: ester etílico del ácido 7-(Hidroxi-imino)ciclopropa[b]cromen-1a-carboxílico; CNQX: 6-Ciano-7-nitroquinoxalina-2,3-diona disódica

## 7. Determinación de dopamina, glutamato y GABA

Las muestras de microdiálisis se analizaron mediante un sistema de cromatografía líquida de alta presión (HPLC) acoplado a un detector electroquímico para medir dopamina y a un detector de fluorescencia para medir glutamato y GABA.

Para la determinación de dopamina (DA) se inyectaron 20  $\mu$ L de microdializado en una válvula de inyección Rheodyne 7125 con un bucle de inyección de 20  $\mu$ l (Rheodyne Inc., Rohnert Park, CA) conectado a una columna de fase inversa C18 (Waters resolve) de una longitud de 15 cm y un diámetro de 3.9 cm y

con partículas de 5  $\mu\text{m}$  de diámetro. La fase móvil contenía: 0.05 mM tampón acetato, 0.15 mM EDTA sodico , 0.4 mM sodio octil sulfonato, 15% metanol, 1.1 mM *n*-dibutylamina. La detección se realizó con un detector electroquímico Coulochem II Model 5200A con una célula (ESA 5021) con un potencial de +50 mV y una célula analítica (ESA 5011) al potencial de +340 mV (Cell 1) y a -250 mV (Cell 2). Los cromatogramas fueron procesados con el programa Millennium 32 de Waters. El límite de detección para la dopamina fue 80 fmol/20  $\mu\text{l}$ .

El glutamato y el GABA se determinaron con un detector de fluorescencia (Waters 474, filtro de excitación 340 nm y filtro de emisión 460 nm) después de haber sido derivatizados con OPA (orto-ftaldehído). El OPA se utiliza específicamente con precolumna de derivatización para el análisis de aminoácidos porque es más sensible y más rápido que otros métodos. Los aminoácidos reaccionan con el OPA en presencia de un reductor fuerte, en condiciones alcalinas (pH 9-11), dando un compuesto fluorescente. La separación en fase reversa seguida de detección

fluorescente constituye un método de detección rápido, sensible y selectivo para todos los aminoácidos con grupos aminos primarios. Los péptidos son menos reactivos y los grupos aminos secundarios no reaccionan. 10  $\mu$ L de microdializado se derivatizaron con la solución de OPA y se inyectaron en el HPLC al cabo de 2 minutos. Para la separación de los aminoácidos se usó una columna de fase inversa C18, con una longitud de 250 mm y un diametro de 4.6 mm y con partículas de 5  $\mu$ m de diámetro (ODS 2, Waters Spherisorb) mantenida a temperatura constante de 20 C.

La cromatografía se realizó con un programa de gradiente de dos soluciones (A y B) cuyo flujo fue de 1 ml/min. La solución A era una mezcla 95/5 (vol/vol) de tampón acetato sodico 50 mM (pH 5.67) y metanol y alcohol isopropilico (12.5 ml por litro de fase). La solución B era una mezcla 70/30 (vol/vol) metanol/agua. Las condiciones experimentales permitieron detectar los dos aminoacidos en 20 minutos. Los cromatogramas fueron procesados con el programa Millennium 32 de Waters.

## **8. Inmunohistoquímica**

Ratas con anastomosis porta-cava (PCS), ratas sham (control de las PCS), ratas hiperamonémicas y sus controles fueron operadas y se colocaron dos cánulas en el núcleo accumbens como se describe anteriormente. Tres días después de la cirugía se administró bilateralmente DHPG (30 nmol/parte) o vehículo. Dos horas después de la inyección las ratas fueron anestesiadas mediante inyección intraperitoneal de hidrato de cloral (4%) y perfundidas mediante inyección intracardíaca con suero salino (0.9% NaCl) heparinizado (0.01% de Heparina). Tras la eliminación de toda la sangre corporal se fijaron los tejidos mediante perfusión de paraformaldehído 4% en tampón fosfato 0.1M (NaK-PO<sub>4</sub>) (PB) a temperatura ambiente. Tras perfundir unos 300 ml de la solución fijadora, los cerebros se extrajeron cuidadosamente y se mantuvieron en ésta solución durante un periodo no superior a dos horas, tras el cual se colocaron en una solución de sacarosa 30% en PB. Los cerebros se mantuvieron en esta solución a 4°C durante dos o tres días. Se cortaron

secciones parasagittales de 40  $\mu\text{m}$  utilizando un microtomo de congelación. Los cortes se almacenaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  en tubos eppendorff que contenían solución crioprotectora (30% etilenglicol, 30% glicerol y 40% PB) hasta su uso. Los cortes se lavaron con tampón fosfato salino (PBS) 0.1 M con 0.2% de Triton X-100 cuatro veces durante 5 minutos para eliminar la solución crioprotectora. La actividad peroxidasa endógena se bloqueó incubando los cortes durante 10 minutos a temperatura ambiente con PBS 0.2% de Triton X-100, que contenía 0.03% (v/v) de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Tras esta incubación los cortes se lavaron nuevamente como antes. Las posibles uniones no específicas de los anticuerpos primarios y secundarios se previnieron mediante la incubación de los cortes con suero del animal en el que se habían producido los anticuerpos secundarios a utilizar (suero de cabra) al 5% en 0.1M PBS con 0.2 % Triton X-100 durante 30 min. Las secciones se lavaron como antes y se incubaron toda la noche a  $4^{\circ}\text{C}$  con el anticuerpo primario correspondiente: anti-c-Fos (Sigma, Saint Louis, USA, PN F7799) dilución 1:5000. El

anticuerpo primario se diluyó en PBS 0.1M con 2% de Triton X-100 y 1.5 % de suero de la especie animal en que se produjo el anticuerpo secundario correspondiente. Los anticuerpos secundarios biotinilados contra IgGs, se diluyeron en PBS 0.1M con 0.2 % de Triton X-100 y 1 % del suero correspondiente. Los cortes se incubaron con los anticuerpos secundarios durante 1h a temperatura ambiente, se lavaron como antes y se incubaron con el complejo avidina-biotina del kit Vector SG durante 1h a temperatura ambiente. Los antígenos se visualizaron utilizando diaminobencidina (20 mg en 100 ml de PB 0.1 M) con 0.002% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% (v/v). Los cortes se montaron en portas previamente gelatinizados y se dejaron secar hasta el día siguiente. Una vez secos se deshidrataron en alcoholes de concentración creciente 70%, 90% y 100% durante 3, 3 y 5 minutos respectivamente. Tras la deshidratación los cortes permanecieron en xileno al menos 5 minutos y se montaron con resina Entellan. Una vez secas las preparaciones se observaron en un microscopio Zeiss

Axioskop 2 y las imágenes analizadas con un programa de análisis de imagen (Leica Qwin).

### **9. “Immunoblotting”.**

Las diferentes áreas cerebrales (SNr, PMC) se homogenizan en 5 volúmenes de tampón conteniendo: Tris-HCl 50 mM (pH 7.5), NaCl 50 mM, EGTA 10 mM, EDTA 5 mM, pirofosfato sódico 2 mM, p-nitrofenilfosfato 4 mM, ortovanadato sódico 1 mM, fenil-metil-sulfonil-fluoruro 1 mM, leupeptina 20 µg/ml y aprotinina 4 µg/ml. Una vez homogenizadas las diferentes áreas se someten a electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico. Tras la electroforesis se transfieren las proteínas a membranas de nitrocelulosa o PVDF (fluoruro de polivinilideno), que se incuban durante toda la noche a 4°C con el anticuerpo primario. Se utilizaron anticuerpos policlonales contra mGluR1 (1:500; CHEMICON Hampshire, UK), mGluR5 (1: 2000; UPSTATE, Charlottesville, VA, USA); GLT-1 (1: 4000, TOCRIS bioscience, Northpoint, UK) o anticuerpos



monoclonales contra EAAC-1 (1:1000, CHEMICON), o la subunidad NR1 del receptor NMDA (1:1000, BD Biosciences). Tras esta incubación se lavaron las membranas con tampón TBS-T (Tris-HCl 50 mM; NaCl 0.15M; 0.05% Tween 20, pH 7) y se incubaron durante 1h a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario contra IgG de conejo o de ratón, conjugados con fosfatasa alcalina (Sigma St. Louis, MO, USA). Las bandas de las proteínas correspondientes aparecen tras incubar las membranas en una solución que contiene 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato 0.4 mM (BCIP) y nitro-blue tetrazolium 0.4 mM (NBT) en un tampón que contiene: Tris-HCl 0.1M pH 9.5; NaCl 0.1M; MgCl<sub>2</sub> 5 mM. Las imágenes de las bandas que se obtienen se captaron mediante un scanner Hewlett Packard precisionscan Scanjet 5300C. La intensidad de las bandas se cuantifica utilizando el programa AlphaImager 2200.

## **10. Verificación histológica de la localización de sondas y cánulas**

Una vez completados los experimentos, se anestesiaron las ratas con una inyección intraperitoneal de hidrato de cloral (4%) (1mL por cada 100g peso) y se profundieron mediante inyección intracardíaca con suero salino (0.9% NaCl) heparinizado (0.01% de Heparina). Tras la eliminación de toda la sangre corporal se fijaron los tejidos mediante perfusión de paraformaldehído 4% en tampón fosfato 0.1M (NaK-PO<sub>4</sub>) (PB) a temperatura ambiente. Tras perfundir unos 300 ml de la solución fijadora, los cerebros se extrajeron cuidadosamente y se mantuvieron en ésta solución durante un periodo no superior a dos horas, tras el cual se colocaron en una solución de sacarosa 30% en PB. Los cerebros se mantuvieron en esta solución a 4°C durante dos o tres días. Se cortaron secciones parasagitales de 40 µm utilizando un microtomo de congelación. Se tiñeron con violeta de cresilo y una vez secados se observaron al microscopio para

verificar de la colocación de las cánulas y de las sondas en las distintas áreas cerebrales.

### **11. Análisis estadístico**

Los resultados del análisis de las muestras por HPLC se expresaron en porcentaje del nivel basal (que es la media de cuatro fracciones previas a la administración del compuesto). En ningún caso estos valores se corrigieron por el factor de recuperación de la membrana de diálisis. Para analizar los resultados se utilizó el programa informático GraphPad Prism (versión 4.00, GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA).

En los experimentos en los que se administró un compuesto a una única dosis o concentración, el análisis estadístico de los resultados se realizó a partir de los valores crudos mediante un test ANOVA de una vía para datos repetidos, seguido de un test de comparación de medias post-hoc. En estos casos se analizaron los factores tiempo y tratamiento. En aquellos experimentos en los que se aplicaron concentraciones crecientes

de un compuesto o tratamientos distintos, los resultados se analizaron mediante ANOVA de dos vías para datos repetidos, siendo la variable independiente la dosis o el compuesto administrado y la dependiente el tiempo. El nivel de significación estadística se estableció con un nivel de confianza del 95% ( $p < 0.05$ ).



## **IV. RESULTADOS**



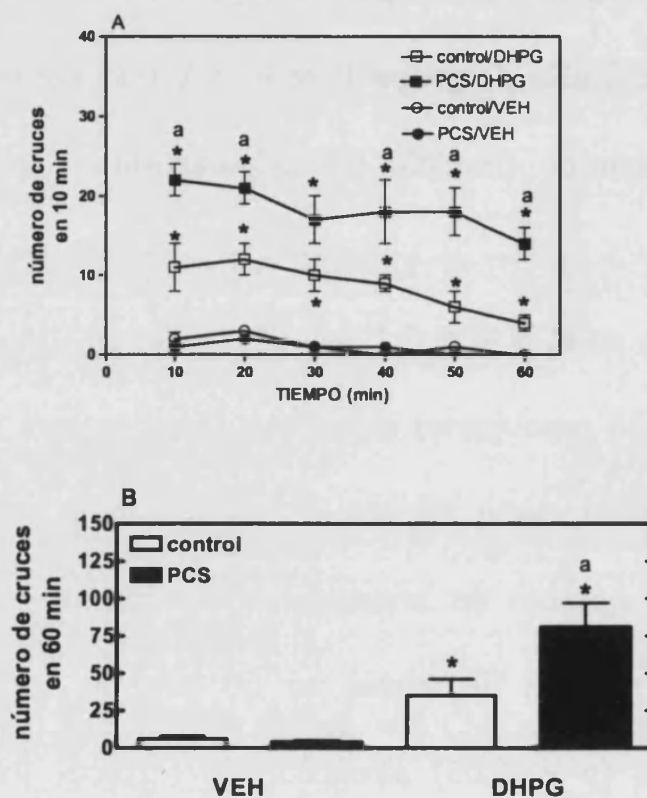
**1. La activación de mGluRs en NAcc de ratas con fallo hepático crónico activa un circuito neuronal diferente que en las ratas control e induce un mayor aumento de la actividad motora.**

**1.1 Efectos motores inducidos por la inyección de DHPG, agonista de los mGluRs de grupo I, en el NAcc en ratas con fallo hepático crónico (modelo de la anastomosis porta-cava).**

La administración en el NAcc. del agonista de los mGluRs del grupo I DHPG, (30 nmol/parte) induce actividad motora tanto horizontal (expresada como número de cruces) como vertical (expresada como número de levantamientos) (Fig.7). En las ratas control el número de cruces en 60 minutos aumenta significativamente ( $p < 0.05$ ) alrededor de 6 veces tras la inyección de DHPG ( $35 \pm 11$  cruces) con respecto a la inyección de vehículo ( $6 \pm 2$  cruces). En las ratas con anastomosis porta-cava (PCS), el número de cruces en 60 min. aumenta significativamente ( $p < 0.05$ ) alrededor de 20 veces tras la inyección de DHPG ( $81 \pm 16$ ) con respecto a la inyección de

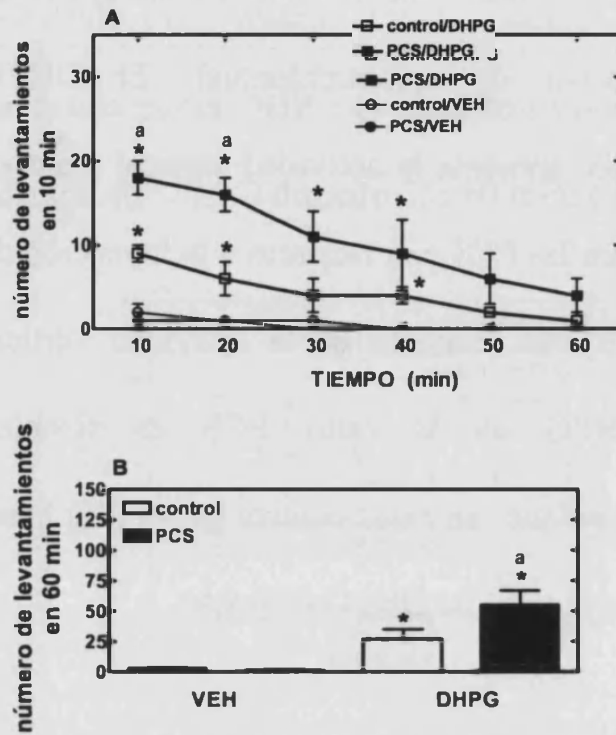


vehículo (4±1 cruces). En las ratas PCS la activación motora inducida por el DHPG es significativamente mayor que en ratas control ( $p < 0.05$ ) durante los 60 minutos de observación.



**Figura 7. Activación motora expresada como número de cruces tras la inyección de DHPG en el Nacc.** Se inyectó bilateralmente DHPG (30 nmol/parte) o vehículo (VEH) en el NAcc. “\*”  $p < 0.05$ , DHPG comparado con vehículo (VEH); “a”  $p < 0.05$  efecto del DHPG en las ratas PCS comparado con las ratas control.

Efectos similares se observaron en el caso de la actividad motora vertical (número de levantamientos). El DHPG administrado en el NAcc aumenta la actividad vertical tanto en las ratas control como en las PCS con respecto a la inyección de vehículo (Fig.8A y 8B). El aumento de la actividad vertical inducido por el DHPG en la ratas PCS es también significativamente mayor que en ratas control ( $p < 0.05$ ) hasta los 30 minutos tras la inyección de DHPG (Fig.8A).



**Figura 8. Activación motora expresada como número de levantamientos tras la inyección de DHPG en el Nacc. Se inyectó bilateralmente DHPG (30 nmol/parte) o vehículo en el NAcc. “ \* “  $p < 0.05$ , DHPG comparado con vehículo (VEH); “a”  $p < 0.05$  efecto del DHPG en las ratas PCS comparado con las ratas control.**

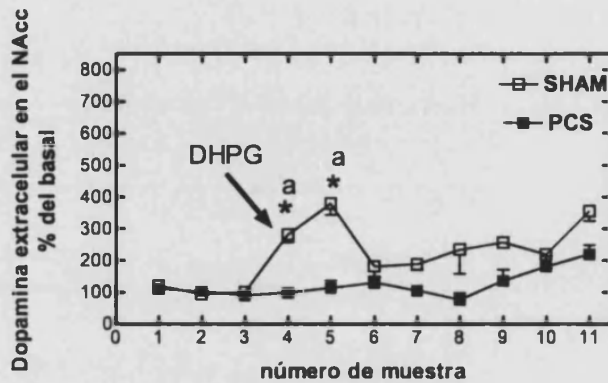
## **1.2 Efectos de la inyección de DHPG sobre la concentración extracelular de dopamina y glutamato en el NAcc.**

La inyección bilateral (30 nmol/parte) de DHPG en el NAcc de las ratas control induce un aumento significativo ( $p < 0.01$ ) de la concentración extracelular de dopamina en el NAcc (Fig. 9).

La concentración extracelular de DA aumenta un  $282 \pm 25\%$  y un  $379 \pm 36\%$  en las fracciones 5 y 6 respecto a sus valores basales.

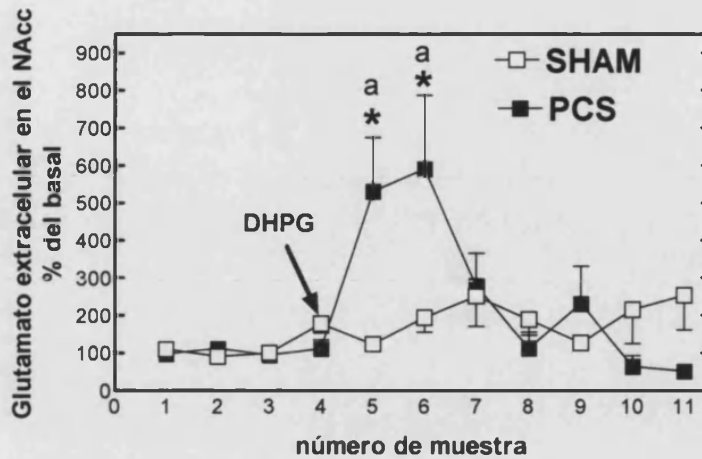
En cambio en las ratas PCS, la inyección de DHPG en el NAcc no induce un aumento de dopamina extracelular, que se mantiene a niveles basales y significativamente más bajos que en las ratas control tras la inyección de DHPG ( $p < 0.01$ ) (Fig.9).

El efecto opuesto se observó en el caso del glutamato extracelular en el NAcc. La administración de DHPG induce un aumento significativo ( $p < 0.01$ ) de la concentración extracelular de glutamato en el NAcc en las ratas PCS, llegando al  $531 \pm 144\%$  y  $591 \pm 196\%$  del basal en las fracciones 5 y 6.



**Figura 9. Efecto de la inyección de DHPG en el NAcc sobre la concentración de dopamina extracelular en el NAcc. Se inyectó bilateralmente DHPG (30 nmol/parte). “ \* “ p <0.05, diferencia significativa comparando con su basal; “a” p <0.05 efecto del DHPG en las ratas PCS comparado con las ratas control.**

En cambio, en las ratas control el DHPG no afecta la concentración extracelular de glutamato (Fig. 10). La concentración de glutamato extracelular basal en el NAcc fue similar en los dos grupos ( $0.35 \pm 0.03 \mu\text{M}$  y  $0.33 \pm 0.04 \mu\text{M}$  en las ratas control y en las ratas PCS respectivamente).

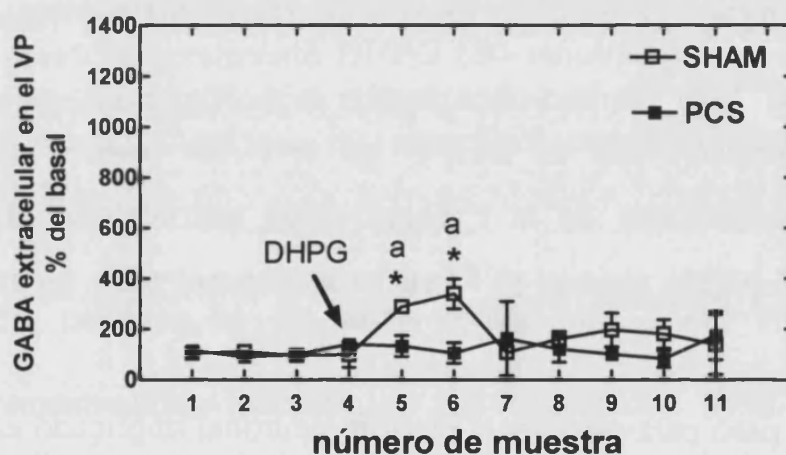


**Figura 10. Efecto de la inyección de DHPG en el NAcc sobre la concentración de glutamato extracelular en el NAcc.** Se inyectó bilateralmente DHPG (30 nmol/parte). “ \* “  $p < 0.05$ , diferencia significativa comparando con su basal; “a”  $p < 0.05$  efecto del DHPG en las ratas PCS comparado con las ratas control.

### 1.3 La administración de DHPG en el NAcc induce un aumento significativo de la concentración extracelular de GABA en el pálido ventral (VP) en ratas control pero no en las PCS.

El siguiente paso para estudiar el circuito neuronal implicado en la estimulación motora inducida por el DHPG fue inyectar bilateralmente DHPG en el NAcc y poner una sonda de microdiálisis en el pálido ventral (VP) (ver Fig. 5). En las ratas control la inyección de DHPG (30 nmol/parte) en el NAcc induce un aumento significativo ( $p < 0.05$ ) de GABA en el VP.

La concentración extracelular de GABA aumenta un  $270 \pm 20\%$  y un  $360 \pm 49\%$  en las fracciones 5 y 6 con respecto a sus valores basales (Fig. 11). En cambio, en las ratas PCS, la inyección de DHPG en el NAcc no afecta el GABA en el VP que se mantiene a niveles basales. La concentración basal de GABA en el VP fue significativamente ( $p < 0.05$ ) menor en las ratas PCS ( $2 \pm 0.2$  nM) que en las ratas control ( $5.3 \pm 0.7$  nM).



**Figura 11. Efecto de la inyección de DHPG en el NAcc sobre la concentración de GABA extracelular en el VP.** Se inyectó bilateralmente DHPG (30 nmol/parte). “ \* “  $p < 0.05$ , diferencia significativa comparando con su basal; “a”  $p < 0.05$  efecto del DHPG en las ratas PCS comparado con las ratas control.

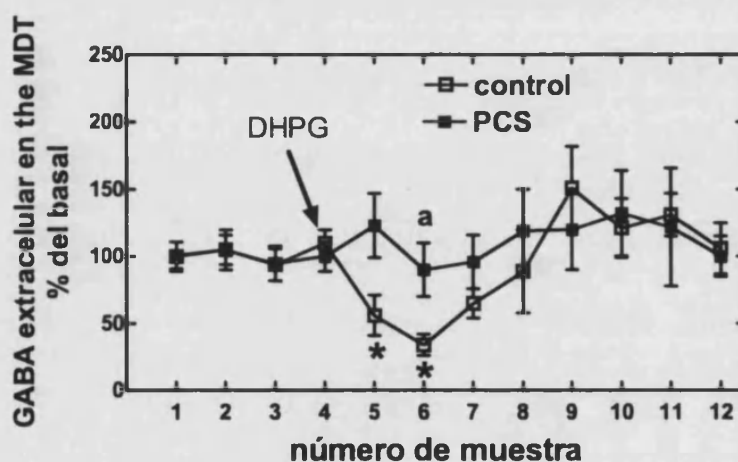
Las concentraciones extracelulares de glutamato y dopamina en el VP no cambiaron tras la inyección de DHPG en el NAcc ni en las ratas control ni en las ratas PCS (datos no mostrados).

**1.4 La administración de DHPG en el NAcc induce una disminución significativa de la concentración extracelular de GABA en el tálamo medio-dorsal (MDT) en ratas control pero no en las PCS.**

El siguiente paso para estudiar el circuito neuronal implicado en la estimulación motora inducida por el DHPG fue inyectar bilateralmente DHPG en el NAcc y poner una sonda de microdiálisis en el tálamo medio-dorsal (MDT), ya que esta subdivisión talámica el MDT recibe fibras GABA-érgicas desde el VP (Fig. 5). En las ratas control la inyección de DHPG (30 nmol/parte) en el NAcc induce una disminución significativa ( $p < 0.05$ ) de la concentración extracelular de GABA en el MDT ( $56 \pm 15\%$  y  $34 \pm 8\%$  en la fracción 5 y 6) (Fig.12). En cambio, en las ratas PCS la inyección de DHPG en el NAcc no afecta el



GABA extracelular en el MDT. La concentración basal de GABA en el MDT fue significativamente ( $p < 0.05$ ) mayor en las ratas PCS ( $5.5 \pm 0.5$  nM) que en las ratas control ( $2.9 \pm 0.3$  nM). La concentración extracelular de glutamato en el MDT no cambió ni en las ratas control ni en las PCS tras la inyección de DHPG en el NAcc.

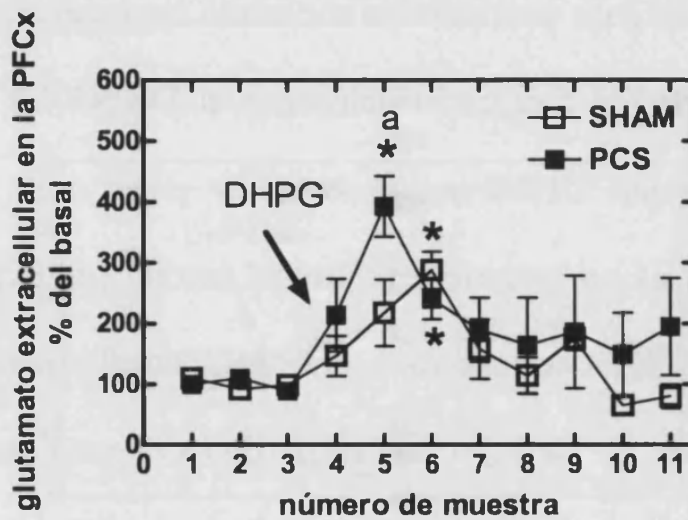


**Figura 12.** Efecto de la inyección de DHPG en el NAcc sobre la concentración de GABA extracelular en el MDT. Se inyectó bilateralmente DHPG (30 nmol/parte). “ \* “  $p < 0.05$ , diferencia significativa comparando con su basal; “a”  $p < 0.05$  efecto del DHPG en las ratas PCS comparado con las ratas control.

**1.5 La administración de DHPG en el NAcc induce un aumento de la concentración extracelular de glutamato en la corteza prefrontal (PFCx) tanto en ratas control como en PCS.**

El siguiente paso para estudiar el circuito neuronal implicado en la estimulación motora inducida por el DHPG fue inyectar bilateralmente DHPG en el NAcc y poner una sonda de microdiálisis en la corteza prefrontal medial (mPFCx) ya que esta parte de la corteza recibe fibras glutamatérgicas desde el MDT (Fig. 5). La inyección de DHPG (30 nmol/parte) en el NAcc induce un aumento significativo ( $p < 0.05$ ) del glutamato extracelular en la mPFCx tanto en las ratas control como en las PCS, siendo el aumento mayor en las ratas PCS. En las ratas control, el glutamato alcanzó un  $288 \pm 31\%$  del basal en la fracción 6. En las ratas PCS, el aumento es significativamente mayor ( $p < 0.05$ ) y ocurre antes que en las ratas control, alcanzando un  $393 \pm 50\%$  y un  $240 \pm 33\%$  del basal en las

fracciones 5 y 6 (Fig. 13). La concentración de glutamato extracelular en la mPFCx antes de inyectar DHPG fue significativamente ( $p < 0.05$ ) mas alta en las ratas PCS ( $0.33 \pm 0.08 \mu\text{M}$ ) que en las ratas control ( $0.16 \pm 0.03 \mu\text{M}$ ).



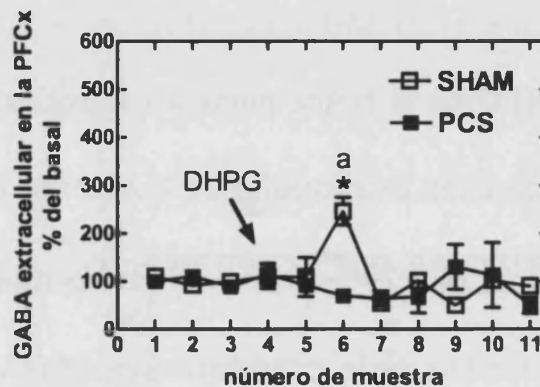
**Figura 13.** Efecto de la inyección de DHPG en el NAcc sobre la concentración de glutamato extracelular en la PFCx. Se inyectó bilateralmente DHPG (30 nmol/parte). “ \* “  $p < 0.05$ , diferencia significativa comparando con su basal; “a”  $p < 0.05$  efecto del DHPG en las ratas PCS comparado con las ratas control.

**1.6 La administración de DHPG en el NAcc induce un aumento de la concentración extracelular de GABA en la corteza prefrontal (PFCx) en las ratas control pero no en las PCS.**

La inyección de DHPG en el NAcc aumentó significativamente ( $p < 0.05$ ) la concentración extracelular de GABA en la mPFCx de las ratas control un  $246 \pm 29\%$  del basal. En las ratas PCS no se observó ningún cambio en la concentración de GABA en la mPFCx tras la inyección de DHPG en el NAcc (Fig 14). La concentración basal de GABA extracelular en la mPFCx fue similar en las ratas control ( $2.4 \pm 0.7$  nM) y en las PCS ( $2 \pm 0.6$  nM).

Los resultados descritos hasta ahora sugieren que en las ratas control la inyección de DHPG estimula las neuronas que desde el NAcc proyectan al VP conduciendo a un aumento de la concentración de GABA en este. Este aumento de GABA en el VP, a su vez, inhibe las neuronas GABAérgicas del VP que

proyectan al MDT induciendo una disminución del GABA en esta área talámica.



**Figura 14. Efecto de la inyección de DHPG en el NAcc sobre la concentración de GABA extracelular en la PFCx.** Se inyectó bilateralmente DHPG (30 nmol/parte). “ \* “  $p < 0.05$ , diferencia significativa comparando con su basal; “a”  $p < 0.05$  efecto del DHPG en las ratas PCS comparado con las ratas control.

La disminución del GABA en el MDT, a su vez, desinhibe las vías glutamatérgicas que desde el MDT proyectan a la mPFCx induciendo un aumento de la concentración de glutamato extracelular en ella. En cambio, el circuito neuronal mencionado: NAcc  $\rightarrow$  VP  $\rightarrow$  MDT  $\rightarrow$  mPFCx no parece estar

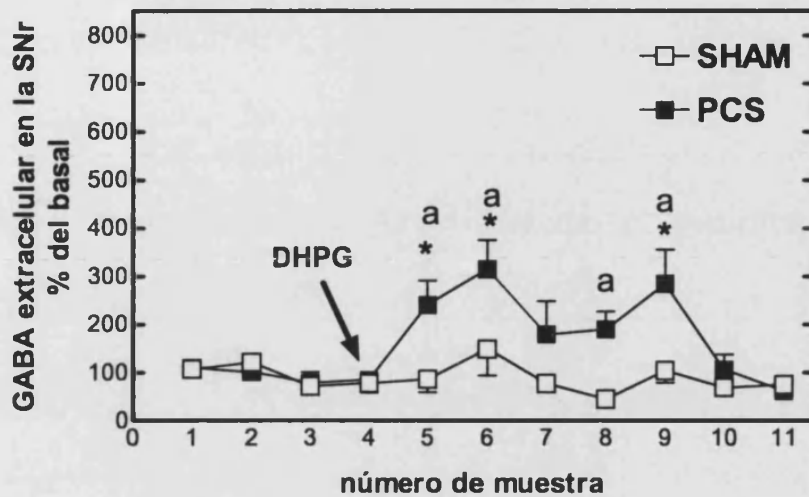
funcionando en las ratas PCS cuando inyectamos el DHPG en el NAcc, ya que la inyección de DHPG en NAcc no altera las concentraciones de GABA en el VP ni en el MDT. Sin embargo, si que aumenta el glutamato extracelular en la mPFCx. Además el DHPG estimula la actividad motora en las ratas PCS incluso más que en las ratas control. Esto sugiere que debe haber otro circuito neuronal que se active en las ratas PCS cuando inyectamos el DHPG en el NAcc.

Otro núcleo que modula la actividad motora es la sustancia negra pars reticulata (SNr) que recibe también aferencias GABA-érgicas del NAcc (Fig. 5). Por tanto estudiamos el efecto de la inyección de DHPG en el NAcc sobre la concentración extracelular de GABA y glutamato en la SNr.

**1.7 La administración de DHPG en el NAcc induce un aumento de la concentración extracelular de GABA en la sustancia negra pars reticulata (SNr) en las ratas PCS pero no en las control.**

En las ratas control la inyección de DHPG (30 nmol/parte) en el NAcc no indujo modificaciones significativas en la concentración extracelular de GABA o de glutamato en la SNr. En cambio, en las ratas PCS, la inyección de DHPG en el NAcc induce un aumento significativo ( $p < 0.05$ ) de la concentración extracelular de GABA en la SNr, alcanzando un  $241 \pm 50\%$  y un  $315 \pm 60\%$  en las fracciones 5 y 6 (Fig. 15).

La concentración basal de GABA extracelular en la SNr fue similar en las ratas control ( $2 \pm 0.3$  nM) y en las (PCS  $2.2 \pm 0.4$  nM).



**Figura 15. Efecto de la inyección de DHPG en el NAcc sobre la concentración de GABA extracelular en la SNr.** Se inyectó bilateralmente DHPG (30 nmol/parte). “ \* “  $p < 0.05$ , diferencia significativa comparando con su basal; “a”  $p < 0.05$  efecto del DHPG en las ratas PCS comparado con las ratas control.

En la SNr la concentración extracelular de dopamina no cambió significativamente tras la inyección de DHPG en el NAcc (datos no mostrados).

La concentración extracelular de glutamato en la SNr no cambió tras la inyección de DHPG en el NAcc, pero sus niveles basales están drásticamente aumentados ( $p < 0.01$ ) en la SNr de las ratas PCS. La concentración extracelular de glutamato en la



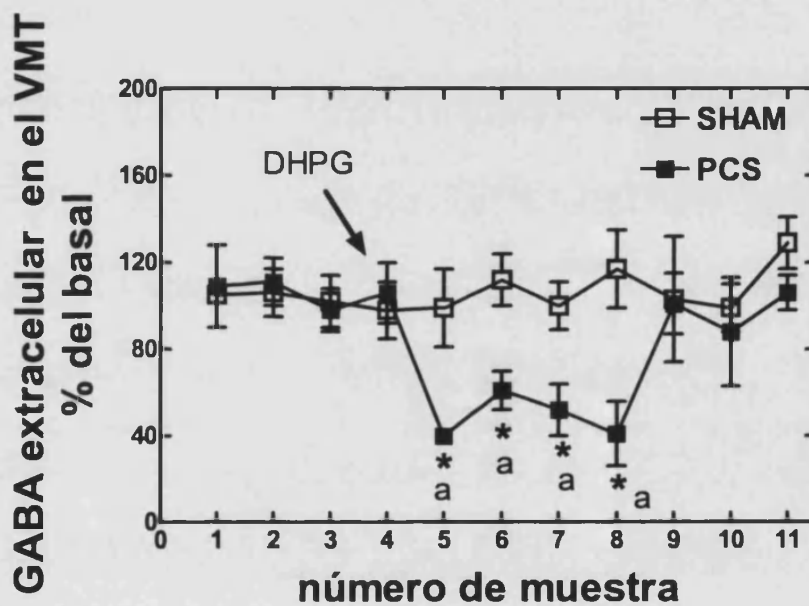
SNr fue  $74 \pm 3$  nM en las ratas control y  $1100 \pm 300$  nM en las ratas PCS.

**1.8 La administración de DHPG en el NAcc induce una disminución de la concentración extracelular de GABA en el tálamo ventro-medial (VMT) en las ratas PCS pero no en las control.**

Las neuronas de la SNr proyectan sus fibras GABAérgicas al tálamo ventro-medial (VMT) (Fig. 5). Por lo tanto, el siguiente paso para estudiar el circuito neuronal implicado en la estimulación motora inducida por el DHPG en las ratas PCS fue inyectar bilateralmente DHPG en el NAcc y poner una sonda de microdiálisis en el VMT. En las ratas control, la inyección de DHPG en el NAcc no induce cambios ni en el GABA ni en el glutamato extracelular en el VMT. En cambio, en las ratas PCS la inyección de DHPG en el NAcc induce una disminución significativa ( $p < 0.01$ ) y sostenida de la concentración extracelular de GABA en el VMT, que bajó hasta un  $40 \pm 3\%$ ,

61±9, 52±12 y 41±15% del basal en las fracciones 5, 6, 7 y 8 (Fig. 16).

La concentración basal de GABA en el VMT fue significativamente mas alta ( $p < 0.05$ ) en las ratas PCS ( $0.26 \pm 0.07 \mu\text{M}$ ) que en las ratas control ( $0.10 \pm 0.015 \mu\text{M}$ ).



**Figura 16.** Efecto de la inyección de DHPG en el NAcc sobre la concentración de GABA extracelular en el VMT. Se inyectó bilateralmente DHPG (30 nmol/parte). “ \* “  $p < 0.05$ , diferencia significativa comparando con su basal; “a”  $p < 0.05$  efecto del DHPG en las ratas PCS comparado con las ratas control.

La concentración extracelular de glutamato en el VMT de las ratas PCS no cambió en el VMT tras la inyección de DHPG en el NAcc. La concentración basal de glutamato en el VMT fue significativamente menor ( $p < 0.05$ ) en las ratas PCS ( $1.7 \pm 0.3$  nM) que en ratas control ( $3.0 \pm 0.2$  nM).

Estos resultados sugieren que en las ratas control la activación de los mGluRs en el NAcc por DHPG estimula la actividad motora a través del circuito neuronal que implica NAcc  $\rightarrow$  VP  $\rightarrow$  MDT  $\rightarrow$  mPFCx y que este circuito no funciona en las ratas con fallo hepático crónico (ratas PCS). En cambio en las ratas PCS se activa otro circuito neuronal que implica NAcc  $\rightarrow$  SNr  $\rightarrow$  VMT  $\rightarrow$  mPFCx. Este circuito no se activa en las ratas control.

Tratamos a continuación de averiguar porque el DHPG produce esta activación diferencial de 2 circuitos diferentes en ratas control y PCS. Como se observa en la Fig 9, la inyección de DHPG en NAcc aumenta el glutamato en el NAcc en ratas PCS pero no en las control. Este glutamato puede activar receptores

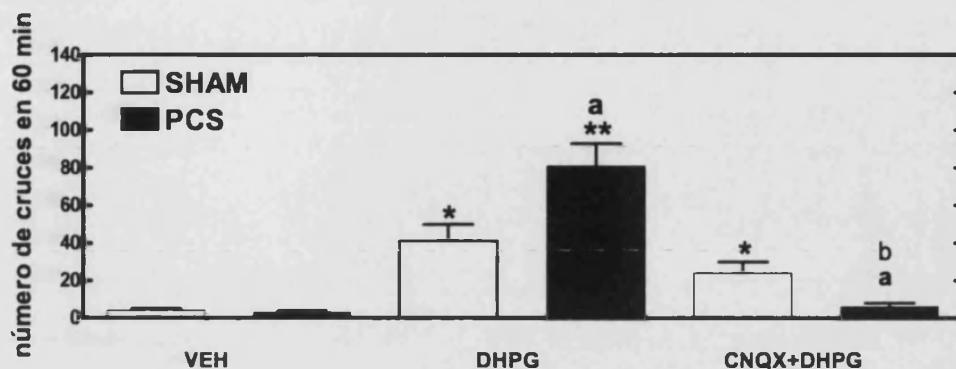
AMPA, por tanto estudiamos si el bloqueo de los receptores AMPA en el NAcc, con CNQX previene los efectos motores del DHPG en las ratas PCS.

### **1.9 El aumento de la actividad motora inducido por DHPG en las ratas PCS está mediado por el aumento de glutamato en el NAcc.**

Inyectamos bilateralmente CNQX (1 nmol/parte) antagonista de los receptores AMPA y DHPG (30 nmol/parte) en el NAcc y pusimos una sonda de microdiálisis en la SNr. La inyección de CNQX y DHPG en el NAcc indujo en las ratas control una estimulación de la actividad motora similar a la que induce el DHPG solo (Fig 17).

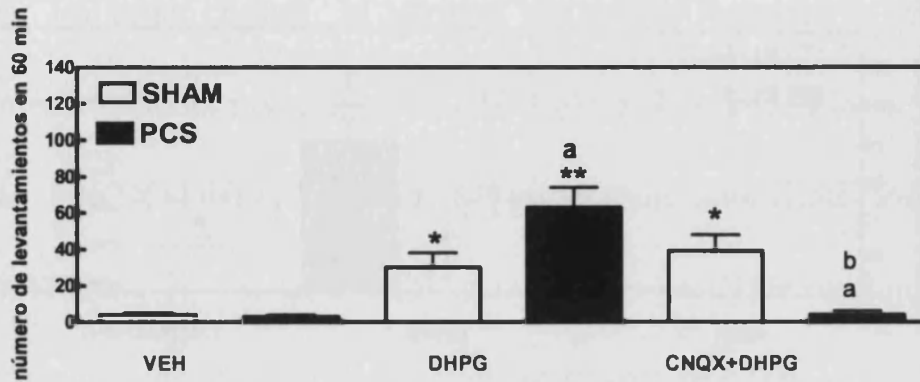
En cambio, en las ratas PCS la inyección de CNQX previene completamente la estimulación motora inducida por el DHPG (Fig 16) manteniéndose la actividad a niveles similares a los que se obtienen tras la inyección del vehículo en el NAcc.

En las ratas control, el número de cruces registrados en 60 minutos tras la inyección de DHPG ( $41 \pm 9$ ) y tras la inyección de CNQX+DHPG ( $31 \pm 6$ ) no fueron significativamente diferentes. En las ratas PCS la inyección de DHPG indujo un aumento significativo de la actividad motora ( $p < 0.01$ ) ( $63 \pm 11$  cruces en 60 min). Cuando se inyectaron las ratas con CNQX+DHPG el número de cruces se redujo ( $4 \pm 2$  en 60 minutos) significativamente ( $p < 0.0001$ ) con respecto al número de cruces inducido por la inyección de DHPG solo, manteniéndose al mismo nivel que el inducido por la inyección de vehículo ( $3 \pm 1$  cruces en 60 minutos). La inyección de CNQX solo en el NAcc no indujo cambios significativos respecto al basal en la actividad motora ni en las ratas control ( $8 \pm 3$ ) ni en las PCS ( $8 \pm 2$ ).



**Figura 17. El antagonista de los receptores AMPA, CNQX, previene los efectos motores inducidos por DHPG solo en las ratas PCS.** Se inyectó bilateralmente en el NAcc DHPG (30 nmol/parte), vehículo (VEH) o CNQX (1 nmol/parte) mas DHPG (30 nmol/parte) y se observó la actividad motora expresada como número de cruces durante 60 min. “\*”  $p < 0.05$  comparando con la inyección de VEH; “a”  $p < 0.05$  comparando ratas PCS y SHAM; “b”  $p < 0.05$  comparando CNQX+DHPG con DHPG.

El mismo efecto ocurrió en el caso de la actividad vertical (expresado como número de levantamientos): en las ratas PCS el CNQX disminuyó la actividad vertical inducida por la inyección de DHPG a niveles similares a la actividad vertical inducida por la inyección de vehículo en el NAcc. Sin embargo, el CNQX no afectó el aumento de la actividad motora inducido por el DHPG en las ratas control (Fig 18).



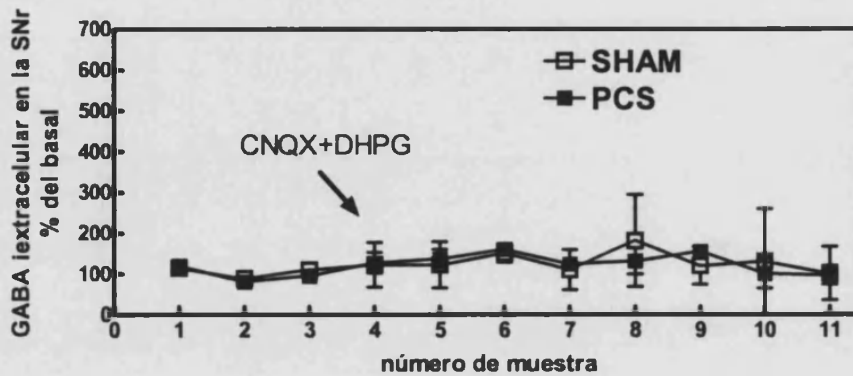
**Figura 18.** El antagonista de los receptores AMPA, CNQX, previene los efectos motores inducidos por DHPG solo en las ratas PCS. Se inyectó bilateralmente en el NAcc DHPG (30 nmol/parte), vehículo (VEH) o CNQX (1 nmol/parte) mas DHPG (30 nmol/parte) y se observó la actividad motora expresada como número de levantamientos durante 60 min. “\*”  $p < 0.05$ , comparando con la inyección de VEH; “a”  $p < 0.05$  comparando las ratas PCS y las SHAM; “b”  $p < 0.05$  comparando CNQX+DHPG con DHPG.

**1.10 El aumento de GABA extracelular en la SNr inducido por la inyección de DHPG en NAcc en las ratas PCS está mediado por el aumento de glutamato en el NAcc.**

Para comprobar si el aumento de glutamato en el NAcc inducido por DHPG es el responsable del aumento de GABA extracelular en la SNr inyectamos CNQX (1 nmol/parte) y DHPG (30 nmol/parte) en el NAcc y pusimos una sonda de microdiálisis en

la SNr. La inyección de CNQX+DHPG como la de DHPG solo no induce ningún cambio en la concentración de GABA extracelular en la SNr de las ratas control. En cambio, en las ratas PCS el aumento de GABA extracelular en la SNr inducido por la inyección de DHPG en el NAcc (Fig.15) se previene completamente por el CNQX (Fig. 19). El CNQX solo inyectado en el NAcc no induce ningún cambio significativo en el GABA en la SNr ni en las ratas control ni en las PCS (datos no mostrados). Estos datos sugieren que en las ratas PCS la estimulación de la actividad motora por mGluRs en el NAcc está mediada por el aumento de la concentración extracelular de glutamato en el NAcc que activa receptores AMPA, despolarizando las fibras GABA-érgicas que desde el NAcc proyectan a la SNr y conduciendo a un aumento de GABA extracelular en la SNr y estimulando la actividad motora.



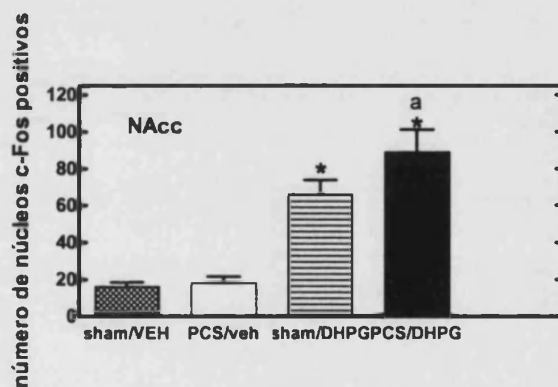


**Figura 19.** El antagonista de los receptores AMPA, CNQX, previene el aumento del GABA extracelular en la SNr de las ratas PCS inducido por la inyección de DHPG en el NAcc. Se inyectó bilateralmente en el NAcc CNQX (1 nmol/parte) mas DHPG (30 nmol/parte) y se midió la concentración de GABA extracelular en la SNr.

### **1.11 El aumento de la expresión de c-Fos confirma la activación diferencial de los dos circuitos neuronales en ratas control y PCS.**

Con el fin de corroborar que la estimulación de los mGluRs de grupo I en el NAcc activa 2 circuitos neuronales diferentes en las ratas control y en las ratas PCS inyectamos en el NAcc bilateralmente DHPG (30 nmol/parte) y después de dos horas sacrificamos y perfundimos los animales. Los cortes obtenidos se tiñeron por técnicas de inmunohistoquímica para detectar la

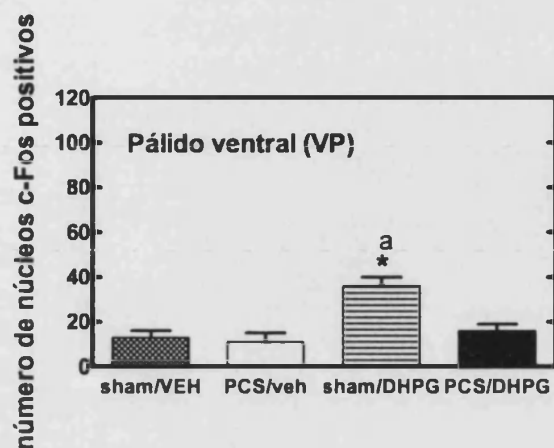
proteína c-Fos. La expresión de c-Fos en las neuronas representa un índice de activación neuronal. La inyección de DHPG en el NAcc aumenta la expresión de la proteína c-Fos en el NAcc tanto en las ratas control como en las PCS. El número de neuronas c-Fos positivas tras la inyección de vehículo en el NAcc fue similar en los dos grupos:  $6 \pm 2$  en las ratas control y  $8 \pm 3$  en las ratas PCS. La expresión de c-Fos inducida por DHPG en el NAcc en las ratas PCS ( $89 \pm 12$  núcleos c-Fos-positivos) fue significativamente mayor ( $p < 0.05$ ) que en las ratas control ( $66 \pm 7$  núcleos c-Fos-positivos) (Fig. 20).



**Figura 20. El DHPG aumenta la expresión de c-Fos en el NAcc.** Número de neuronas c-Fos positivas/ $\text{mm}^2$  en el NAcc dos horas después de la inyección de DHPG (30 nmol/parte) o vehículo (VEH) en el NAcc. “ \* “  $p < 0.05$ , diferencia

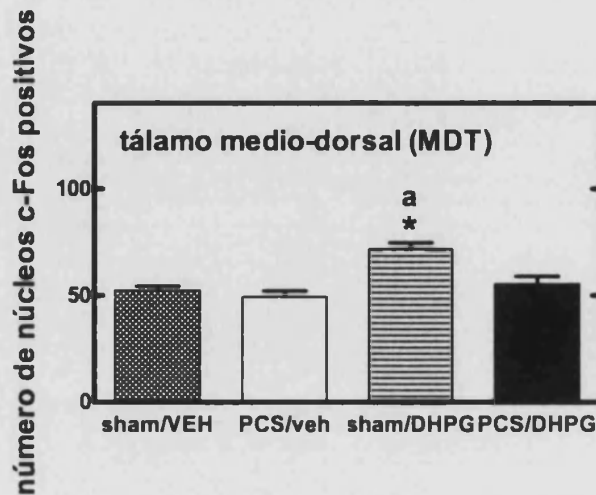
significativa comparando con la inyección de VEH; “a”  $p < 0.05$  comparando las ratas PCS y las SHAM.

El número de neuronas c-Fos positivas en el VP tras la inyección de vehículo en el NAcc fue similar en los dos grupos:  $13 \pm 3$  en las ratas control y  $11 \pm 4$  en las ratas PCS. La inyección de DHPG en el NAcc induce un aumento de la expresión de c-Fos ( $p < 0.05$ ) en el pálido ventral de las ratas control ( $36 \pm 4$  núcleos c-Fos-positivos) pero no en las ratas PCS ( $16 \pm 3$  núcleos c-Fos-positivos) (Fig. 21).



**Figura 21. El DHPG aumenta la expresión de c-Fos en el VP solo de las ratas control.** Número de neuronas c-Fos positivas/mm<sup>2</sup> en el VP dos horas después de la inyección de DHPG (30 nmol/parte) o vehículo (VEH) en el NAcc. “ \* “ p <0.05, comparando con la inyección de VEH; “a” p <0.05 comparando las ratas PCS y las SHAM.

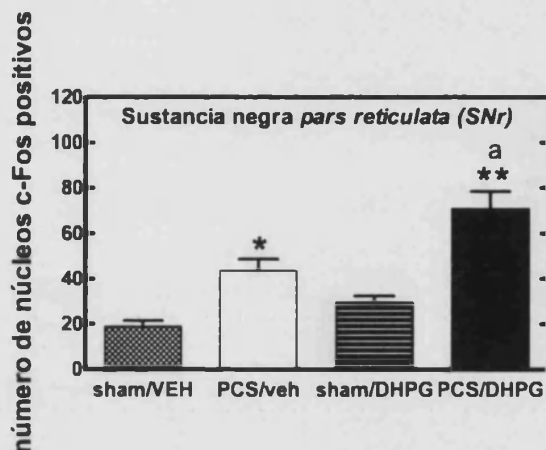
Asimismo observamos un aumento significativo ( $p < 0.05$ ) de la expresión de c-fos en el tálamo medio-dorsal de las ratas control ( $72 \pm 3$  núcleos c-Fos-positivos) pero no en el de las ratas PCS ( $54 \pm 4$  núcleos c-Fos-positivos) (Fig. 22). La inyección de vehículo en el NAcc induce una expresión similar de c-Fos en el MDT en las ratas control ( $52 \pm 2$  núcleos c-Fos-positivos) y en las PCS ( $49 \pm 3$  núcleos c-Fos-positivos (Fig.22).



**Figura 22. El DHPG aumenta la expresión de c-Fos en el MDT solo de las ratas control.** Número de neuronas c-Fos positivas/mm<sup>2</sup> en el MDT dos horas después de la inyección de DHPG (30 nmol/parte) o vehículo (VEH) en el NAcc. “ \* “ p <0.05, comparando con la inyección de VEH; “a” p <0.05 comparando las ratas PCS y las SHAM.

El número de neuronas c-Fos positivas en la SNr tras la inyección de vehículo en el NAcc fue significativamente mayor (p < 0.05) en las ratas PCS (44 ± 5) que en las ratas control (19 ± 3). La inyección de DHPG en el NAcc aumentó significativamente (p < 0.01) el número de neuronas c-Fos positivas en la sustancia negra *pars reticulata* de las ratas PCS

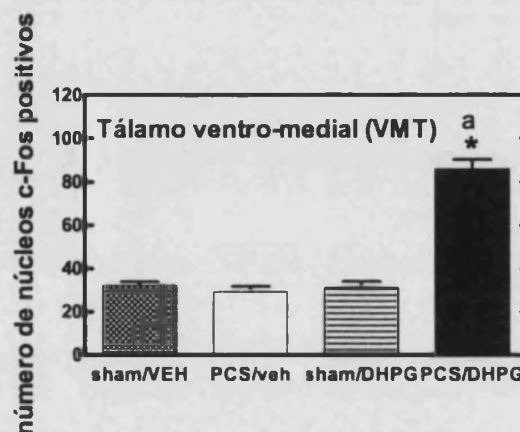
(71±7 núcleos c-Fos-positivos) pero no en la de las control (25±3 núcleos c-Fos-positivos)(Fig. 23).



**Figura 23. El DHPG aumenta la expresión de c-Fos en la SNr solo de las ratas PCS.** Número de neuronas c-Fos positiva/mm<sup>2</sup> s en la SNr dos horas después de la inyección de DHPG (30 nmol/parte) o vehículo (VEH) en el NAcc. “ \* “ p <0.05, “ \*\* “ p <0.01 comparando con la inyección de VEH; “a” p <0.01 comparando las ratas PCS y las SHAM.

El número de neuronas c-Fos positivas en el tálamo ventromedial (VMT) tras la inyección de vehículo en el NAcc fue similar en los dos grupos: 32 ± 3 en las ratas control y 29 ± 3 en las ratas PCS. La inyección de DHPG en el NAcc aumentó

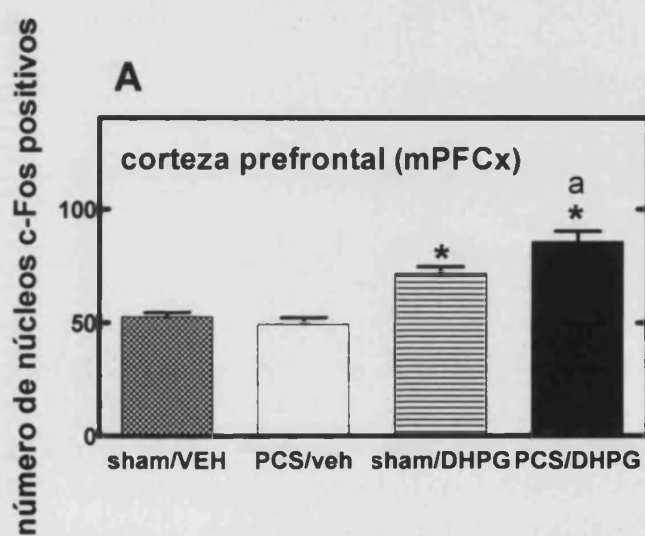
significativamente ( $p < 0.01$ ) el número de neuronas c-Fos positivas en el VMT de las ratas PCS ( $86 \pm 5$  núcleos c-Fos-positivos) pero no en la de las control ( $31 \pm 3$  núcleos c-Fos-positivos)(Fig. 24).



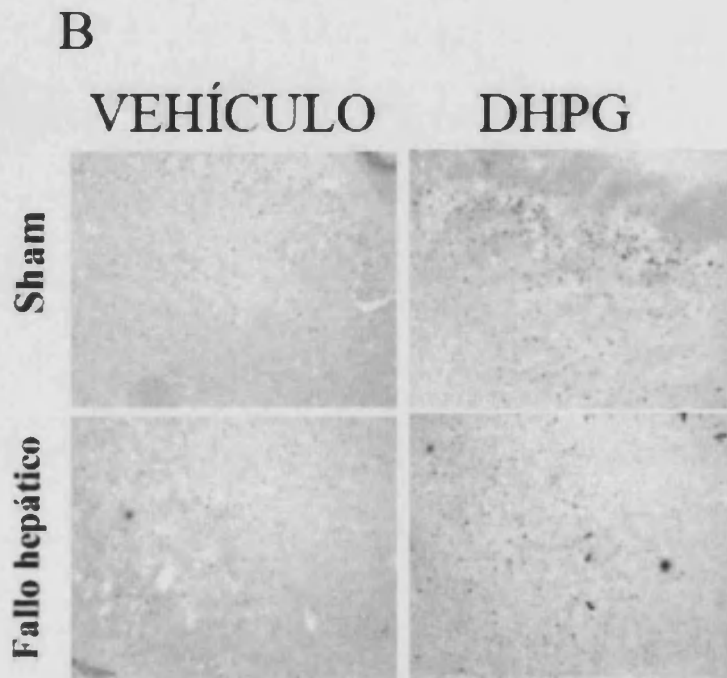
**Figura 24. El DHPG aumenta la expresión de c-Fos en el VMT solo de las ratas PCS.** Número de neuronas c-Fos positivas/mm<sup>2</sup> en el VMT dos horas después de la inyección de DHPG (30 nmol/parte) o vehículo (VEH) en el NAcc. “ \* “  $p < 0.01$ , comparando con la inyección de VEH; “a”  $p < 0.01$  comparando las ratas PCS y las SHAM.

En corteza prefrontal (mPFCx) observamos un aumento de la expresión de c-Fos en la mPFCx en los dos grupos. El número de neuronas c-Fos positivas en la mPFCx tras la inyección de vehículo en el NAcc fue similar en los dos grupos:  $52 \pm 2$  en las

ratas control y  $49 \pm 3$  en las ratas PCS. Sin embargo, como ocurre con la liberación de glutamato, también el aumento de c-Fos en la mPFCx fue significativamente mayor ( $p < 0.05$ ) en las ratas PCS ( $85 \pm 5$  núcleos c-Fos-positivos) que en las control ( $71 \pm 3$  núcleos c-Fos-positivos) (Fig. 25).







**Figura 25. El DHPG aumenta la expresión de c-Fos en la mPFCx tanto en ratas PCS como en control. (A) Número de neuronas c-Fos positivas/mm<sup>2</sup> en la mPFCx dos horas después de la inyección de DHPG (30 nmol/parte) o vehículo (VEH) en el NAcc. “ \* “ p <0.01, comparando con la inyección de VEH; “a” p <0.01 comparando las ratas PCS y las SHAM. (B) Imágenes representativas de mPFCx que muestran la activación de la proteína c-FOS.**

**Tabla 4. Resumen de expresión de c-Fos inducida por la inyección de DHPG en el núcleo accumbens de ratas control y PCS.**

| <i>Área</i>  | <i>RATAS CONTROL</i> |             | <i>RATAS PCS</i> |             |
|--------------|----------------------|-------------|------------------|-------------|
|              | <i>VEH</i>           | <i>DHPG</i> | <i>VEH</i>       | <i>DHPG</i> |
| <b>NAcc</b>  | 6±2                  | 66±7        | 8±3              | 89±12*      |
| <b>VP</b>    | 13±3                 | 36±4        | 11±4             | 15±3*       |
| <b>MDT</b>   | 52±2                 | 72±3        | 49±3             | 54±4*       |
| <b>mPFCx</b> | 52±2                 | 71±3        | 49±3             | 85±5*       |
| <b>SNr</b>   | 19±3                 | 24±3        | 44±5*            | 85±5*       |
| <b>VMT</b>   | 32±3                 | 31±3        | 29±3             | 86±5*       |

Los valores se expresan como número de neuronas c-Fos positivas/ mm<sup>2</sup>. Los valores diferentes significativamente (p<0.01) con respecto a la inyección de vehículo (VEH) se indican en rojo. “\*” p<0.01 entre PCS y control.

Estos resultados corroboran la activación diferencial de dos circuitos neuronales distintos en situación normal y en fallo hepático crónico (ratas PCS) tras la estimulación de los mGluRs en el NAcc. Dicha activación diferencial se esquematiza en las figuras 26 y 27.

Figura 26. Circuito neuronal que se activa en las ratas control tras la inyección de DHPG en el NAcc (NAcc→VP→MDT→PFCx).

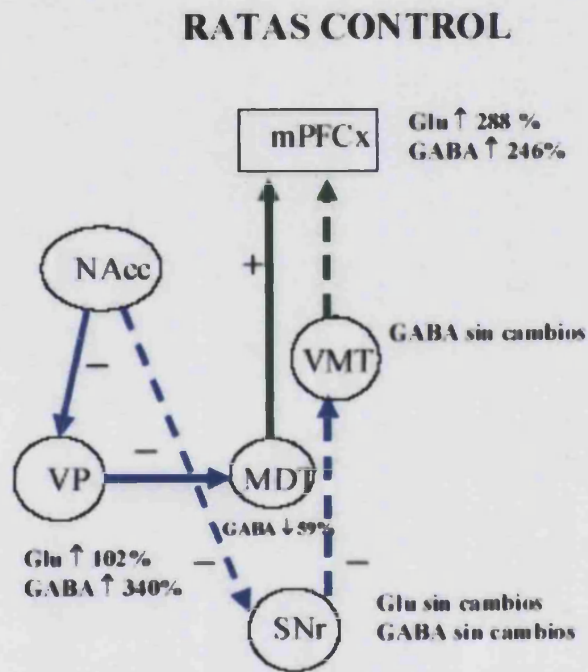
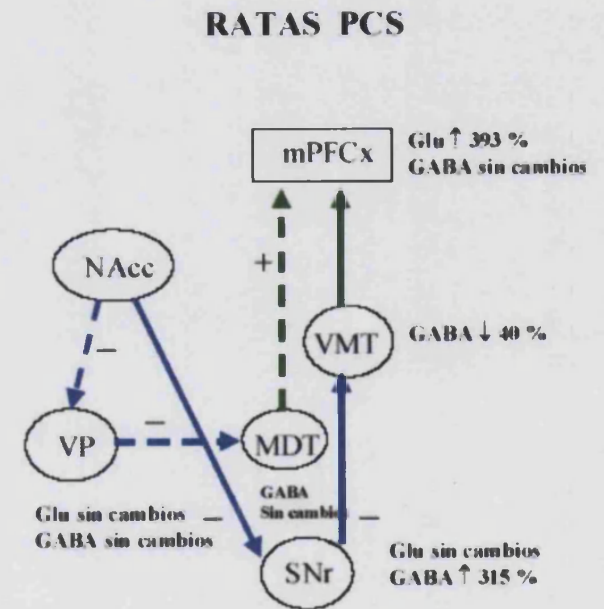


Figura 27. Circuito neuronal que se activa en las ratas PCS tras la inyección de DHPG en el NAcc (NAcc→SNr→VMT→PFCx).



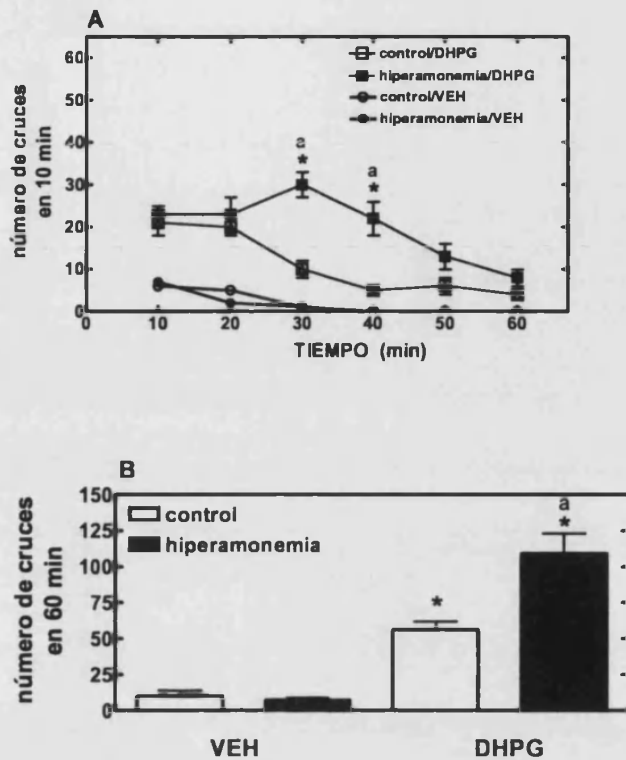
## **2. Papel de la hiperamonemia en las alteraciones motoras inducidas por DHPG en el NAcc**

Las ratas con fallo hepático crónico debido a anastomosis porta-cava (PCS) presentan hiperamonemia y otras alteraciones debidas al fallo hepático. Con el fin de discernir la contribución de la hiperamonemia a las alteraciones neuroquímicas y motoras observadas realizamos la misma serie de experimentos descritos en el apartado anterior con un modelo de hiperamonemia crónica en ratas sin fallo hepático.

### **2.1 Efectos motores inducidos por la inyección de DHPG el NAcc en ratas hiperamonémicas.**

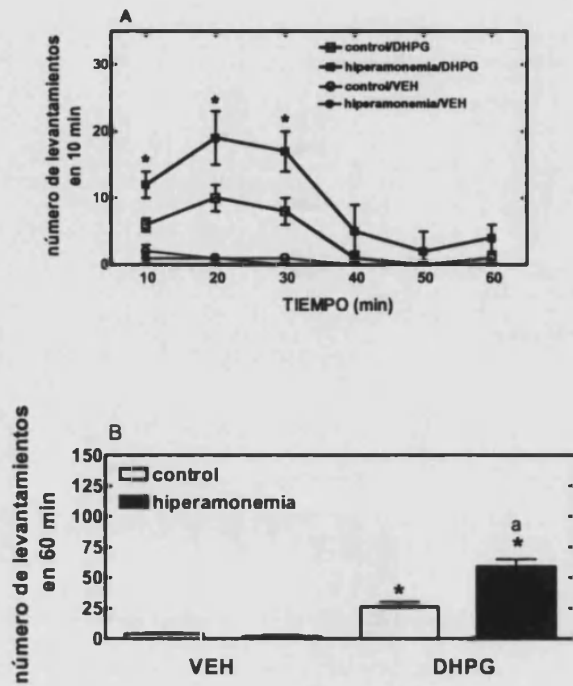
La administración en el NAcc de DHPG, (30 nmol/parte) estimula significativamente la actividad motora horizontal (expresada como número de cruces) y vertical (expresada como número de levantamientos) tanto en ratas control como hiperamonémicas (Fig. 28). En las ratas control el número de cruces en 60 minutos aumenta significativamente ( $p < 0.01$ )

alrededor de 5 veces tras la inyección de DHPG ( $56 \pm 6$  cruces) con respecto a la inyección de vehículo ( $10 \pm 4$  cruces). En ratas hiperamonémicas, el número de cruces aumenta significativamente ( $p < 0.05$ ) alrededor de 16 veces tras la inyección de DHPG ( $109 \pm 14$  cruces) con respecto a la inyección de vehículo ( $7 \pm 2$  cruces). En las ratas hiperamonémicas la activación motora tras la inyección de DHPG es significativamente ( $p < 0.05$ ) mayor que en las ratas control (Fig. 28). La diferencia es significativa entre 30 y 40 minutos (Fig. 28A).



**Figura 28. Activación motora expresada como número de cruces tras la inyección de DHPG en el NAcc.** Se inyectó bilateralmente DHPG (30 nmol/parte) o vehículo en el NAcc. “\*“  $p < 0.05$ , DHPG comparado con vehículo (VEH); “a”  $p < 0.05$  efecto del DHPG en las ratas hiperamonémicas comparado con las ratas control.

Efectos similares se observaron para la actividad vertical (número de levantamientos): el DHPG administrado en el NAcc aumenta mas la actividad vertical en las ratas hiperamonémicas ( $p < 0.05$ ) (Fig. 29 A y B).



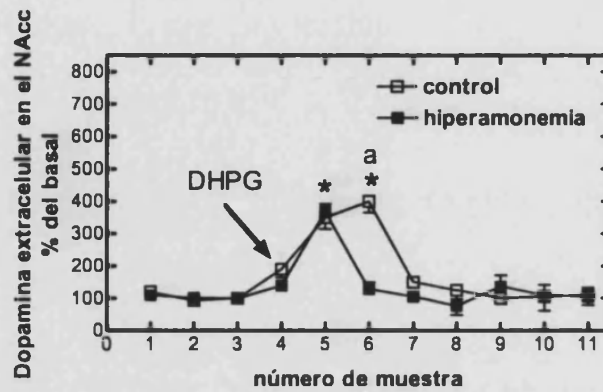
**Figura 29. Activación motora expresada como número de levantamientos tras la inyección de DHPG en el NAcc.** Se inyectó bilateralmente DHPG (30 nmol/parte) o vehículo en el NAcc. “\*”  $p < 0.05$ , DHPG comparado con vehículo (VEH); “a”  $p < 0.05$  efecto del DHPG en las ratas hiperamonémicas comparado con las ratas control.

El siguiente paso fue analizar a través experimentos de microdiálisis cerebral in vivo en ratas despiertas los circuitos neuronales implicados en las respuestas motoras inducidas por el DHPG en el NAcc.

## **2.2 Efectos de la inyección de DHPG sobre la concentración extracelular de dopamina y glutamato en el NAcc.**

La inyección bilateral (30 nmol/parte) de DHPG en el NAcc induce un aumento significativo ( $p < 0.01$ ) de dopamina (DA) extracelular en el NAcc tanto en ratas control como hiperamonémicas. En las ratas control la concentración extracelular de DA en el NAcc aumentó un  $350 \pm 36\%$  y un  $400 \pm 39\%$  en las fracciones 5 y 6. En cambio en las ratas hiperamonémicas el aumento de dopamina extracelular fue significativamente menor: aumentó solamente en la fracción 5 un  $370 \pm 22\%$  con respecto a su basal (Fig 30).

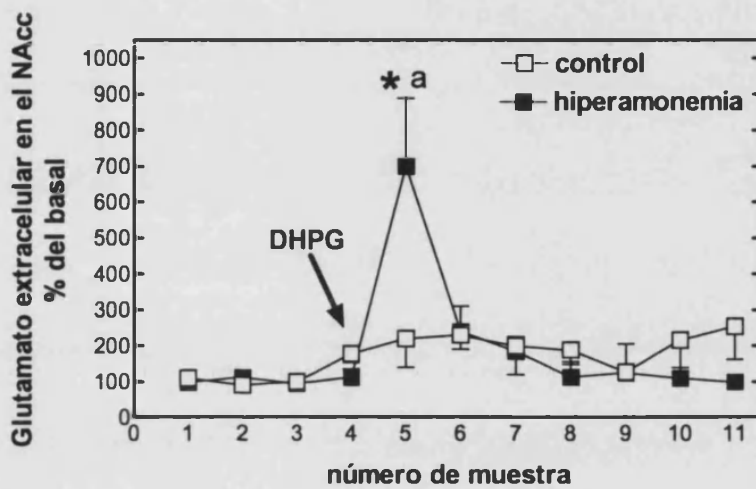




**Figura 30. Efecto de la inyección de DHPG en el NAcc sobre la concentración de dopamina extracelular en el NAcc.** Se inyectó bilateralmente DHPG (30 nmol/parte). “ \* “  $p < 0.05$ , diferencia significativa comparando con su basal; “a”  $p < 0.05$  efecto del DHPG en las ratas hiperamonémicas comparado con las ratas control.

En las ratas hiperamonémicas, la administración de DHPG induce un aumento significativo ( $p < 0.01$ ) de la concentración extracelular de glutamato en el NAcc alcanzando un  $531 \pm 144\%$  y  $591 \pm 196\%$  del basal en las fracciones 5 y 6. En cambio en las ratas control el DHPG no induce cambios en el glutamato extracelular (Fig. 31). No se observaron diferencias significativas en los niveles basales extracelulares de dopamina o de glutamato en el NAcc (dopamina:  $2.1 \pm 0.8$  nM en ratas control y  $2.1 \pm 1.1$  nM en ratas hiperamonémicas; glutamato:  $0.7$

$\pm 0.1 \mu\text{M}$  en ratas control y  $0.9 \pm 0.2 \mu\text{M}$  en ratas hiperamonémicas).



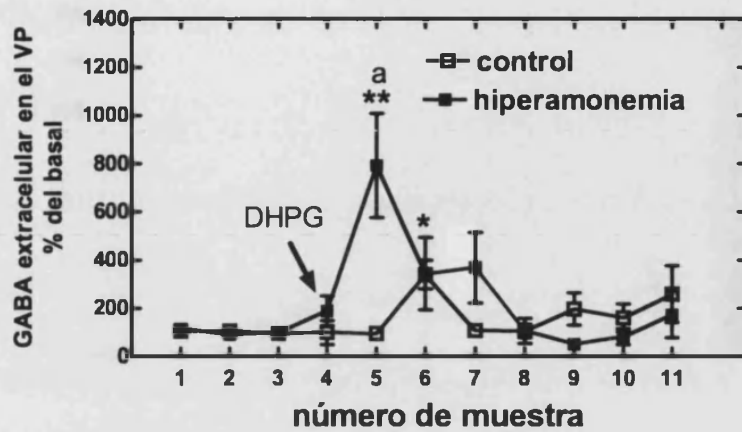
**Figura 31. Efecto de la inyección de DHPG en el NAcc sobre la concentración de glutamato extracelular en el NAcc.** Se inyectó bilateralmente DHPG (30 nmol/parte). “ \* “  $p < 0.05$ , diferencia significativa comparando con su basal; “a”  $p < 0.05$  efecto del DHPG en las ratas hiperamonémicas comparado con las ratas control.

**2.3 La administración de DHPG en el NAcc induce un aumento del GABA extracelular en el pálido ventral (VP) tanto en ratas control como hiperamonémicas.**

El siguiente paso para estudiar el circuito neuronal implicado en la estimulación motora inducida por el DHPG en el NAcc fue

inyectar DHPG en el NAcc y poner una sonda de microdiálisis en el pálido ventral (VP) (Fig. 5). En las ratas control la inyección de DHPG en el NAcc induce un aumento significativo ( $p < 0.05$ ) de la concentración extracelular de GABA en el VP, alcanzando un  $340 \pm 59\%$  del basal en la fracción 6 (Fig 32). El aumento de la concentración extracelular de GABA en el VP fue mas rápido y significativamente mayor ( $p < 0.05$ ) en las ratas hiperamonémicas que en las ratas control, alcanzando un  $793 \pm 200\%$  del basal en la fracción 5. Además, el aumento en las ratas hiperamonémicas fue mas duradero, manteniéndose en un  $344 \pm 150\%$  y  $369 \pm 137\%$  del basal en las fracciones 6 y 7 (Fig. 32).

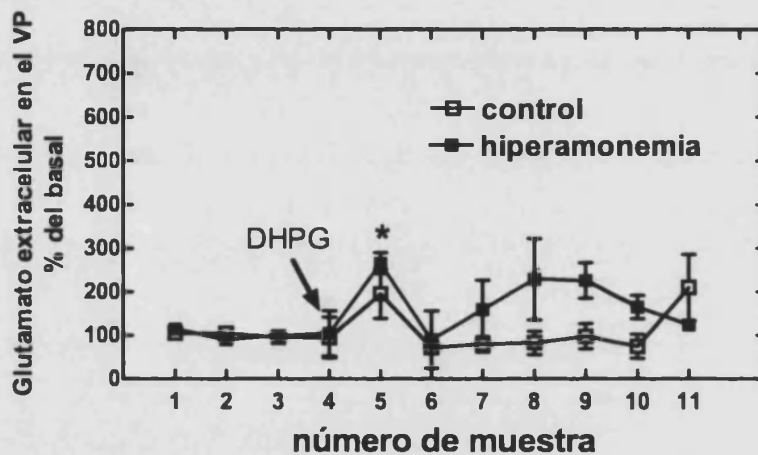
La concentración basal de GABA extracelular en el VP fue similar en las ratas control ( $2.8 \pm 0.3$  nM) y en las hiperamonémicas ( $3.0 \pm 0.5$  nM).



**Figura 32. Efecto de la inyección de DHPG en el NAcc sobre la concentración de GABA extracelular en el VP.** Se inyectó bilateralmente DHPG (30 nmol/parte). “ \* “  $p < 0.05$ , diferencia significativa comparando con su basal; “a”  $p < 0.05$  efecto del DHPG en las ratas hiperamonémicas comparado con las ratas control.

La inyección de DHPG en el NAcc aumentó significativamente ( $p < 0.05$ ) la concentración extracelular de glutamato en el VP en las ratas hiperamonémicas (un  $266 \pm 24$  % del basal) en la fracción 5, pero no en las ratas control ( $186 \pm 57\%$  del basal) (Fig. 33). La concentración basal de glutamato extracelular en el VP fue similar en ratas control ( $0.21 \pm 0.05 \mu\text{M}$ ) y en ratas hiperamonémicas ( $0.24 \pm 0.07 \mu\text{M}$ ).

La administración de DHPG en el NAcc no modificó la concentración extracelular de dopamina extracelular en el VP (datos no mostrados). La concentración basal de dopamina en el VP fue similar en los dos grupos ( $0.38 \pm 0.09$  nM en las ratas control y  $0.40 \pm 0.11$  nM en las hiperamonémicas).



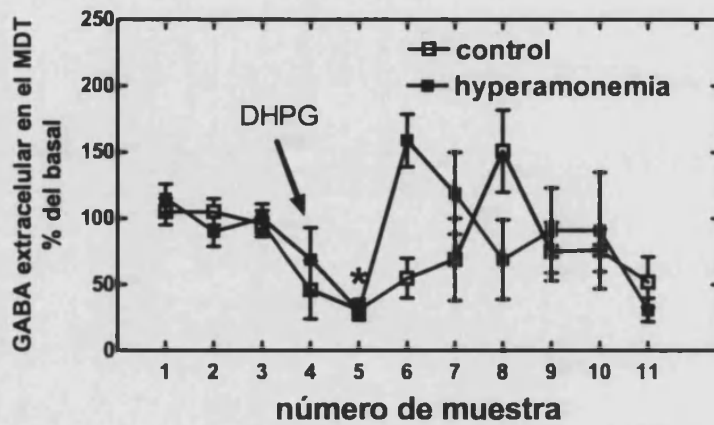
**Figura 33. Efecto de la inyección de DHPG en el NAcc sobre la concentración de glutamato extracelular en el VP. Se inyectó bilateralmente DHPG (30 nmol/parte). “ \* “  $p < 0.05$ , comparando con su basal.**

#### **2.4 La inyección de DHPG en el NAcc disminuye la concentración extracelular de GABA en el tálamo medio-dorsal tanto en ratas control como hiperamonémicas.**

El siguiente paso para estudiar el circuito neuronal implicado en la estimulación motora inducida por el DHPG fue inyectar bilateralmente DHPG en el NAcc y poner una sonda de microdiálisis en el tálamo medio-dorsal (MDT), que recibe fibras GABA-érgicas desde el VP (Fig. 5).

La inyección de DHPG en el NAcc indujo una disminución significativa ( $p < 0.01$ ) de la concentración extracelular de GABA en el MDT en la fracción 5 tanto en ratas control como en las hiperamonémicas. En las ratas control la concentración de GABA bajó hasta un  $31 \pm 8\%$  del basal y en las ratas hiperamonémicas hasta un  $30 \pm 6\%$  del basal (Fig. 34).

La concentración basal de GABA extracelular en el MDT fue similar en ratas control ( $1.7 \pm 0.3$  nM) y en ratas hiperamonémicas ( $2.1 \pm 0.3$  nM).



**Figura 34. Efecto de la inyección de DHPG en el NAcc sobre la concentración de GABA extracelular en el MDT.** Se inyectó bilateralmente DHPG (30 nmol/parte). “ \* “  $p < 0.05$ , diferencia significativa comparando con su basal; “a”  $p < 0.05$  efecto del DHPG en las ratas hiperamonémicas comparado con las ratas control.

La inyección de DHPG en el NAcc no afectó la concentración extracelular de glutamato en el MDT en las ratas control ni en las hiperamonémicas (datos no mostrados). La concentración extracelular basal de glutamato fue similar en ratas control ( $0.7 \pm 0.1 \mu\text{M}$ ) y en ratas hiperamonémicas ( $0.8 \pm 0.1 \mu\text{M}$ ).

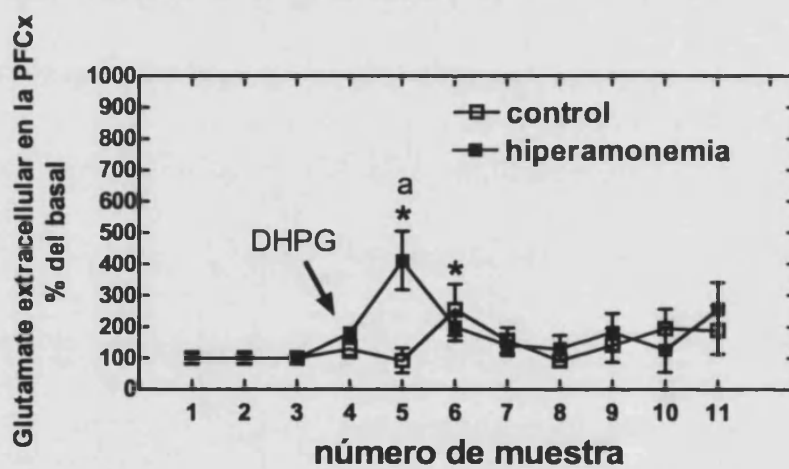
## **2.5 La administración de DHPG en el NAcc induce un aumento de glutamato extracelular en la corteza prefrontal (mPFCx) tanto en ratas control como hiperamonémicas**

El siguiente paso para estudiar el circuito neuronal implicado en la estimulación motora inducida por el DHPG fue inyectar DHPG en el NAcc y poner una sonda de microdiálisis en la corteza prefrontal medial (mPFCx) ya que esta parte de la corteza recibe fibras glutamatérgicas desde el MDT (Fig. 5). En las ratas control la inyección de DHPG (30 nmol/parte) en el NAcc induce un aumento significativo ( $p < 0.05$ ) de la concentración extracelular de glutamato en la mPFCx tanto en las ratas control como en las hiperamonémicas. El aumento fue mas rápido y mayor en las ratas hiperamonémicas que en las control (Fig. 35). En las ratas control, la concentración extracelular de glutamato aumentó significativamente ( $p < 0.05$ ) un  $255 \pm 82\%$  respecto a su basal en la fracción 6 tras la inyección de DHPG en el NAcc. En las ratas hiperamonémicas,



el glutamato extracelular aumentó un  $412 \pm 93\%$  y un  $240 \pm 33$  en las fracciones 5 y 6.

La concentración basal de glutamato extracelular en la mPFCx tiende a ser mas baja en las ratas hiperamonémicas pero la diferencia no llega a ser significativa ( $2.4 \pm 0.6 \mu\text{M}$  en ratas control y  $1.3 \pm 0.3 \mu\text{M}$  en ratas hiperamonémicas).



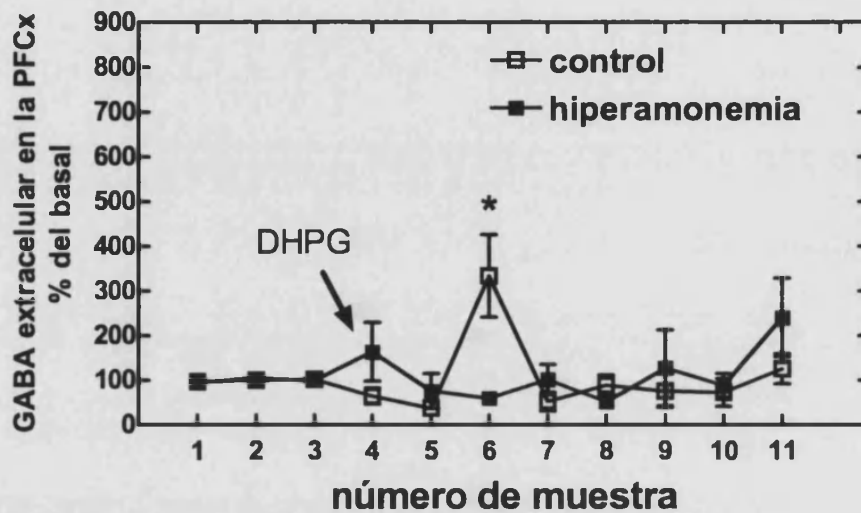
**Figura 35. Efecto de la inyección de DHPG en el NAcc sobre la concentración de glutamato extracelular en la PFCx.** Se inyectó bilateralmente DHPG (30 nmol/parte). “ \* “  $p < 0.05$ , diferencia significativa comparando con su basal; “a”  $p < 0.05$  efecto del DHPG en las ratas hiperamonémicas comparado con las ratas control.

**2.6 La administración de DHPG en el NAcc induce un aumento de la concentración de GABA extracelular en la corteza prefrontal (PFCx) en las ratas control pero no en las hiperamonémicas.**

En las ratas control la inyección de DHPG en el NAcc aumentó significativamente ( $p < 0.05$ ) la concentración extracelular de GABA en la mPFCx un  $334 \pm 92\%$  en la fracción 6 (Fig. 36).

En las ratas hiperamonémicas, como en las ratas PCS, no se observó ninguna modificación en la concentración de GABA en la mPFCx tras la inyección de DHPG en el NAcc.

La concentración basal de GABA extracelular en la mPFCx fue similar en ratas control ( $1.3 \pm 0.4 \mu\text{M}$ ) en ratas hiperamonémicas ( $0.9 \pm 0.2 \mu\text{M}$ ). La concentración basal de dopamina extracelular en la mPFCx fue similar en los dos grupos ( $0.07 \pm 0.009 \text{ nM}$  en las ratas control  $0.09 \pm 0.008 \text{ nM}$  en las ratas hiperamonémicas) y no cambió tras la inyección de DHPG en el NAcc en las ratas control ni en las hiperamonémicas.



**Figura 36. Efecto de la inyección de DHPG en el NAcc sobre la concentración de GABA extracelular en la PFCx.** Se inyectó bilateralmente DHPG (30 nmol/parte). “ \* “  $p < 0.05$ , diferencia significativa comparando con su basal; “a”  $p < 0.05$  efecto del DHPG en las ratas hiperamonémicas comparado con las ratas control.

Los resultados hasta aquí descritos reproducen parte de los datos obtenidos en los experimentos efectuados con las ratas PCS. Confirmamos que en las ratas control la inyección del agonista de los mGluRs de grupo I, DHPG, estimula las neuronas que desde el NAcc proyectan al VP determinando un aumento de la concentración de GABA en este. Este aumento de GABA en el VP, a su vez, inhibe las neuronas que del VP que proyectan al

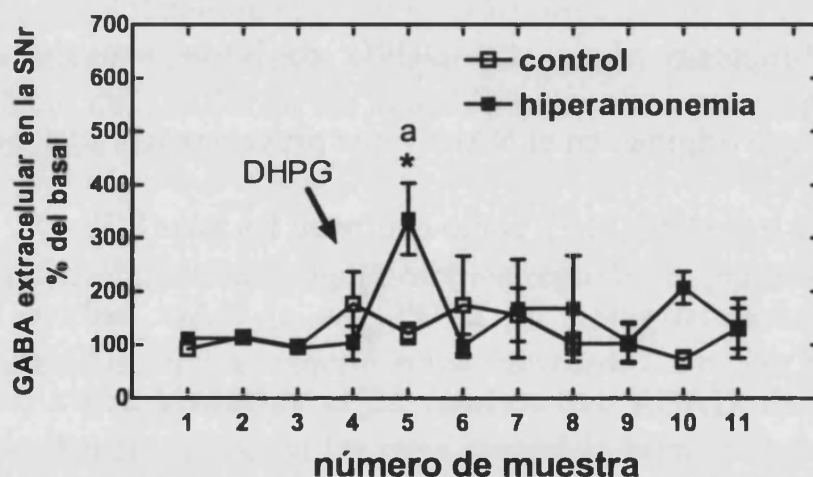
MDT induciendo una disminución del GABA en esta área talámica. La disminución del GABA en el MDT, a su vez, desinhibe las vías glutamatérgicas que desde el MDT proyectan a la mPFCx induciendo un aumento de la concentración de glutamato en ella. A diferencia de las ratas PCS, en las ratas hiperamonémicas observamos que también se activa este circuito neuronal que se activa en las ratas control tras la inyección de DHPG en el NAcc, aunque, como se comenta en la Discusión, de modo diferente. A continuación estudiamos si en las ratas hiperamonémicas el DHPG en NAcc activaba las neuronas que originan en el NAcc y que proyectan a la sustancia negra pars reticulata (SNr), como ocurre en las ratas PCS.

**2.7 La administración de DHPG en el NAcc induce un aumento de GABA extracelular en la sustancia negra pars reticulata (SNr) en las ratas hiperamonémicas pero no en las control.**

En las ratas control la inyección de DHPG en el NAcc no indujo modificaciones significativas en la concentración

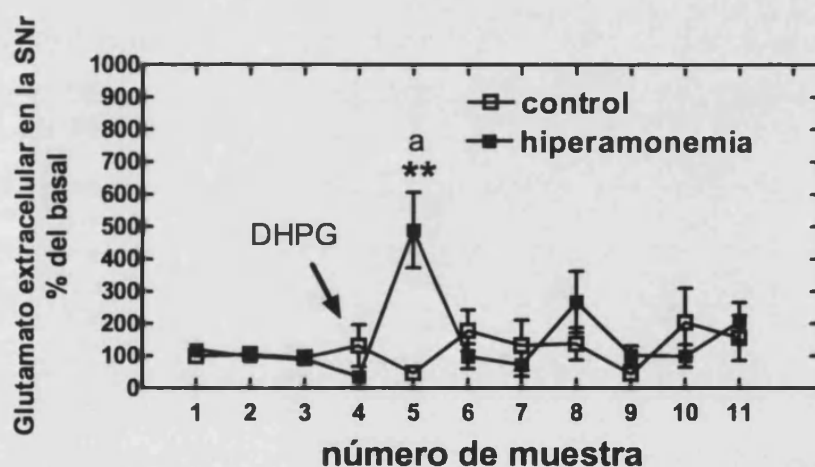
extracelular de GABA o de glutamato en la SNr. En cambio, en las ratas hiperamonémicas, la inyección de DHPG en el NAcc indujo un aumento significativo ( $p < 0.05$ ) de la concentración extracelular de GABA en la SNr, alcanzando un  $336 \pm 67\%$  del basal en la fracción 5 (Fig. 37).

La concentración basal de GABA extracelular en la SNr fue similar en los dos grupos ( $32 \pm 5$  nM en ratas control y  $28 \pm 4$  nM en ratas hiperamonémicas).



**Figura 37. Efecto de la inyección de DHPG en el NAcc sobre la concentración de GABA extracelular en la SNr.** Se inyectó bilateralmente DHPG (30 nmol/parte). “ \* “  $p < 0.05$ , diferencia significativa comparando con su basal; “a”  $p < 0.05$  efecto del DHPG en las ratas hiperamonémicas comparado con las ratas control.

La inyección de DHPG en el NAcc aumentó significativamente ( $p < 0.01$ ) también la concentración extracelular de glutamato en la SNr un  $490 \pm 100\%$  del basal en las ratas hiperamonémicas pero no en ratas control (Fig. 38). La concentración basal de glutamato extracelular en la SNr fue similar en ratas control ( $1.0 \pm 0.2 \mu\text{M}$ ) y en ratas hiperamonémicas ( $1.7 \pm 0.4 \mu\text{M}$ ).



**Figura 38. Efecto de la inyección de DHPG en el NAcc sobre la concentración de glutamato extracelular en la SNr.** Se inyectó bilateralmente DHPG (30 nmol/parte). “ \* “  $p < 0.05$ , diferencia significativa comparando con su basal; “a”  $p < 0.01$  efecto del DHPG en las ratas hiperamonémicas comparado con las ratas control

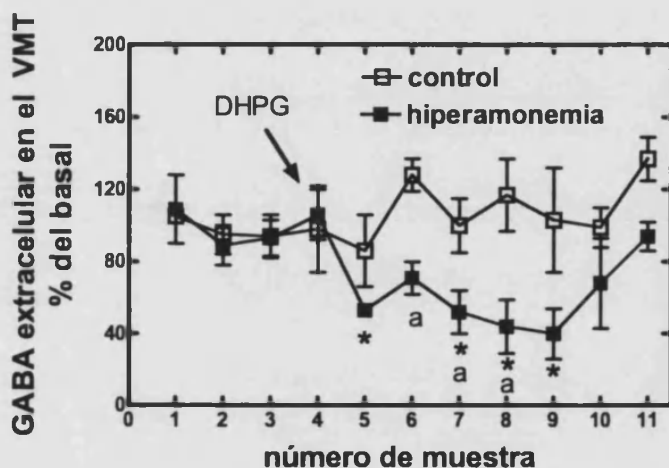
La inyección de DHPG en el NAcc no afectó los niveles de dopamina en la SNr (datos no mostrados) ni en las ratas control ni en las ratas hiperamonémicas. La concentración basal de dopamina extracelular en la SNr fue similar en ratas control ( $0.041 \pm 0.009$  nM) y en ratas hiperamonémicas ( $0.023 \pm 0.007$  nM).

**2.8 La administración de DHPG en el NAcc induce una disminución del GABA extracelular en el tálamo ventromedial (VMT) en las ratas hiperamonémicas pero no en las control.**

En las ratas control, la inyección de DHPG en el NAcc no indujo modificaciones significativas de la concentración extracelular de GABA o de glutamato en el VMT. En cambio, en las ratas hiperamonémicas la inyección de DHPG en el NAcc indujo una disminución significativa y sostenida ( $p < 0.01$ ) de la concentración extracelular de GABA en el VMT. Tras la inyección de DHPG en el NAcc los niveles de GABA en el

VMT bajaron hasta un  $53 \pm 3\%$ ,  $71 \pm 9\%$ ,  $52 \pm 2\%$ ,  $44 \pm 12\%$  and  $40 \pm 14\%$  del basal en las fracciones 5, 6, 7, 8 y 9 (Fig. 39).

La concentración basal de GABA extracelular en el VMT fue similar en los dos grupos ( $2.7 \pm 0.4$  nM en las ratas hiperamonémicas y  $1.8 \pm 0.2$  nM en las ratas control).



**Figura 39. Efecto de la inyección de DHPG en el NAcc sobre la concentración de GABA extracelular en el VMT.** Se inyectó bilateralmente DHPG (30 nmol/parte). “ \* “  $p < 0.05$ , diferencia significativa comparando con su basal; “a”  $p < 0.05$  efecto del DHPG en las ratas hiperamonémicas comparado con las ratas control.

La concentración de glutamato extracelular en el VMT no se afecta ni en ratas hiperamonémicas ni en las control tras la inyección de DHPG en el NAcc (datos no mostrados). La concentración basal de glutamato extracelular en el VMT fue



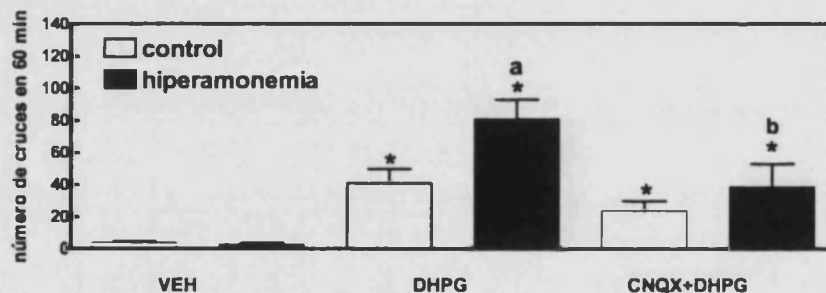
significativamente mas baja ( $p < 0.05$ ) en las ratas hiperamonémicas ( $0.10 \mu\text{M} \pm 0.02$ ) que en ratas control ( $0.30 \pm 0.08 \mu\text{M}$ ).

### **2.9 El aumento de la actividad motora inducido por DHPG en el NAcc en las ratas hiperamonémicas está mediado por el aumento de glutamato en el NAcc.**

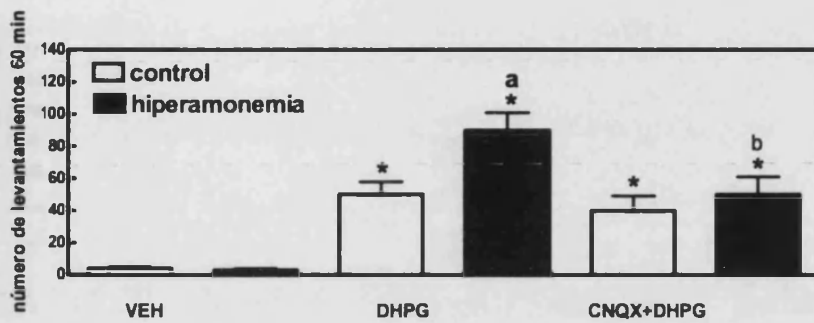
Dado que en las ratas hiperamonémicas, como en las ratas PCS, el DHPG induce un aumento de la concentración extracelular de glutamato en NAcc que no ocurre en las ratas control quisimos averiguar si el bloqueo de los receptores de glutamato de tipo AMPA, con el antagonista CNQX afectaba los efectos motores en las ratas hiperamonémicas como ocurre en las PCS. Inyectamos bilateralmente CNQX (1 nmol/parte), antagonista de los receptores AMPA, y DHPG (30 nmol/parte) en el NAcc y pusimos una sonda de microdiálisis en la SNr. La inyección de CNQX y DHPG en el NAcc indujo en las ratas control una estimulación de la actividad motora similar a la que induce el DHPG solo (Fig. 40).

En cambio, en las ratas hiperamonémicas la inyección de CNQX antagoniza parcialmente la estimulación motora inducida por el DHPG (Fig. 40) manteniéndose la actividad a niveles similares a los que se obtienen tras la inyección del DHPG en el NAcc en las ratas control. En las ratas control, el número de cruces registrados en 60 minutos (basal  $4 \pm 1$  cruces) tras la inyección de DHPG ( $30 \pm 8$ ) y tras la inyección de CNQX+DHPG ( $39 \pm 9$ ) no fueron significativamente diferentes. En las ratas hiperamonémicas (basal  $3 \pm 1$  cruces) la inyección de DHPG indujo un aumento significativo de la actividad motora ( $p < 0.01$ ) ( $62 \pm 10$  cruces en 60 min). Cuando se inyectaron las ratas con CNQX+DHPG el número de cruces se redujo ( $34 \pm 2$  en 60 minutos) significativamente ( $p < 0.01$ ) con respecto al número de cruces inducido por la inyección de DHPG solo y alcanza niveles similares a los inducidos por la inyección de DHPG en el NAcc en ratas control. El CNQX inyectado en el NAcc no indujo cambios significativos en la actividad motora ni en las ratas control ( $6 \pm 3$ ) ni en las hiperamonémicas ( $5 \pm 3$ ).

El mismo efecto se observó en el caso de la actividad vertical (expresada como número de levantamientos): el CNQX en las ratas hiperamonémicas disminuyó la actividad vertical inducida por la inyección de DHPG a niveles similares a la actividad vertical inducida por la inyección de DHPG en el NAcc en las ratas control (Fig 41).



**Figura 40. El antagonista de los receptores AMPA, CNQX, previene parcialmente los efectos motores inducidos por DHPG solo en las ratas hiperamonémicas.** Se inyectó bilateralmente en el NAcc DHPG (30 nmol/parte), vehículo (VEH) o CNQX (1 nmol/parte) mas DHPG (30 nmol/parte) y se observó la actividad motora expresada como número de cruces en 60 min. “\*”  $p < 0.05$ , comparando con la inyección de VEH; “a”  $p < 0.05$  comparando las ratas hiperamonémicas y las control; “b”  $p < 0.05$  comparando las ratas hiperamonémicas inyectadas con CNQX+DHPG y las hiperamonémicas inyectadas solo con DHPG.

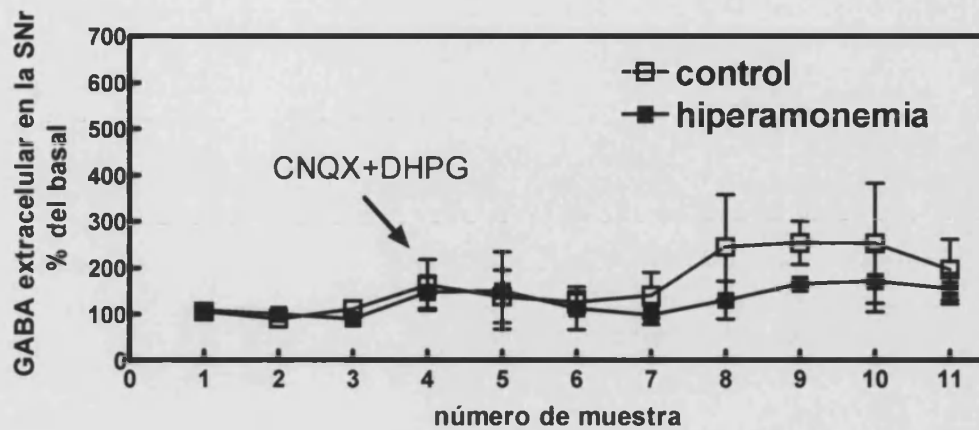


**Figura 41. El antagonista de los receptores AMPA, CNQX, previene parcialmente los efectos motores inducidos por DHPG solo en las ratas hiperamonémicas.** Se inyectó bilateralmente en el NAcc DHPG (30 nmol/parte), vehículo (VEH) o CNQX (1 nmol/parte) mas DHPG (30 nmol/parte) y se observó la actividad motora expresada como número de levantamientos en 60 min. “\*”  $p < 0.05$ , comparando con la inyección de VEH; “a”  $p < 0.05$  entre las ratas hiperamonémicas y las control; “b”  $p < 0.05$  entre las ratas hiperamonémicas inyectadas con CNQX+DHPG y las hiperamonémicas inyectadas con DHPG solo.

## **2.10 El aumento de GABA extracelular en la SNr inducido por DHPG en las ratas hiperamonémicas está mediado por el aumento de glutamato en el NAcc.**

Para ver si el aumento de glutamato en el NAcc inducido por DHPG es el responsable del aumento del GABA extracelular en la SNr inyectamos CNQX (1 nmol/parte) antagonista de los receptores AMPA, y DHPG (30 nmol/parte) en el NAcc y

pusimos una sonda de microdiálisis en la SNr en las mismas ratas en las que medimos la actividad motora al mismo tiempo que realizamos la microdiálisis. La inyección de CNQX+DHPG como la de DHPG solo no induce ningún cambio en la concentración de GABA extracelular en la SNr de las ratas control. En cambio, en las ratas hiperamonémicas, como ocurre en las PCS, el aumento de GABA extracelular en la SNr (Fig. 37) tras la inyección de DHPG en el NAcc se previene completamente por el CNQX (Fig. 42). El CNQX inyectado en el NAcc no induce ningún cambio en el GABA extracelular en la SNr ni en las ratas control ni en las hiperamonémicas (datos no mostrados).



**Figura 42.** El antagonista de los receptores AMPA, CNQX, previene el aumento del GABA extracelular en la SNr de las ratas hiperamonémicas inducido por DHPG en el NAcc. Se inyectó bilateralmente en el NAcc el CNQX (1 nmol/parte) mas DHPG (30 nmol/parte) y se midió la concentración de GABA extracelular en la SNr.

Los datos obtenidos indican que en las ratas hiperamonémicas la inyección de DHPG en el NAcc activa tanto el circuito neuronal que se activa en ratas control como el que se activa en las PCS.

Esto se resume en el esquema presentado en la Figuras 43 y 44.

## RATAS CONTROL

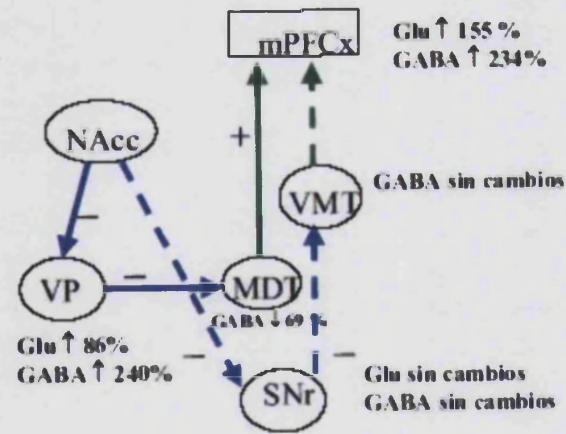


Figura 43. Circuito neuronal que se activa en las ratas control tras la inyección de DIHPG en el NAcc (NAcc→VP→MDT→PFCx).

## RATAS HIPERAMONEMICAS

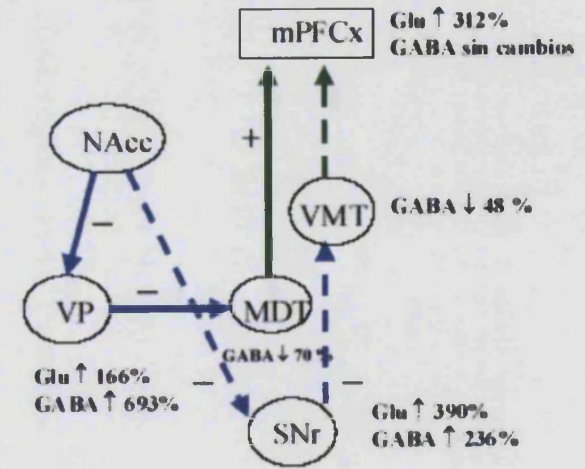


Figura 44. Circuitos neuronales que se activan en las ratas hiperamonémicas tras la inyección de DIHPG en el NAcc. Se activa tanto el circuito NAcc→SNr→VMT→PFCx como el NAcc→VP→MDT→PFCx.

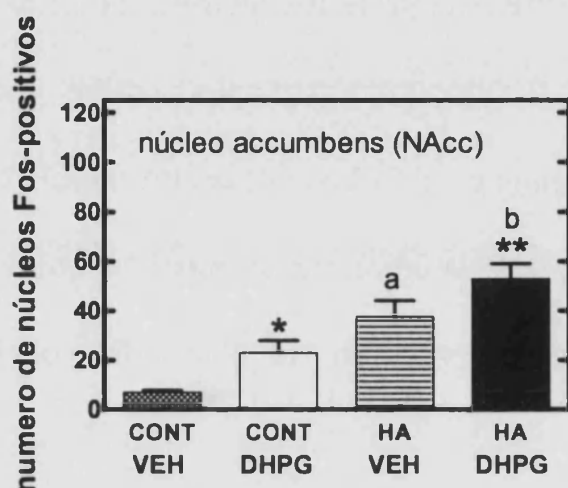
### **2.11 El aumento de la expresión de c-Fos confirma la activación de dos circuitos neuronales en ratas hiperamonémicas.**

Para corroborar que la estimulación de los mGluRs de grupo I en el NAcc activa los 2 circuitos neuronales en las ratas hiperamonémicas inyectamos en el NAcc bilateralmente DHPG o vehículo y realizamos los estudios de inmunohistoquímica para visualizar la proteína c-Fos como en el estudio con las ratas PCS.

La inyección de DHPG en el NAcc aumenta la expresión de la proteína c-Fos en el NAcc tanto en las ratas control como en las hiperamonémicas con respecto a la inyección de vehículo. La expresión de c-Fos en el NAcc en las ratas hiperamonémicas fue significativamente mayor ( $p < 0.05$ ) que en las ratas control (Fig. 45). El número de neuronas c-Fos positivas tras la inyección de vehículo en el NAcc fue  $7 \pm 2$  en las ratas control y  $37 \pm 6$  en las ratas hiperamonémicas (la diferencia fue estadísticamente significativa,  $P < 0.001$ ). Tras la inyección de



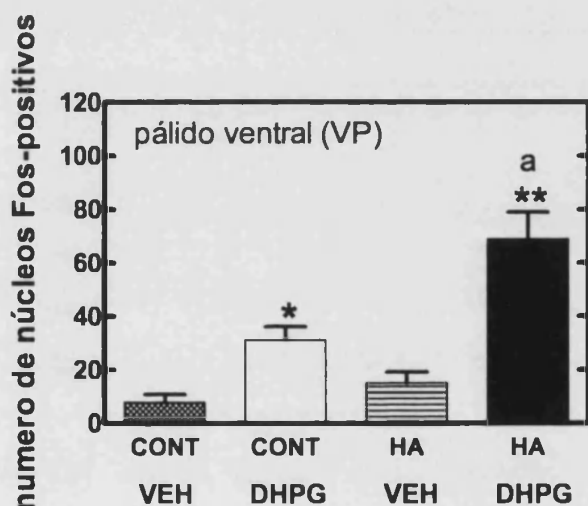
DHPG en el NAcc el número de neuronas c-fos positivas fue  $53 \pm 6$  en el NAcc de las ratas hiperamonémicas y  $23 \pm 5$  en las ratas control ( $p < 0.05$ ).



**Figura 45. El DHPG aumenta la expresión de c-Fos en el NAcc.** Número de neuronas c-Fos positivas/mm<sup>2</sup> en el NAcc dos horas después de la inyección de DHPG (30 nmol/parte) o vehículo (VEH) en el NAcc. “\*”  $p < 0.05$ , comparando con la inyección de VEH; “a”  $p < 0.05$  entre las ratas hiperamonémicas y las control.

En perfecto acuerdo con los datos neuroquímicos obtenidos por microdiálisis cerebral in vivo, la inyección de DHPG en el NAcc induce un aumento de la expresión de c-Fos ( $p < 0.001$ ) en el pálido ventral (VP) tanto de las ratas control como de las ratas

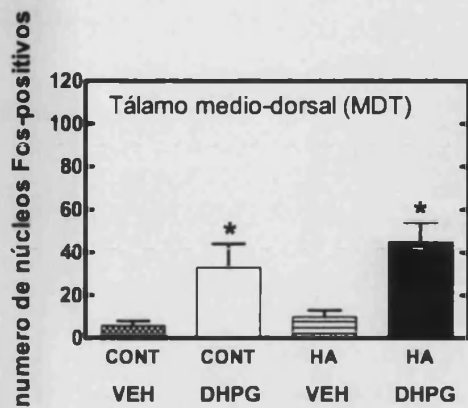
hiperamonémicas (Fig. 46). Tras la inyección de DHPG en el NAcc el número de neuronas c-Fos positivas en el VP fue  $69 \pm 10$  de las ratas hiperamonémicas y  $31 \pm 5$  en las ratas control ( $p < 0.05$ ). El número de neuronas c-Fos positivas en el VP tras la inyección de vehículo en el NAcc fue  $8 \pm 3$  en las ratas control y  $15 \pm 4$  en las ratas hiperamonémicas. La diferencia no fue estadísticamente significativa (Fig. 46).



**Figura 46. El DHPG aumenta la expresión de c-Fos en el VP.** Número de neuronas c-Fos positivas/mm<sup>2</sup> en el VP dos horas después de la inyección de DHPG (30 nmol/parte) o vehículo (VEH) en el NAcc. “\*”  $p < 0.05$ , “\*\*”  $p < 0.01$ , comparando con la inyección de VEH; “a”  $p < 0.01$  entre las ratas hiperamonémicas y las control.

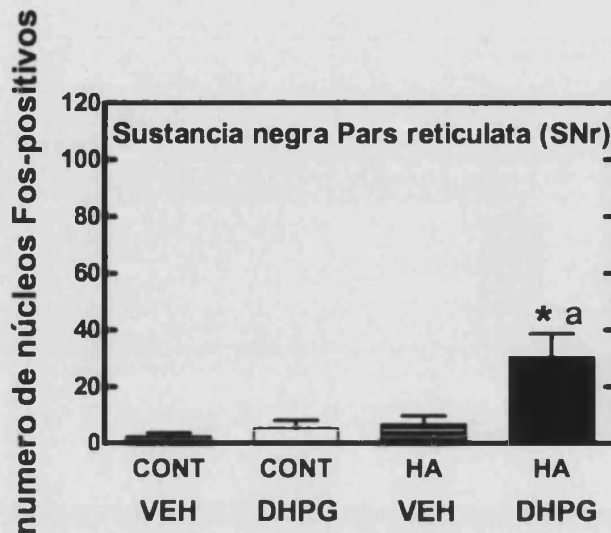
Asimismo observamos un aumento significativo ( $p < 0.05$ ) de la expresión de c-fos en el tálamo medio-dorsal (MDT) en de las ratas control como en las hiperamonémicas.

Tras la inyección de vehículo en el NAcc, la expresión de c-Fos en el MDT fue similar en los dos grupos ( $6 \pm 2$  neuronas c-Fos positivas en las ratas control y  $10 \pm 3$  en las ratas hiperamonémicas) (Fig. 47). El número de neuronas c-Fos positivas tras la inyección de DHPG fue  $33 \pm 11$  en el MDT de las ratas control y  $45 \pm 9$  en el de las ratas hiperamonémicas. La diferencia no fue estadísticamente significativa (Fig. 47).



**Figura 47. El DHPG aumenta la expresión de c-Fos en el MDT.** Número de neuronas c-Fos positivas/mm<sup>2</sup> en el VP dos horas después de la inyección de DHPG (30 nmol/parte) o vehículo (VEH) en el NAcc. “\*” p < 0.05.

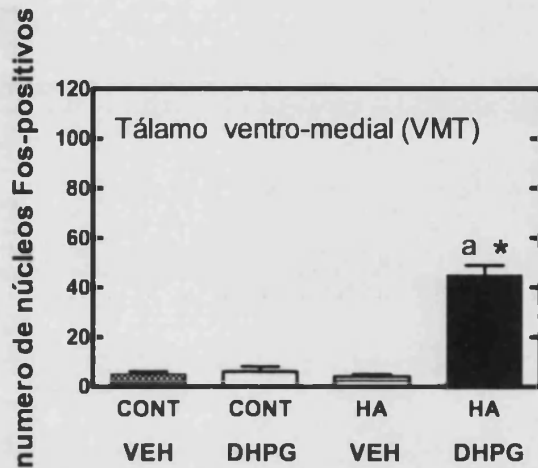
Los datos del estudio de inmunohistoquímica de c-fos corroboran que en las ratas hiperamonémicas también se activa el otro circuito neuronal, NAcc→SNr→VMT→PFCx que se activa en las ratas PCS. La inyección de DHPG aumentó significativamente ( $p < 0.01$ ) el número de neuronas c-Fos positivas en la sustancia negra pars reticulata (SNr) en las ratas hiperamonémicas pero no en las control (Fig. 48). El número de neuronas c-Fos positivas en la SNr tras la inyección de DHPG en el NAcc fue  $7 \pm 3$  en las ratas control y  $31 \pm 8$  en las ratas hiperamonémicas ( $p < 0.01$ ) (Fig. 48).



**Figura 48. El DHPG aumenta la expresión de c-Fos en la SNr solo de las ratas hiperamonémicas.** Número de neuronas c-Fos positivas/mm<sup>2</sup> en la SNr dos horas después de la inyección de DHPG (30 nmol/parte) o vehículo (VEH) en el NAcc. “\*” p <0.05, comparando con la inyección de VEH; “a” p <0.05 entre las ratas hiperamonémicas y las control.

Tras la inyección de DHPG en el NAcc aumentó la expresión del c-Fos en el tálamo ventro-medial (VMT) en las ratas hiperamonémicas pero no en las ratas control (Fig. 49). Tras la inyección del vehículo en el NAcc, la expresión de c-Fos en el VMT fue similar en los dos grupos ( $5 \pm 1$  neuronas c-Fos positivas en las ratas control y  $4 \pm 1$  en las ratas hiperamonémicas). Tras la inyección de DHPG en el NAcc el

número de neuronas c-Fos positivas en el VMT fue  $12 \pm 3$  en las ratas control y  $45 \pm 4$  en las ratas hiperamonémicas ( $p < 0.05$ ) (Fig.49).

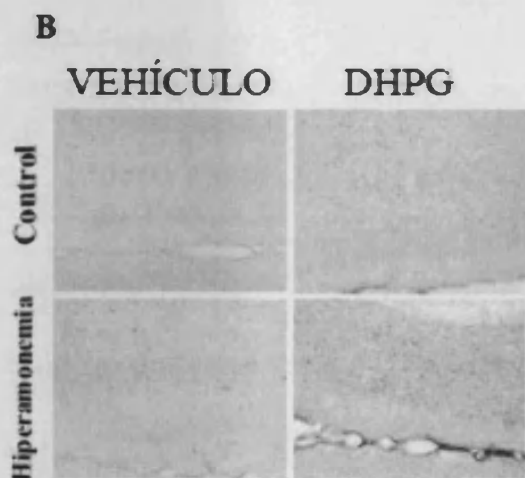
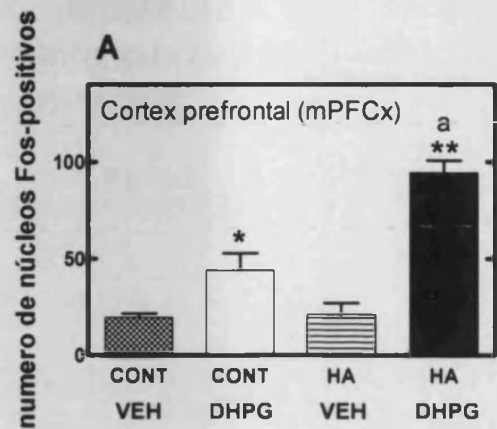


**Figura 49. El DHPG aumenta la expresión de c-Fos en el VMT solo de las ratas hiperamonémicas.** Número de neuronas c-Fos positivas/mm<sup>2</sup> en el VMT dos horas después de la inyección de DHPG (30 nmol/parte) o vehículo (VEH) en el NAcc. “\*”  $p < 0.01$ , comparando con la inyección de VEH; “a”  $p < 0.01$  entre las ratas hiperamonémicas y las control.

De acuerdo con los datos de microdiálisis en corteza prefrontal (mPFCx) donde aumenta el glutamato tras inyectar DHPG en el NAcc, observamos un aumento significativo ( $p < 0.05$ ) de la expresión de c-Fos en la mPFCx en los dos grupos. La expresión de c-Fos en la mPFCx tras la inyección de vehículo en el NAcc

fue similar en los dos grupos ( $20 \pm 2$  neuronas c-Fos positivas en la mPFCx de las ratas control y  $21 \pm 6$  en la mPFCx de las ratas hiperamonémicas).

Como ocurre con el aumento de glutamato también en las ratas hiperamonémicas el aumento de c-Fos en la mPFCx fue significativamente ( $p < 0.001$ ) mayor ( $94 \pm 7$  neuronas c-Fos positivas) que en las ratas control ( $44 \pm 9$ ) (Fig. 50).



**Figura 50. El DHPG aumenta la expresión de c-Fos en la mPFCx tanto en las ratas hiperamonémicas como en las control. (A) Número de neuronas c-Fos positivas/mm<sup>2</sup> en la mPFCx dos horas después de la inyección de DHPG (30 nmol/parte) o vehículo (VEH) en el NAcc. “\*” p <0.05, “\*\*” p <0.01 comparando con la inyección de VEH; “a” p <0.01 entre las ratas hiperamonémicas y las control. (B) Imágenes representativas de mPFCx que muestran la activación de la proteína c-FOS.**



**Tabla 5. Resumen de expresión de c-Fos inducida por la inyección de DHPG en el núcleo accumbens de ratas control y hiperamonémicas.**

| <i>Área</i>  | <i>RATAS CONTROL</i> |             | <i>RATAS</i> |             |
|--------------|----------------------|-------------|--------------|-------------|
|              | <i>VEH</i>           | <i>DHPG</i> | <i>VEH</i>   | <i>DHPG</i> |
| <b>NAcc</b>  | 7±2                  | 23±5        | 37±6*        | 53±6*       |
| <b>VP</b>    | 8±3                  | 31±5        | 15±4         | 69±10*      |
| <b>MDT</b>   | 6±2                  | 33±11       | 10±3         | 45±9*       |
| <b>mPFCx</b> | 20±2                 | 44±9        | 21±6         | 94±7*       |
| <b>SNr</b>   | 5±3                  | 7±3         | 8±3          | 31±8*       |
| <b>VMT</b>   | 5±1                  | 12±3        | 4±1          | 45±4*       |

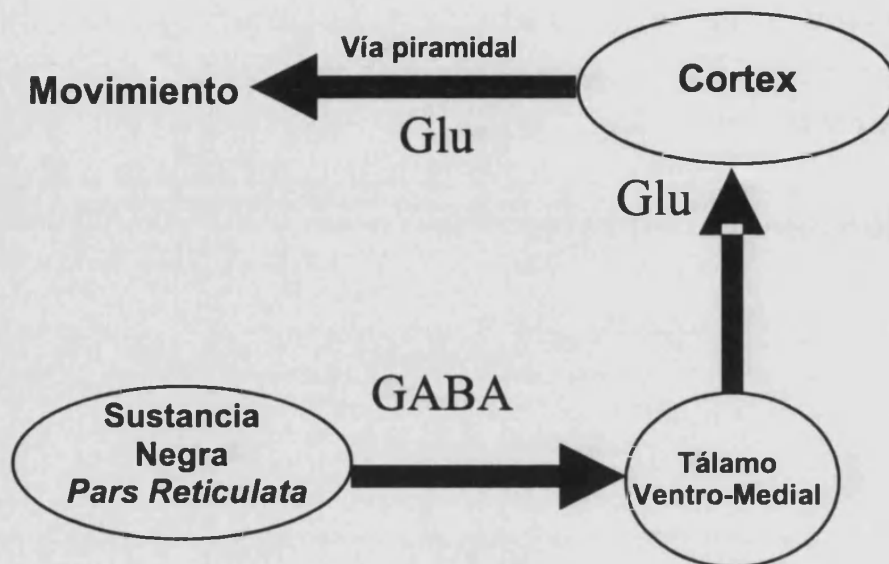
Los valores se expresan como número de neuronas c-Fos positivas/ mm<sup>2</sup>. Los valores diferentes significativamente (p<0.01) con respecto a la inyección de vehículo (VEH) se indican en rojo. “\*” p<0.01 entre hiperamonémicas y control.

Estos datos corroboran que en las ratas hiperamonémicas sin fallo hepático a diferencia de las ratas con fallo hepático crónico (ratas PCS) si que se activa la vía neuronal que se activa en las ratas control: NAcc→VP→MDT→PFCx tras la inyección de DHPG en el NAcc. Además, en las ratas hiperamonémicas, el DHPG en el NAcc activa el circuito neuronal NAcc→SNr→VMT→PFCx. Esto explicaría el mayor aumento de actividad motora inducida por el DHPG en las ratas hiperamonémicas que en las control.

### **3. Papel del glutamato extracelular y de la activación de los mGluRs en SNr en la hipolocomoción en ratas PCS.**

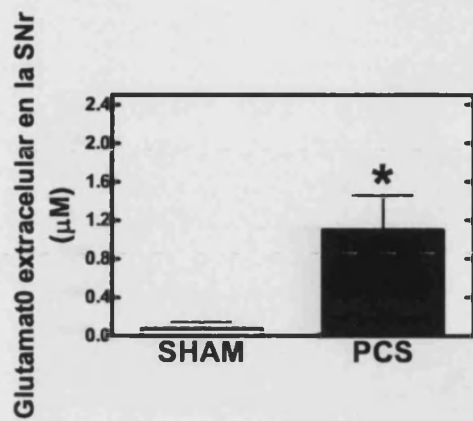
El GABA y el glutamato que se liberan en la SNr regulan la actividad de las neuronas GABA-érgicas que proyectan al tálamo (Fig. 51). Un aumento del GABA extracelular y/o una disminución del glutamato extracelular disminuyen la actividad de las neuronas del SNr que liberan GABA en el tálamo conduciendo a una estimulación de la actividad motora. Una disminución de la concentración de GABA y/o un aumento del glutamato en la SNr conduce en cambio a una inhibición de la actividad motora espontánea.

La concentración extracelular de glutamato en la SNr está significativamente aumentada (15-veces) en las ratas con anastomosis porta-cava (PCS). En las ratas control (SHAM) la concentración extracelular de glutamato fue  $74 \pm 3$  nM mientras la de las ratas PCS aumenta drásticamente ( $p < 0.05$ ) a  $1100 \pm 300$  nM (Fig. 52, ver página 151).



**Fig.51.** Esquema del circuito neuronal que regula la actividad motora a partir de la sustancia negra *pars reticulata*.

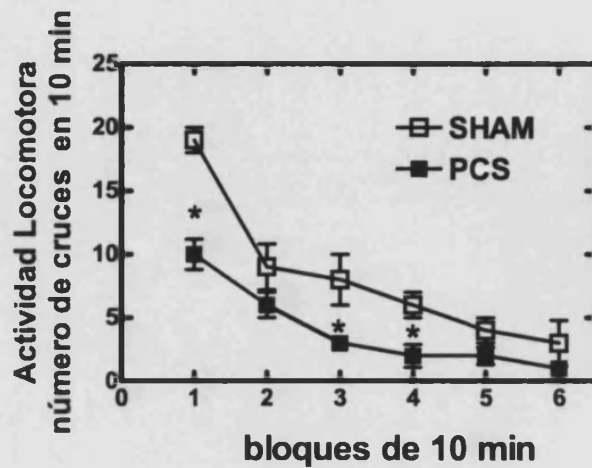
La concentración extracelular de GABA en la SNr fue similar en los dos grupos:  $2.0 \pm 0.3$  nM en las ratas control y  $2.2 \pm 04$  nM en las PCS .



**Figura 52. El glutamato extracelular en la SNr está muy aumentado en las ratas PCS. “\*” p < 0.05.**

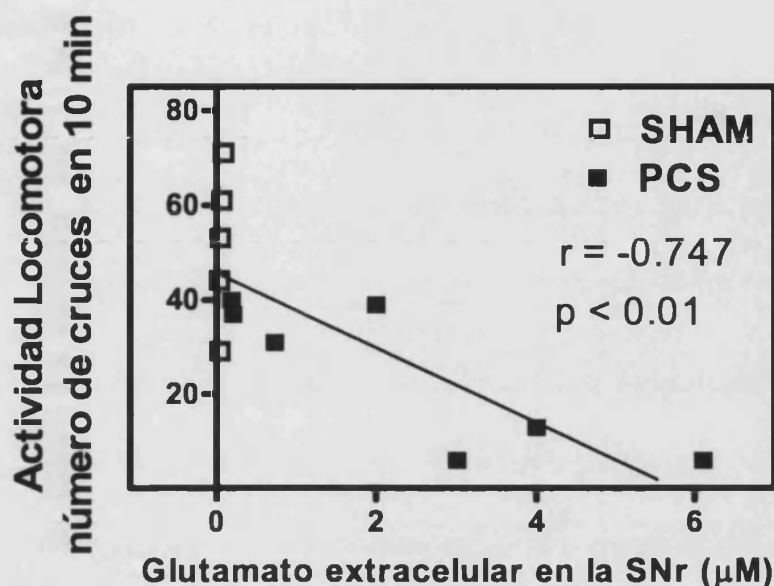
La actividad motora espontánea fue significativamente ( $p < 0.05$ ) menor en las ratas PCS con respecto a las control (Fig. 53). El número de cruces en 1 hora fue  $45 \pm 6$  en las ratas control y  $27 \pm 4$  en las ratas PCS.

Para ver si los cambios en la concentración extracelular de glutamato en la SNr podrían estar implicados en la hipolocomoción en las ratas PCS analizamos si existe una correlación entre la concentración de glutamato extracelular en la SNr y la actividad motora (número de cruces).



**Figura 53. Actividad motora espontánea expresada como número de cruces en las ratas PCS.** Número de cruces en bloques de 10 minutos cada uno durante 60 minutos “\*”  $p < 0.05$  entre ratas PCS y SHAM.

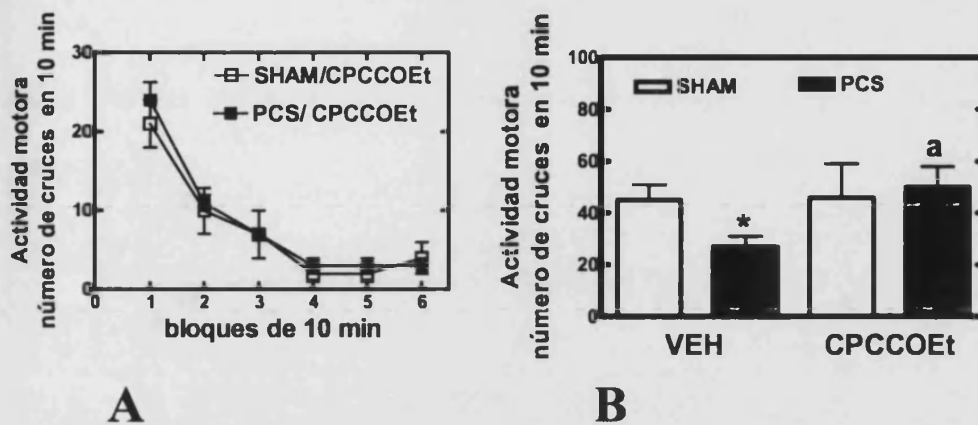
Como se muestra en la Fig. 54 efectivamente existe una correlación significativa negativa ( $p < 0.01$ ;  $r = -0.74$ ) entre la actividad motora y la concentración extracelular de glutamato en la SNr. Las ratas que tenían una mayor concentración de glutamato eran las que tenían menos número de cruces, sugiriendo que el aumento de glutamato podría ser el responsable de la hipoquinesia presente en las ratas PCS (Fig. 54).



**Figura 54. Correlación entre la concentración de glutamato extracelular en la SNr y la actividad motora.** La actividad motora espontánea se expresa como número de cruces cada 10 minutos durante 1 hora. La concentración de glutamato extracelular se midió para cada rata en muestras de microdiálisis cerebral tomadas al mismo tiempo que se medía la actividad motora. Los valores corresponden a 5 ratas control y 7 PCS. El análisis de regresión lineal muestra una correlación inversa significativa ( $r = -0.747$ ,  $p < 0.01$ ).

Teniendo en cuenta que en las ratas PCS la modulación de la actividad motora por los mGluRs 1 en NAcc está alterada, estudiamos si una sobre-estimulación de los mGluRs 1 por la mayor concentración extracelular de glutamato en la SNr era responsable de la hipoquinesia de las ratas PCS. Si esto fuera

así, el bloqueo de los receptores mGlu en SNr revertiría la hipoquinesia. Estudiamos los efectos sobre la actividad motora inducidos por la inyección bilateral del antagonista de los mGluR 1, CPCCOEt (10 nmol/parte) en la SNr. En las ratas control el bloqueo de los mGluR 1 en la SNr no afectó la actividad motora ( $46 \pm 13$  cruces en 1 hora) con respecto a la inyección de vehículo ( $45 \pm 6$  cruces en 1 hora). En las ratas PCS en cambio, la administración de CPCCOEt en la SNr estimuló significativamente ( $p < 0.05$ ) la actividad motora ( $50 \pm 8$  cruces en 1 hora) con respecto a la inyección de vehículo ( $27 \pm 4$  cruces en 1 hora). Tras la inyección de CPCCOEt, el número de cruces efectuados por las ratas control y las PCS fue similar (Fig. 55A y 55B). Estos resultados indican que el bloqueo de los mGluRs 1 no tiene efectos motores en las ratas control pero aumenta significativamente ( $p < 0.05$ ) un 85 % la actividad motora en las ratas con fallo hepático.

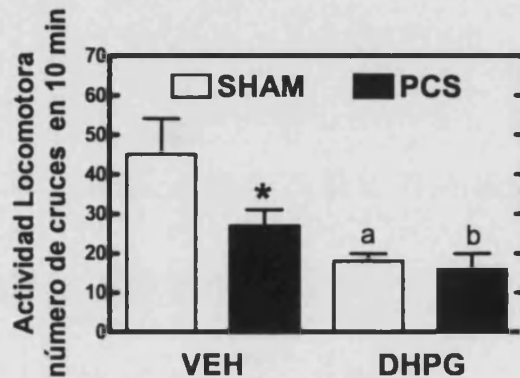


**Figura 55.** La administración del antagonista de los receptores mGluR 1, CPCCOEt en la SNr restaura la actividad motora de las ratas PCS. (A) muestra el número de cruces en bloques de 10 min durante 1 hora tras la administración bilateral de CPCCOEt (10 nmol/parte) en la SNr. (B) muestra el número total de cruces registrados en 1 hora tras la administración de CPCCOEt (10 nmol/parte) o vehículo (VEH) en la SNr. “\*”  $p < 0.05$ , entre ratas PCS y SHAM tras la administración de VEH; “a”  $p < 0.05$  entre actividad motora tras la inyección de CPCCOEt y la de VEH.

Estos resultados apoyan la idea de que una activación excesiva de los mGluRs en la SNr debida al aumento de la concentración extracelular de glutamato es responsable de la hipolocomoción de las ratas PCS. Con el fin de corroborar esta idea estudiamos si la estimulación de los mGluRs en la SNr con DHPG (10 nmol/parte) induce hipoquinesia. La inyección de DHPG en la SNr indujo una disminución significativa ( $p < 0.05$ ) de la



actividad motora tanto en las ratas control como en las ratas PCS. La actividad motora tras la inyección de DHPG fue similar en los dos grupos (Fig. 56).

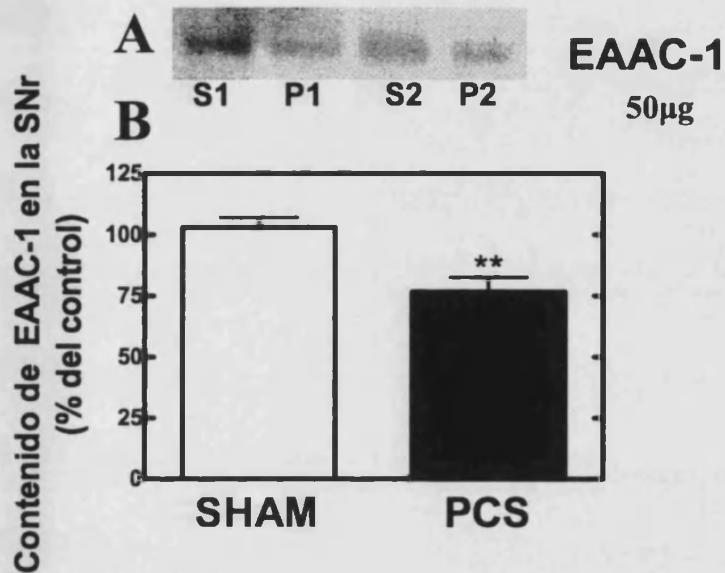


**Figura 56. La administración de DHPG en la SNr disminuye la actividad motora.**

Número de cruces registrados en 1 hora tras la administración de DHPG (10 nmol/parte), o vehículo (VEH) en la SNr. “\*”  $p < 0.05$ , entre ratas PCS y las SHAM tras la administración de VEH; “a”  $p < 0.05$  entre actividad motora tras la inyección de CPCCOEt y la de VEH en ratas SHAM; “b”  $p < 0.05$  entre actividad motora tras la inyección de CPCCOEt y la de VEH en ratas PCS.

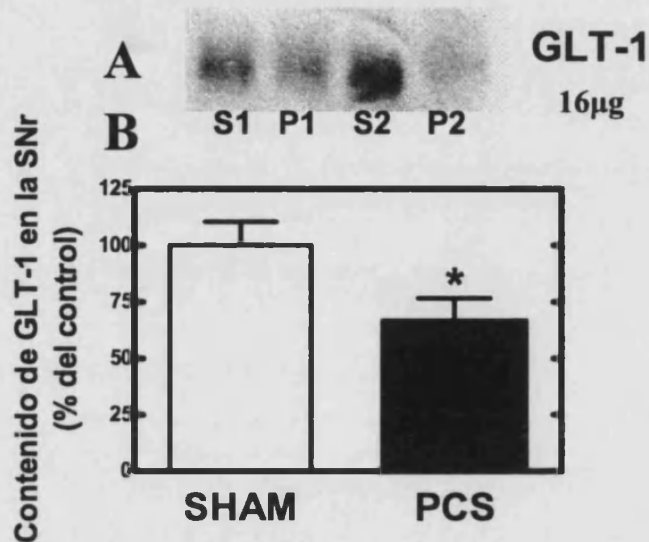
Para intentar esclarecer las posibles causas del aumento de glutamato extracelular en la SNr de las ratas PCS, estudiamos por inmunoblotting el contenido de los transportadores neuronal (EAAC1) y glial (GLT-1) en la SNr.

El contenido del transportador EAAC-1 disminuye (un 21%) significativamente ( $p < 0.01$ ) en las SNr de las ratas PCS con respecto a las ratas control (Fig.57).



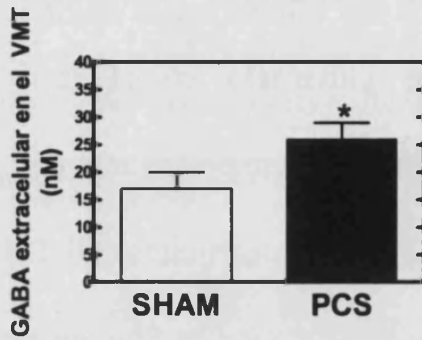
**Figura 57. El contenido del transportador neuronal de glutamato EAAC-1 está disminuido en la SNr de las ratas PCS.** Se sacrificaron ratas control y ratas PCS y se aislaron rápidamente las SNr. Se analizó el contenido de EAAC-1 (A, B) por “immunoblotting” como se describe en la sección Métodos. Se muestran “immunoblottings” representativos de 2 ratas control (SHAM) (S1-S2) y 2 ratas PCS (P1-P2) (A). Se capturaron las imágenes y se cuantificó la intensidad de las bandas correspondientes (B) y se expresaron los datos de las ratas PCS como porcentaje del control. Los valores representan la media  $\pm$  error standard de 6 ratas por cada grupo. \*  $p < 0.05$ , entre las ratas PCS y las control.

También el contenido del transportador glial GLT-1 disminuye (un 27%) significativamente ( $p < 0.05$ ) en la SNr de las ratas PCS (Fig.58).



**Figura 58. El contenido del transportador glial de glutamato, GLT-1, está disminuido en la SNr de las ratas PCS.** Se sacrificaron ratas control y ratas PCS y se aislaron rápidamente las SNr. Se analizó el contenido de GLT-1 (A, B) por “inmunoblotting” como se describe en la sección Métodos. Se muestran “inmunoblottings” representativos de 2 ratas control (SHAM) (S1-S2) y 2 ratas PCS (P1-P2) (A). Se capturaron las imágenes y se cuantificó la intensidad de las bandas correspondientes (B) y se expresaron los datos de las ratas PCS como porcentaje del control. Los valores representan la media  $\pm$  error standard de 7 ratas por cada grupo. \*  $p < 0.05$ , entre las ratas PCS y las control.

Estos resultados sugieren que un factor que contribuye al aumento de la concentración de glutamato en el espacio extracelular de la SNr es que hay menos transportadores que lo transporten a las neuronas (EAAC-1) o a los astrocitos (GLT-1). El aumento de la activación de los mGluRs en la SNr en ratas PCS en condiciones basales debería inducir un aumento de la actividad de las neuronas de la SNr que proyectan al tálamo con consecuente aumento de los niveles extracelulares de GABA en el VMT. Este efecto debería prevenirse con antagonistas y reproducirse con agonistas de los mGluRs. Para ver si esto ocurre realmente colocamos dos cánulas en la SNr y una sonda de microdiálisis en el VMT. La concentración extracelular de GABA en VMT fue significativamente ( $p < 0.05$ ) mas alta (un 53%) en el VMT de las ratas PCS. La concentración de GABA fue  $17 \pm 3$  nM en el de VMT de las ratas control y  $26 \pm 3$  nM en el de las ratas PCS (Fig. 59).



**Figura 59.** El GABA extracelular en el VMT está significativamente aumentado en las ratas PCS. “\*”  $p < 0.05$ .

Para determinar si el aumento del GABA en el VMT de las ratas PCS es consecuencia de una mayor activación de los mGluR 1 en la SNr, estudiamos si bloqueando los mGluR 1 con el antagonista CPCCOEt (10 nmol/parte) se normalizan los niveles extracelular de GABA en el VMT de las ratas PCS y si se restaura la actividad motora. Como muestra la Fig. 60, el bloqueo de los mGluR 1 en la SNr disminuyó la concentración extracelular de GABA en VMT de las ratas PCS a niveles similares a los de las ratas control (Fig. 60, de 100 a 140 min). La inyección de CPCCOEt en la SNr de las ratas control no induce cambios significativos en la concentración extracelular de GABA en el VMT (Fig 58). Una vez que el efecto del

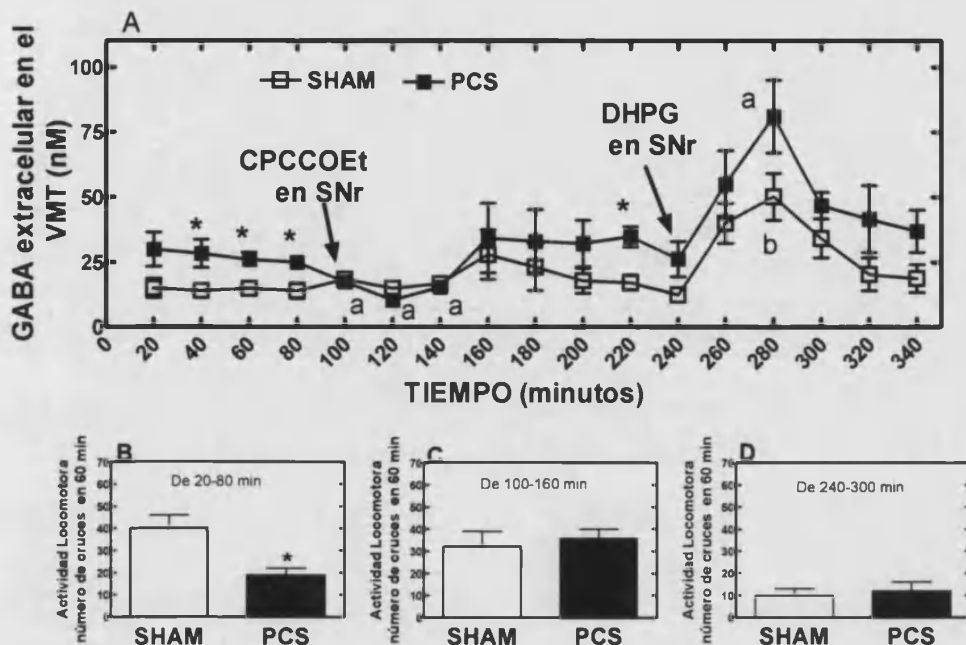
antagonista CPCCOEt se pierde la concentración extracelular de GABA en el VMT de las ratas PCS vuelve aumentar a los niveles basales (véase min 220 en la Fig. 60).

Para corroborar los resultados de que la activación de los mGluRs 1 en la SNr aumenta el GABA en el VMT inyectamos el agonista DHPG (10 nmol/parte) en la SNr. La activación de los mGluRs en la SNr aumenta la concentración extracelular de GABA en los dos grupos experimentales (Fig. 60, a partir de 240 min.).

La actividad motora basal (entre el minuto 20 y 80 min de la Fig. 60B) fue  $27 \pm 4$  cruces en las ratas PCS y  $45 \pm 6$  cruces en las ratas control ( $p < 0.05$ ). La inyección de CPCCOEt en la SNr no afectó la actividad motora en las ratas control (Fig. 60C entre el minuto 100 y 160,  $46 \pm 13$  cruces), pero aumentó significativamente ( $p < 0.05$ ) la actividad motora en las ratas PCS ( $50 \pm 8$  cruces).

La inyección del agonista DHPG en la SNr indujo hipoactividad tanto en las ratas control como en las PCS. El número de cruces

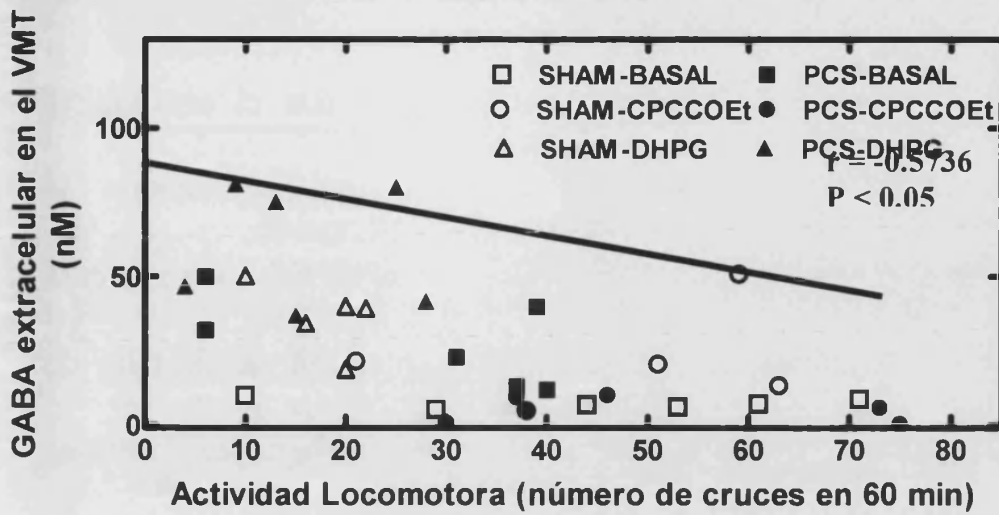
efectuados en 1 hora (Fig. 60 D) fue similar: en las ratas control ( $18 \pm 2$ ) y en las ratas PCS ( $16 \pm 4$ ). Tanto en las ratas control como en las PCS, la inyección de DHPG en la SNr disminuyó significativamente ( $p < 0.05$ ) la actividad motora con respecto a la inyección de vehículo.



**Figura 60. El bloqueo de los mGluR 1 en la SNr restaura la actividad motora y normaliza los niveles de GABA extracelular en el VMT.** Se insertaron dos cánulas en la SNr y la sonda de microdiálisis en el VMT. (A) Después de recoger 4 muestras basales se administró el antagonista de los mGluR 1, CPCCCOEt (10 nmol/parte) en el minuto 100 y el agonista de los mGluRs de grupo I, DHPG (10 nmol/parte) en el minuto 240. Se registró la actividad motora al mismo tiempo que se realizaba la microdiálisis. La actividad motora en condiciones basales (min 20-40) se muestra en el panel B. La actividad motora tras la inyección de CPCCCOEt en la SNr (min 100-160) se muestra en el panel C. La actividad motora tras la inyección de DHPG en la SNr (min 240-300) se muestra en el panel D. Los valores significativamente diferentes respecto a las ratas control se indican con asterisco, \*  $p < 0.05$ ; "a" significa en las ratas PCS que es diferente significativamente ( $p < 0.05$ ) respecto al basal antes de la inyección de CPCCCOEt; "b" significa en las ratas control que es diferente significativamente ( $p < 0.05$ ) respecto a su valor basal.



Para corroborar que cambios en la actividad motora reflejan cambios en la concentración extracelular de GABA en el VMT representamos (Fig. 61) para cada animal la concentración de GABA en el VMT y la actividad motora correspondiente a los niveles basales (de 20 a 80 min, □, ■), después del bloqueo de los mGluR 1 en la SNr (de 100 a 160 min, ○, ●), y tras la activación de los mGluRs en la SNr (de 240 a 300 min, Δ, ▲). Existe una correlación negativa significativa ( $p < 0.05$ ,  $r = -0.574$ ) entre la concentración extracelular de GABA en el VMT y actividad motora. Cuando aumenta el GABA en el VMT disminuye la actividad motora y viceversa.

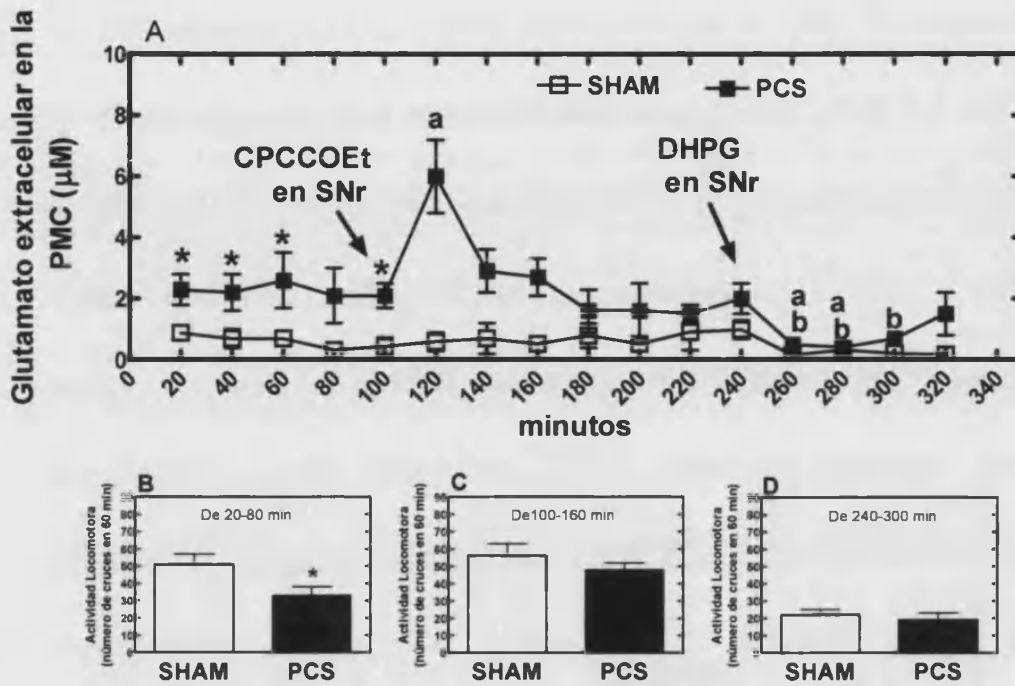


**Figura 61. Existe una correlación significativa entre la concentración de GABA extracelular en el VMT y la actividad motora.** La grafica muestra los valores de GABA extracelular en el VMT y de actividad motora obtenidos para cada rata del experimento mostrado en la Fig. 58. Los cuadrados ( $\square$ ,  $\blacksquare$ ) corresponden a los valores basales durante los 20-80 min de la Fig. 58. Los circulos ( $\circ$ ,  $\bullet$ ) representan los valores tras la inyección de CPCCOEt en al SNr (100-160 min de la Fig. 58). Los triangulos ( $\Delta$ ,  $\blacktriangle$ ) representan los valores tras la inyección de DHPG (240-300 min en la Fig.58). El analisis de regresión lineal muestra que existe una correlación significativa inversa entre la concentración de GABA extracelular en el VMT y actividad motora ( $r = -0.574$ ,  $p < 0.05$ ).

El siguiente paso, siguiendo el circuito neuronal que modula la actividad motora, fue estudiar si la hipolocomoción en ratas PCS como los cambios inducidos por el bloqueo o la activación de los mGluRs en la SNr se reflejaban en cambios en la concentración extracelular de glutamato en la corteza motora primaria (PMC).

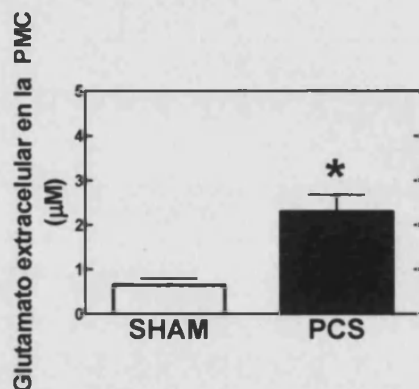
El bloqueo de los mGluRs 1 en la SNr con el antagonista CPCCOEt (10 nmol/parte) aumenta significativamente la actividad motora solo en las ratas PCS y aumenta significativamente ( $p < 0.05$ ) la concentración extracelular de glutamato en la PMC de las ratas PCS pero no en las ratas control (Fig. 62).

Una vez que el efecto del antagonista CPCCOEt se pierde, la concentración extracelular de glutamato en la PMC de las ratas PCS vuelve a los valores basales (minutos 140-220, Fig. 62). La inyección de DHPG (10 nmol/parte) en el minuto 240 redujo la concentración de glutamato (Fig. 62) y la actividad motora (Figs. 56 y 62D) tanto en las ratas control como en las PCS.



**Figura 62.** La inyección del antagonista del mGluR1, CPCCOEt, en la SNr aumenta el glutamato extracelular en la corteza motora primaria (PMC) y la actividad motora solo en las ratas PCS. Se insertaron dos cánulas en la SNr y la sonda de microdiálisis en la PMC. (A) Después de recoger 4 muestras basales se administró el antagonista de los mGluR 1, CPCCOEt (10 nmol/parte) en el minuto 100 y el agonista de los mGluRs de grupo I, DHPG (10 nmol/parte) en el minuto 240. Se registró la actividad motora al mismo tiempo que se realizaba la microdiálisis. La actividad motora en condiciones basales (min 20-40) se muestra en el panel B. La actividad motora tras la inyección de CPCCOEt en la SNr (min 100-160) se muestra en el panel C. La actividad motora tras la inyección de DHPG en la SNr (min 240-300) se muestra en el panel D. Los valores significativamente diferentes respecto a las ratas control se indican con asterisco, \*  $p < 0.05$ ; "a" significa en las ratas PCS que es diferente significativamente ( $p < 0.05$ ) respecto al basal antes de la inyección de CPCCOEt; "b" significa en las ratas control que es diferente significativamente ( $p < 0.05$ ) respecto a su valor basal.

En la PMC la concentración extracelular de glutamato fue significativamente ( $p < 0.05$ ) más alta (de 250 %) en la PMC de las ratas PCS que en las ratas control:  $0.65 \pm 0.15 \mu\text{M}$  en las ratas control y  $2.3 \pm 0.8 \mu\text{M}$  en las PCS (Fig.63)



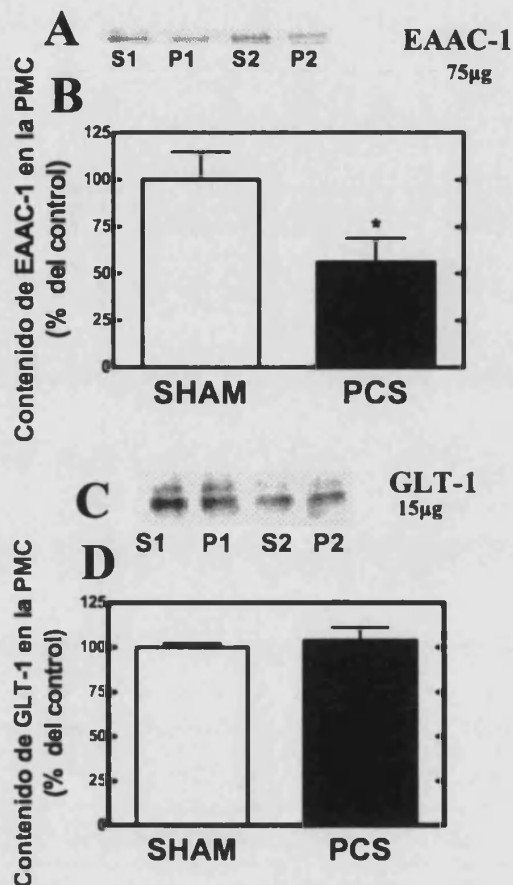
**Figura 63.** La concentración extracelular de glutamato está aumentada en la corteza motora primaria (PMC) de las ratas PCS. Se colocó una sonda de microdiálisis en la PMC y se cogieron 5 fracciones basales por cada rata. Se determinó la concentración de glutamato en las muestras de microdiálisis por HPLC. Los valores representan la media  $\pm$  error standard de 7 ratas por cada grupo. \*  $p < 0.05$ , diferencia significativa entre las ratas PCS y las control.

La concentración extracelular de GABA en la PMC fue similar en los dos grupos ( $3.4 \pm 0.4$  nM en las ratas control y  $4.3 \pm 0.4$  nM en las PCS, datos no mostrados).

Dado que las ratas PCS presentan hipolocomoción, cabría esperar en principio que tuvieran la concentración de glutamato disminuida y no aumentada. Para tratar de entender esta aparente incongruencia medimos en la PMC el contenido de los transportadores EAAC-1 (neuronal) y GLT-1 (glial) de glutamato. El contenido del transportador neuronal EAAC-1 está significativamente ( $p < 0.05$ ) disminuido ( $56 \pm 12\%$  del control) en la PMC de las ratas PCS (Fig. 64A-B).

En cambio, el contenido del transportador glial GLT-1 fue similar en los dos grupos (Fig. 64 C-D).

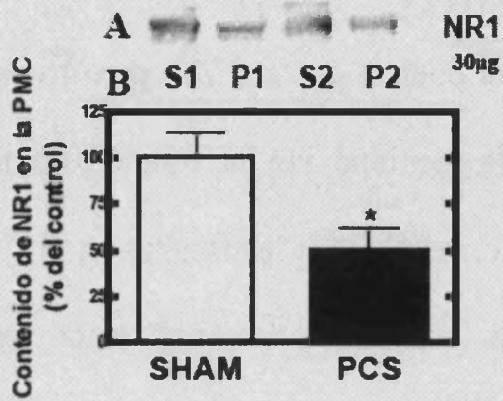
La disminución del transportador neuronal EAAC-1 podría contribuir al aumento de la concentración de glutamato en la PMC de las ratas PCS.



**Figura 64.** El contenido del transportador neuronal de glutamato, EAAC-1, pero no el del transportador glial GLT-1 está disminuido en la corteza motora primaria (PMC) de las ratas PCS. Se sacrificaron ratas control y ratas PCS y se aislaron rápidamente las PMC. Se analizó el contenido de EAAC-1 (A, B) y de GLT-1 (C, D) por “immunoblotting” como se describe en la sección Métodos. Se muestran “immunoblottings” representativos de 2 ratas control (SHAM) (S1-S2) y 2 ratas PCS (P1-P2) (A y C). Se capturaron las imágenes y se cuantificó la intensidad de las bandas correspondientes (B, D). Se expresan los datos de las ratas PCS como porcentaje del control. Los valores son la media  $\pm$  error standard de 7 ratas por cada grupo. \*  $p < 0.05$ .

Una posible explicación para el hecho de que las ratas PCS tengan más glutamato que las control en la PMC pero menos actividad motora sería que la cantidad y/o la función de los receptores de glutamato que median la estimulación de la actividad motora estuvieran disminuidos. Analizamos por “immunoblotting” el contenido de receptores NMDA (subunidad NR1) y metabotrópicos (mGluRs 1 y 5). El contenido de receptores NMDA (la subunidad NR1), pero no el de los mGluRs 1 y 5 o de la subunidad GLUR1 del receptor AMPA (datos no mostrados), está disminuido drásticamente ( $p < 0.05$ ) un 50% en la PMC de las ratas PCS comparado con las ratas control (Fig. 65).





**Figura 65. El contenido de los receptores NMDA está disminuido en la corteza motora primaria (PMC) de las ratas PCS.**

Se sacrificaron ratas control y ratas PCS y se aislaron rápidamente las cortezas motoras primarias. Se analizó el contenido de la subunidad NR1 del receptor NMDA (A, B) por "immunoblotting". Se muestran "immunoblottings" representativos de 2 ratas control (SHAM) (S1-S2) y 2 ratas PCS (P1-P2) (A). Se capturaron las imágenes y se cuantificó la intensidad de las bandas correspondientes (B). Se expresan los datos de las ratas PCS como porcentaje del control. Los valores son la media  $\pm$  error standard de 5 ratas por cada grupo. \*  $p < 0.05$ .

## **V. DISCUSIÓN**



## **Discusión**

El núcleo accumbens es un área que pertenece al estriado ventral y que se considera involucrado en la integración entre motivación y acción motora (interfase limbico-motora) (Mogenson et al., 1980). Este núcleo cerebral juega un papel crucial en la evocación de respuestas motoras en respuesta a estímulos tanto apetitivos como aversivos y participa en procesos diversos como la ingesta, la conducta sexual, la recompensa, la autoadministración de drogas, respuesta al estrés, en la memoria, etc. (Abercrombie et al., 1989; Floresco et al., 1996; Jongen-Relo et al., 2003; Maldonado-Irizarry et al., 1995; Damsma et al., 1992; Schultz et al., 1992). Su principal papel neurobiológico consiste en transferir información motivacional relevante para que se codifiquen respuestas motoras oportunas. En los animales de experimentación tiene la función de reconocer y responder a situaciones que requieren que el animal realice una conducta motora apropiada (Spanagel y Weiss 1999).

El NAcc posee dos territorios diferentes: el core (centro) y la shell (corteza). La “shell” presenta conexiones de carácter “límbico”: recibe proyecciones glutamatergicas desde el hipocampo, la amígdala y corteza prefrontal y dopaminérgicas desde el tegmento ventral. En cambio el “core” es una extensión del estriado dorsal (caudato-putamen) y tiene un carácter motor: recibe aferencias glutamatérgicas de la corteza motora y dopaminérgicas de la sustancia negra *pars compacta* y del área ventral tegmental. El “core” presenta conexiones GABA-érgicas de salida hacia el pálido ventral y la sustancia negra *pars reticulata* que forman parte de los bucles motores córtico-estriado-talámicos que forman parte del sistema extrapiramidal. El pálido ventral envía fibras GABA-érgicas al tálamo medio-dorsal mientras la sustancia negra *pars reticulata* envía fibras GABA-érgicas al tálamo ventro-medial y al tálamo anterior. En el tálamo se originan fibras glutamatérgicas que proyectan difusamente a áreas corticales como la corteza prefrontal y corteza motora que a su vez establecen conexiones entre ellas.

Además desde estas áreas corticales se originan fibras glutamatérgicas que forman el sistema descendente córtico-espinal (vía piramidal) y fibras que inervan el núcleo accumbens, el pálido ventral y la sustancia negra *pars reticulata*, cerrando de este modo el circuito ganglios basales-corteza (Fig. 5).

Las tres grandes aferencias del NAcc participan en distintos aspectos de la evaluación de la situación ambiental. La corteza prefrontal es clave en los procesos de atención, de evaluación cognitiva y de programación premotora. La amígdala participa en la integración emocional y autónoma. El hipocampo desempeña un papel mnésico y de cartografía espacial.

Se cree que el proceso de integración motora tiene lugar principalmente en la “shell” del núcleo accumbens, la cual modificaría los patrones de actividad motora del “core”, a través de la corteza prefrontal que actúa como un enlace entre los dos territorios del núcleo accumbens. Woodward y cols. (2000) mostraron con técnicas de electrofisiología que un 50% de las

neuronas del NAcc disparan durante el comienzo de un acto motor y se “callan” cuando comienza otro que, a su vez, activa otro conjunto de un 50% de neuronas.

Los principales neurotransmisores implicados en las respuestas motoras que se originan en el NAcc son la dopamina y el glutamato que modulan la actividad de las neuronas GABA-érgicas que proyectan desde el NAcc hacia el VP y la SNr. Por otra parte, en el NAcc existen interneuronas GABA-érgicas y colinérgicas que hacen que el GABA y la acetilcolina juegen un importante papel modulador de las respuestas motoras inducidas por la dopamina y/o el glutamato. Una muestra de ello es el hecho de que la inyección de agonistas o antagonistas de receptores GABA-érgicos o colinérgicos en el NAcc induce alteraciones (estimulación o inhibición) en la actividad motora.

Estudios de neuroanatomía muestran que los mGluRs de grupo I (mGluR 1 y 5) se expresan ampliamente en el estriado (caudato-putamen y NAcc) (Albin et al., 1992; Kerner et al., 1997; Testa et al., 1994). La activación de los mGluRs del grupo

I en el NAcc estimula la liberación de neurotransmisores como dopamina y glutamato (Bruton et al., 1999; Cartmell and Schoepp, 2000) y la actividad motora (Kearney et al., 1997; Swanson and Kalivas, 2000; Wang and Mao, 2000).

La hiperamonemia y el fallo hepático alteran la neurotransmisión glutamatérgica a diferentes niveles; alterándose el contenido y la función de los receptores y de los transportadores de glutamato tanto gliales como neuronales (Monfort et al., 2002). La función de algunas vías de transducción de señales asociadas a los receptores NMDA (v.g. la vía glutamato-óxido nítrico-GMPc) está alterada en fallo hepático y esta alteración parece debida a la hiperamonemia. Se han realizado muy pocos estudios acerca de los efectos de la hiperamonemia y del fallo hepático sobre la función de los mGluRs. Nuestro grupo ha mostrado previamente que en cultivos primarios de neuronas granulares de cerebelo algunas de las vías de transducción de señales asociadas a receptores



metabotrópicos de glutamato se alteran por la exposición crónica a amonio (Llansola et al., 2005; Saez et al., 1999).

Teniendo en cuenta que el glutamato y los mGluRs modulan las respuestas motoras en el NAcc y que los pacientes con fallo hepático presentan alteraciones motoras, un primer objetivo de esta tesis consistió en estudiar si en los modelos animales las respuestas motoras y neuroquímicas moduladas por los mGluRs en el NAcc están alteradas *in vivo* en situaciones de fallo hepático crónico (modelo de la anastomosis porta-cava). Además estudiamos si la hiperamonemia crónica que se instaura tras el fallo hepático es responsable de las alteraciones en las respuestas a la activación de los mGluRs *in vivo*. Para ello estudiamos los efectos motores y neuroquímicos inducido por la activación de los mGluRs en el NAcc en ratas sin fallo hepático pero con hiperamonemia crónica moderada (inducida mediante la administración de una dieta que contiene acetato amónico). La comparación de los resultados obtenidos con los dos modelos permite discernir que alteraciones son debidas a la

hiperamonemia y cuales se deben a otros factores que se alteran tras el fallo hepático.

**1. La inducción de actividad motora por estimulación de los mGluRs del grupo I en el NAcc es mayor en ratas con fallo hepático que en las control.**

La estimulación de los mGluRs del grupo I con el agonista selectivo DHPG en el NAcc induce un aumento significativo de la actividad motora tanto horizontal como vertical en las ratas control confirmando estudios previos de otros grupos ( Kearney et al., 1997; Swanson and Kalivas, 2000; Wang and Mao, 2000).

Nuestros resultados muestran que en ratas con fallo hepático (anastomosis porta-cava) la estimulación de la actividad motora por el DHPG es mayor que en las ratas control. Este mismo efecto ocurre en ratas con hiperamonemia crónica sin fallo hepático, lo cual indica que la hiperamonemia sería responsable de la mayor respuesta motora a la activación de los mGluRs en NAcc de ratas con fallo hepático crónico.

Hemos comprobado que el receptor mGlu1 es responsable de los efectos motores inducidos por el DHPG en NAcc dado que el efecto motor del DHPG se previene cuando se inyecta en el NAcc un antagonista selectivo del mGluR1 y la administración de un agonista selectivo del mGluR 5 no induce ninguna estimulación motora (Canales et al., 2003; Cauli et al., 2005).

Estudios de localización por inmunohistoquímica han demostrado que el mGluR 1 se expresa en neuronas mientras que el mGluR 5 se expresa tanto en neuronas como en células de glia. Esto sugiere que las alteraciones en las respuestas motoras al DHPG en hiperamonemia y fallo hepático son debidas a alteraciones de vías de trasducción de señales o en respuestas asociadas a mGluR 1 en neuronas y no en astrocitos.

## **2. La hiperamonemia y el fallo hepático crónicos alteran las respuestas neuroquímicas inducidas por activación de los mGluRs del grupo I en el NAcc.**

La regulación de los niveles extracelulares de dopamina y glutamato en el NAcc es un factor clave en la modulación de las respuestas motoras (Carlsson, 1993; Hauber, 1998). Nuestros resultados muestran que la activación de los mGluRs regula de forma diferente la liberación de dopamina y glutamato en el NAcc en situaciones normales y en situaciones de fallo hepático. En ratas control el DHPG aumenta la concentración extracelular de dopamina en el NAcc (Bruton et al., 1999; Hu et al., 1999) y este aumento parece ser el responsable del aumento de la actividad motora en situaciones “normales”. Confirma esta hipótesis el hecho de que la administración de sustancias que aumentan los niveles extracelulares de dopamina en el NAcc como cocaína y anfetamina, o agonista de los receptores dopaminérgicos aumentan la actividad motora (Anden 1977; Robbins y Everitt, 1982; Chesselet 1984). Además la

estimulación de la actividad motora inducida por agonistas de los mGluRs en el NAcc se previene con antagonistas de los receptores dopaminérgicos (Wang y Mao, 2000) y la depleción de dopamina previene completamente la estimulación motora inducida por administración en NAcc del agonista no-selectivo de los mGluRs, t-ACPD (Meeker et al., 1998).

En estriado de primates se ha demostrado la presencia de mGluR 1 en las terminaciones presinápticas de fibras dopaminérgicas (Paquet and Smith 2005). La activación de estos receptores podría explicar el aumento de la concentración extracelular de dopamina tras la administración de DHPG. Nuestros resultados muestran que la administración del antagonista de los mGluR 1, CPCCOEt, además de prevenir los efectos motores inducidos por el DHPG también inhibe la liberación de dopamina (Canales et al., 2003), indicando que la activación de mGluR 1 y no de mGluR 5 es la responsable de la liberación de dopamina.

Las respuestas de los niveles de neurotransmisores en NAcc a la inyección de DHPG en ratas con fallo hepático crónico presentan dos diferencias muy notables con respecto a las ratas control:

- 1) no aumenta la dopamina
- 2) aumenta el glutamato, que no aumenta en las ratas control

Por tanto en las ratas PCS la inducción de la actividad motora por DHPG no puede estar mediada por el aumento de dopamina.

Parece que debería estar mediada por el aumento de glutamato.

Para ensayar esta posibilidad estudiamos si la inducción de locomoción por DHPG se previene bloqueando con CNQX los receptores AMPA/kainato del glutamato en NAcc. Utilizamos una dosis de CNQX que por si sola no induce ningún efecto motor y comprobamos que, efectivamente, en las ratas con fallo hepático el CNQX prevenía completamente la estimulación motora inducida por DHPG.

Los mecanismos por los que en las ratas PCS el DHPG aumenta la liberación de glutamato pero no la de dopamina no están

claros. La inhibición en las ratas PCS de la liberación de dopamina que induce el DHPG en ratas control podría ser consecuencia del aumento de glutamato extracelular. Este glutamato podría inhibir la liberación de dopamina activando los receptores mGlu del grupo II (mGluR 2 y 3). Se ha comprobado que la administración en el NAcc de agonistas de los mGluRs del grupo II inhibe la liberación de dopamina (Greenslade y Mitchell 2004; Karasawa et al., 2006). Además la administración de un antagonista de mGluRs de grupo II aumenta los niveles extracelulares de dopamina en el NAcc (Karasawa et al., 2006).

Por tanto el aumento de glutamato extracelular podría ser responsable de la falta de aumento de dopamina en las ratas PCS.

La administración de DHPG induce un aumento de la concentración extracelular de glutamato en el NAcc también en las ratas hiperamonémicas pero no en las ratas control, sugiriendo que la hiperamonemia es el factor clave en el fallo

hepático en la inducción del aumento de glutamato extracelular. En cambio la hiperamonemia sola sin fallo hepático (modelo de la hiperamonemia crónica inducida con la dieta) disminuye el aumento de dopamina inducido por DHPG parcialmente pero sin prevenirlo completamente como en el caso de las ratas con anastomosis porta-cava.

Esta diferencia entre las ratas hiperamonémicas y con fallo hepático en la liberación de dopamina puede deberse al hecho de que en los dos modelos el aumento de la concentración de amonio en cerebro es diferente. El amonio aumenta en cerebro un 100% en anastomosis-porta-cava (Ehrlich et al., 1980; Butterworth et al., 1988) y un 50% en hiperamonemia sin fallo hepático (Miñana et al., 1988; Azorín et al., 1989).

Es posible que el aumento de los niveles de amonio en el modelo de hiperamonemia sin fallo hepático sean suficientes para inducir la liberación de glutamato y reducir el aumento de dopamina, pero no para prevenirlo completamente.



Además del aumento de glutamato otro factor que podría contribuir a prevenir la liberación de dopamina en hiperamonemia es una potenciación de la actividad de los mGluRs del grupo II. Lombardi et al. (1994) mostraron que en cortes de corteza cerebral incubados con acetato de amonio (2–4 mM) la hidrólisis de inositol fosfolípidos inducida por t-ACPD (agonista de los mGluRs del grupo I y II) está disminuida, mientras que está aumentada la disminución de AMPc. Estos datos sugieren que el amonio inhibe vías de trasduccion de señales asociadas a los mGluRs I y potencia vías asociadas a los del grupo II. Considerando estos datos, se puede postular que en las ratas con fallo hepático, la hiperamonemia que se instaura aumente la activación de los mGluRs de grupo II inhiba la liberación de dopamina.

En el caso de las ratas con hiperamonemia sin fallo hepático la potenciación de la función de los mGluRs II sería menor que en las ratas PCS, conduciendo a una disminución de la liberación de dopamina pero no a la inhibición total de la misma.

En las ratas con fallo hepático o hiperamonémicas sin fallo hepático el aumento de la concentración extracelular de glutamato inducido por DHPG y la subsiguiente activación de receptores AMPA/kainato es responsable de la mayor inducción de actividad motora por el DHPG comparada con las ratas control. Cuando se inyecta el antagonista CNQX con el DHPG la actividad motora de las ratas control permanece similar a la inducida por el DHPG solo, como cabría esperar, ya que en estas ratas no aumenta el glutamato extracelular. En las ratas hiperamonémicas inyectadas con CNQX+DHPG la actividad motora aumenta sobre el basal pero llega a valores similares a los de las ratas control. La liberación de dopamina inducida por el DHPG en las ratas hiperamonémicas explicaría la actividad motora que permanece después del bloqueo de los receptores AMPA/kainato. En las ratas con anastomosis porta-cava al no haber liberación de dopamina tras la inyección de DHPG, cuando se bloquean los receptores AMPA/kainato la actividad motora vuelve a valores similares a los de la inyección del

vehículo, ya que ni la dopamina ni el glutamato pueden aumentarla.

**3. Los circuitos neuronales activados por la estimulación de los mGluRs en el NAcc son diferentes en ratas control, con fallo hepático o con hiperamonemia sin fallo hepático.**

Como se ha discutido en el apartado anterior, la inyección de DHPG en NAcc induce aumento de dopamina en NAcc en ratas control pero no en las PCS y aumento de glutamato en las PCS pero no en las control.

Esto sugiere que los mecanismos por los que el DHPG induce actividad motora deben ser diferentes en ratas control y PCS. En las control la dopamina debe activar sus receptores en unas neuronas determinadas y, subsiguientemente, el circuito neuronal que conduce a la ejecución del movimiento. En las ratas PCS sería el glutamato el que activaría sus receptores, probablemente en otras neuronas diferentes y subsiguientemente, el circuito neuronal que conduce a la actividad motora. Este circuito podría

ser por tanto diferente del que activa la dopamina en las ratas control.

Para ver si la activación de los mGluRs en NAcc activa circuitos neuronales distintos en las ratas control, en las PCS y/o en las ratas con hiperamonemia sin fallo hepático, activamos con DHPG los mGluRs en el NAcc y colocamos una sonda de microdiálisis en diferentes núcleos cerebrales que podrían formar parte de dichos circuitos neuronales. Las neuronas GABA-érgicas del NAcc (que constituyen el 95% de la población neuronal en este núcleo cerebral) proyectan al pálido ventral (VP) y a la sustancia negra *pars reticulata* (SNr). La inyección de DHPG en el NAcc activa la vía NAcc-VP en ratas control y conduce a un aumento de la concentración extracelular de GABA en el VP. A su vez el VP envía fibras GABA-érgicas al tálamo medio-dorsal (MDT). Tras la inyección de DHPG en el NAcc el aumento de GABA en el VP inhibe la vía GABA-érgica que proyecta al MDT, conduciendo a una disminución de la concentración extracelular de GABA en el MDT de las ratas

control. Las neuronas glutamatérgicas del MDT proyectan a la corteza prefrontal medial (mPFCx), con lo cual la disminución de GABA en el MDT desinhibe estas fibras glutamatérgicas e induce un aumento de la concentración extracelular de glutamato en la mPFCx.

La activación de esta vía NAcc-VP-MDT-mPFCx en ratas control tras la administración de DHPG en el NAcc se confirma por los estudios de inmunohistoquímica que permiten visualizar la activación neuronal siguiendo el aumento de la expresión de c-fos. En las ratas control la expresión de c-fos aumentó en las áreas NAcc-VP-MDT-mPFCx tras la administración de DHPG.

En las ratas con fallo hepático crónico (PCS) el circuito neuronal NAcc-VP-MDT no se activa. Sin embargo, si que aumenta el glutamato en la mPFCx y la actividad motora en las ratas. Esto sugiere que en las ratas con fallo hepático se debe activar otro circuito neuronal diferente, que conduce a la activación motora. Un candidato que nos pareció probable es el circuito que desde el NAcc proyecta a la SNr. En las ratas con

fallo hepático, pero no en las control, la administración de DHPG en el NAcc estimula las fibras GABA-érgicas que proyectan al SNr y conducen a un aumento de la concentración extracelular de GABA en la SNr. Desde la SNr salen fibras GABA-érgicas que proyectan al tálamo ventro-medial (VMT) pero no al medio-dorsal. El aumento de GABA en la SNr conduce a una reducción de la concentración extracelular de GABA en el VMT de las ratas con fallo hepático pero no en las control. Desde el VMT salen fibras glutamatérgicas que proyectan a la corteza premotora que a su vez comunican con las de la corteza prefrontal. La disminución de GABA en el VMT conduce a un aumento de glutamato en la mPFCx.

Los estudios de inmunohistoquímica confirmaron que en las ratas PCS pero no en las control, la administración de DHPG en el NAcc induce un aumento de la activación neuronal (aumento de la expresión de la proteína c-fos) en la SNr y en VMT.

Estos datos muestran que tras la inyección de DHPG en NAcc, en las ratas PCS se activa la vía NAcc-SNr-VMT-mPFCx. Esta

misma vía no se activa en ratas control. Dado que en las ratas PCS el DHPG aumenta el glutamato en NAcc y en las ratas control no, pensamos que este glutamato sería el responsable de la activación de la vía y de la inducción de actividad motora. Pensamos que este efecto podría estar mediado por la activación de receptores AMPA en el NAcc, que induciría una liberación de GABA en la SNr. Para comprobarlo, inyectamos CNQX (antagonista de receptores AMPA/kainato) con el DHPG en el NAcc y medimos GABA extracelular en la SNr y actividad motora. La inyección de CNQX previene completamente el aumento de GABA en la SNr y de la actividad motora inducidos por el DHPG.

Los datos anteriores indican que en las ratas control el DHPG induce un aumento de dopamina en NAcc que activa el circuito neuronal NAcc-VP-MDT-mPFCx. En las ratas PCS no aumenta la dopamina y no se activa este circuito. En cambio en las ratas PCS el DHPG aumenta el glutamato en NAcc y activa el circuito neuronal NAcc-SNr-VMT-mPFCx.

En las ratas con hiperamonemia crónica moderada sin fallo hepático el DHPG aumenta tanto la dopamina como el glutamato en NAcc, por lo que cabría esperar que en estas ratas se activaran los 2 circuitos neuronales. Tanto los estudios de microdiálisis cerebral como los de activación neuronal por inmunohistoquímica de c-fos muestran que efectivamente en las ratas hiperamonémicas se activan ambos circuitos.

Por otra parte, en estas ratas la inyección de DHPG en NAcc induce una activación motora mayor que en las ratas control.

Para comprobar si el aumento de glutamato en el NAcc inducido por el DHPG es responsable de la mayor activación motora en las ratas hiperamonémicas inyectamos el antagonista de los receptores AMPA/kainato (CNQX) en el NAcc junto al DHPG y medimos liberación del neurotransmisor GABA en la SNr y actividad motora. Efectivamente observamos que el CNQX prevenía el aumento de GABA en la SNr y la mayor actividad motora inducidos por el DHPG. Tras la inyección de CNQX la actividad motora en las ratas hiperamonémicas se mantiene a



niveles similares a los inducidos por el DHPG en las ratas control, confirmando que el aumento de glutamato es responsable del aumento en la respuesta motora.

**4. La hipolocomoción en ratas con fallo hepático crónico es debida al aumento de glutamato y a la activación de mGluR1 en SNr.**

En los experimentos de microdiálisis cerebral en la sustancia negra *pars reticulata* (SNr) observamos que en las ratas PCS la concentración extracelular de glutamato en la SNr estaba muy aumentada en comparación con las ratas control (sham). Realizamos análisis de correlación y comprobamos que efectivamente existe una correlación negativa entre el glutamato extracelular en la SNr y la actividad motora. La ratas con concentración extracelular de glutamato mas alta en la SNr son las que tiene mas hipoquinesia.

El contenido tanto del transportador neuronal de glutamato EAAC-1 como del glial GLT-1 están significativamente disminuidos en la SNr de las ratas PCS. Esta disminución podría

contribuir al aumento del glutamato y a la hipoquinesia presente en las ratas PCS.

Otros estudios (Norenberg et al., 1997; Suarez et al., 2000; Monfort et al. 2002) han mostrado una disminución del contenido de transportadores de glutamato en fallo hepático en diferentes áreas cerebrales. Nuestros resultados muestran que también disminuyen en SNr, un área crucial en la mediación de las respuestas motoras de los ganglios basales. Existen estudios que demuestran que el bloqueo de los receptores NMDA o AMPA en la SNr induce estimulación de la actividad motora (Pycock y Dawbarn 1980; Kaur et al., 1997) pero no se han descrito efectos de la inhibición o activación de los mGluRs en la SNr sobre la actividad motora no se han descrito. Nuestros datos demuestran que el aumento del glutamato en ratas PCS activa los mGluR 1 e induce hipolocomoción. En las ratas control el bloqueo de mGluR1 en SNr no induce actividad motora, indicando que estos receptores no están tónicamente activados por glutamato en condiciones normales. activandose

solo en situaciones en las que la concentración extracelular de glutamato aumenta (Pin y Duvoisin, 1995; Lujan et al., 1997; Mateos et al., 2000; Conn et al., 2005). Cuando se activan directamente los mGluRs de grupo I con DHPG si que se induce hipolocomoción en ratas control, apoyando la idea de que el exceso de glutamato en SNr induce hipoquinesia.

El aumento de la activación de los mGluR1 en la SNr conduce a un aumento de la concentración extracelular de GABA en el tálamo ventro-medial (VMT) que media la hipolocomoción de las ratas PCS. El bloqueo de los mGluR 1 en la SNr normaliza los valores de GABA en el VMT y la locomoción, que vuelve a valores similares a los de las ratas control. En las ratas control, el bloqueo de los mGluR 1 en la SNr no tiene ningun efecto sobre el GABA en el VMT, corroborando que la activación de los mGluR 1 en la SNr tiene lugar solo en condiciones patológicas, como en fallo hepatico crónico. El hecho de que activando los mGluRs en la SNr aumente el GABA en el VMT y disminuya la actividad motora confirma el papel de los

mGluR 1 en la SNr y del GABA en el VMT en la modulación de la actividad motora. Además existe una perfecta correlación negativa entre concentración extracelular de GABA en VMT y actividad motora.

El circuito neuronal por el que los mGluRs en la SNr modulan la actividad motora implica también la corteza motora primaria (PMC). Un aumento de glutamato extracelular en la PMC conduce a un aumento de la actividad motora (Graybiel, 1984; Freund, 1985; Marsden y Obeso, 1994; Katz, 1996).

El bloqueo de los mGluR 1 en la SNr aumenta el glutamato extracelular en la PMC y la actividad motora en las ratas PCS. Por otra parte, la activación de los mGluRs disminuye el glutamato en la PMC y la actividad motora tanto en ratas control como en las PCS.

Podría esperarse que la menor actividad motora basal en ratas PCS estuviera asociada a una disminución del glutamato extracelular en la PMC. Nuestros resultados muestran que la concentración extracelular de glutamato está significativamente

aumentada en la PMC de las ratas PCS, probablemente debido a una disminución del transportador neuronal EAAC-1 del glutamato. Sin embargo, la actividad motora basal está disminuida en las ratas PCS. Esta aparente incongruencia se puede explicar por una disminución en el número y/o en la funcionalidad de receptores de glutamato en la PMC o de las vías de transducción de señales asociadas a los mismos. Los resultados obtenidos muestran una marcada disminución (50%) del contenido de receptores NMDA en la PMC de las ratas PCS que puede contribuir a su hipolocomoción. El contenido de receptores NMDA disminuye en distintas áreas cerebrales en diferentes modelos de hiperamonemia y fallo hepático. Peterson et al. (1990) mostraron una disminución de los sitios de unión de glutamato al receptor NMDA en la corteza de ratas PCS. Hopkins y Oster-Granite (1998) mostraron que en la corteza fronto-parietal de ratones hiperamonémicos el contenido de receptores NMDA está disminuido en un 58%. La disminución de receptores NMDA en la PMC puede contribuir a la

hipolocomoción de las ratas PCS, a pesar del aumento de la concentración extracelular de glutamato.

Diversos estudios clínicos han demostrado que existen alteraciones en las áreas cerebrales implicadas en los circuitos de los ganglios basales en pacientes con enfermedades crónicas del hígado (e.g. cirrosis, hepatitis). La alteración mayoritariamente descrita es la hiperintensidad de las imágenes de resonancia magnética nuclear, especialmente en las pesadas en T1 en el globo pálido, caudato-putamen, sustancia negra y núcleo dentado del cerebelo (Kulisevsky et al., 1992; Krieger et al., 1996; Layrargues et al., 1998; Spahr et al., 1996; Taylor-Robinson et al., 1996; Skehan et al., 1997; Burkhard et al., 2003;). Se ha descrito también en pacientes con EH un aumento de la utilización de la glucosa en el tálamo, lo cual indica que existe una alteración de la funcionalidad de esta área cerebral (Butterworth, 2000).

La asterixis (temblor de las extremidades superiores distales) presente en los pacientes con EH se ha atribuido a un

acoplamiento tálamo-cortical alterado (Timmermann et al, 2003; 2005). Nuestro trabajo confirma la existencia de dicha alteración y proporciona información nueva relevante sobre los posibles mecanismos responsables de la misma.

### **5. Posibles implicaciones terapéuticas**

Los resultados expuestos pueden servir de base para diseñar tratamientos que mejoren las alteraciones motoras en pacientes con encefalopatía hepática. En principio se podría considerar con una visión simplista que la administración periférica de antagonistas del mGluR1 permitiría que estos lleguen a la SNr y normalicen la actividad motora en pacientes con encefalopatía hepática. Sin embargo, el antagonista también bloquearía los receptores mGluR1 en otras áreas cerebrales y periféricas. Los efectos motores inducidos por el bloqueo o la activación de los mGluRs son diferentes según el área cerebral (e.g núcleo accumbens y sustancia negra *pars reticulata*). Por tanto son necesarios nuevos estudios para analizar la posible utilidad de

antagonistas de mGluR, administrados por vía sistémica, para tratar el enlentecimiento motor en encefalopatía hepática.

En ratas control, la inyección de dosis bajas de DHPG en el tercer ventrículo (por vía sistémica no pasa la barrera ematoencefálica) que estimula los mGluRs en todo el cerebro no induce ninguna alteración significativa de la actividad motora (Zalewska y Wisniewski, 2000). A dosis muy altas (100 nanomoles) la inhibe (Camon et al., 1998; Zalewska y Wisniewski, 2000). La falta de efectos motores a dosis relativamente bajas (20 nanomoles) podría ser debida a un antagonismo funcional entre el estriado donde la estimulación de los mGluR1 aumentaría la actividad motora y la sustancia negra donde la activación de mGluR inhibiría la actividad motora.

La modulación de la actividad motora por el bloqueo de los mGluR1 es diferentes y no exactamente el opuesto de los efectos motores inducidos por el agonista DHPG. Los antagonistas sólo tendrán efecto en aquellas áreas en las que los



mGluRs están tónicamente activados. La administración de antagonistas de los mGluR 1 por vía sistémica (intraperitoneal) estimula la actividad motora en ratas control (Klodzinska et al., 2004). Nuestro grupo ha demostrado que la inyección del antagonista de los mGluR1, CPCCOEt en el núcleo accumbens no induce ningún efecto motor ni en ratas control ni en ratas hiperamonémicas (Canales et al., 2003). Este mismo compuesto restaura la actividad motora de las ratas con fallo hepático crónico cuando se administra en la sustancia negra *pars reticulata* pero no afecta la actividad motora en ratas control.

Además de los diferentes efectos motores que puede tener la modulación de los mGluRs en distintas áreas cerebrales, también hay que tener en cuenta que estos receptores también modulan otros procesos cerebrales (v.g. función cognitiva). Por tanto los antagonistas podrían tener otros efectos secundarios.

Teniendo en cuenta los resultados de esta tesis los compuestos más prometedores como posibles agentes terapéuticos en los pacientes con EH serían los antagonistas de los mGluR 1. En

principio cabría esperar que los antagonistas de los mGluR 1 a dosis bajas normalizaran la actividad motora en situaciones de fallo hepático, donde existe un aumento del tono glutamatérgico endógeno sobre estos receptores en la sustancia negra y no afectaran la actividad motora en sujetos normales en los que la activación basal tónica de los mGluR1 es inapreciable.



## **VI. CONCLUSIONES**



## **Conclusiones**

Los resultados obtenidos nos han permitido alcanzar las siguientes conclusiones principales:

1. La estimulación de la actividad motora inducida por la activación de los receptores metabotrópicos de glutamato del grupo I en el nucleus accumbens (NAcc) está aumentada en ratas con fallo hepático crónico (ratas PCS) o con hiperamonemia crónica sin fallo hepático en comparación con las ratas control.
2. Las respuestas de los niveles extracelulares de neurotransmisores en NAcc a la inyección de DHPG en ratas con fallo hepático crónico presentan dos diferencias muy notables con respecto a las ratas control: no aumenta la dopamina y aumenta el glutamato, que no aumenta en las ratas control. En las ratas con hiperamonemia crónica sin fallo hepático aumentan tanto la dopamina como el glutamato.

3. En las ratas control la inyección de DHPG en el NAcc aumenta la dopamina extracelular, que activa el circuito neuronal: NAcc-VP-MDT-mPFCx. Este circuito no se activa en las ratas con fallo hepático crónico.
4. En las ratas con fallo hepático crónico la inyección de DHPG en el NAcc aumenta el glutamato extracelular, que activa otro circuito neuronal: NAcc-SNr-VMT-mPFCx. Este circuito no se activa en las ratas control.
5. En ratas con hiperamonemia crónica moderada la inyección de DHPG aumenta tanto la dopamina como el glutamato extracelular y se activan ambos circuitos: NAcc-VP-MDT-mPFCx y NAcc-SNr-VMT-mPFCx.
6. El aumento de glutamato en el NAcc inducido por el DHPG en ratas con fallo hepático crónico o con hiperamonemia sin fallo hepático activa los receptores AMPA en el NAcc que inducen la activación del circuito neuronal NAcc-SNr-VMT-mPFCx. La activación de este

circuito es responsable del aumento de la respuesta motora al DHPG en estas ratas.

7. El aumento del glutamato extracelular basal y de la activación de mGluR1 en la sustancia negra *pars reticulata* (SNr) es responsable de la hip locomoción de las ratas con fallo hepático crónico.
8. El bloqueo de mGluR 1 en la SNr con el antagonista CPCCOEt restaura la actividad motora en las ratas con fallo hepático crónico.





## **VII. REFERENCIAS**



**Abercrombie ED, Keefe KA, DiFrischia DS, Zigmond MJ. Differential effect of stress on in vivo dopamine release in striatum, nucleus accumbens, and medial frontal cortex. J Neurochem. 1989 May;52(5):1655-8.**

**Adams RD, Foley JM. The neurological changes in the more common types of severe liver disease. Trans Am Neurol Assoc 1949;74:217-9.**

**Adams RD, Foley JM. The neurological disorder associated with liver disease. Res Publ Assoc Res Nerv Ment Dis. 1953;32:198-237.**

**Aiba A, Chen C, Herrup K, Rosenmund C, Stevens CF, Tonegawa S. Reduced hippocampal long-term potentiation and context-specific deficit in associative learning in mGluR1 mutant mice. Cell. 1994 Oct 21;79(2):365-75**

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

**Albin RL, Makowiec RL, Hollingsworth ZR, Dure LS 4th, Penney JB, Young AB. Excitatory amino acid binding sites in the basal ganglia of the rat: a quantitative autoradiographic study. Neuroscience. 1992;46(1):35-48.**

**Albin RL, Young AB, Penney JB. The functional anatomy of basal ganglia disorders. Trends Neurosci. 1989 Oct;12(10):366-75.**

**Alexander GE, DeLong MR, Strick PL. Parallel organizations of functionally segregated circuits linking basal ganglia and cortex. Ann Rev Neurosci 1986;9:357-381.**

**Allen G.L, and Tsukahara N. (1974) Cerebrocerebellar communication systems. Physiol. Rev. 54:957-1006.**

**Anden NE. Functional effects of local injections of dopamine and analogs into the neostriatum and nucleus accumbens. Adv Biochem Psychopharmacol. 1977;16:385-9.**

**Amodio P, Del Piccolo F, Marchetti P, Angeli P, Iemmolo R, Caregaro L, Merkel C, Gerunda G, Gatta A. Clinical features and survival of cirrhotic patients with subclinical cognitive alterations detected by the number connection test and computerized psychometric tests. Hepatology. 1999 Jun;29(6):1662-7.**

**Azorin I, Minana MD, Felipe V, Grisolia S. A simple animal model of hyperammonemia. Hepatology. 1989 Sep;10(3):311-4.**

**Balata S, Damink SW, Ferguson K, Marshall I, Hayes PC, Deutz NE, Williams R, Wardlaw J, Jalan R. (2003) Induced hyperammonemia alters neuropsychology, brain MR spectroscopy and magnetization transfer in cirrhosis. Hepatology. 37(4): 931-9.**

**Ballard RA, Vinocur B, Reynolds JW, Wennberg RP, Merritt A, Sweetman L, Nyhan WL. Transient hyperammonemia of the preterm infant. N Engl J Med. 1978 Oct 26;299(17):920-5.**

**Baraldi M, Zeneroli ML, Ricci P, Caselgrandi E, Ventura E. Down regulation of striatal dopamine receptors in experimental hepatic encephalopathy. Life Sci. 1983 Mar 28;32(13):1417-25.**

**Baraldi M, Zeneroli ML, Ventura E, Penne A, Pinelli G, Ricci P, Santi M. Supersensitivity of benzodiazepine receptors in hepatic encephalopathy due to fulminant hepatic failure in the rat: reversal by a benzodiazepine antagonist. Clin Sci (Lond). 1984 Aug;67(2):167-75.**

**Bashir ZI, Jane DE, Sunter DC, Watkins JC, Collingridge GL. Metabotropic glutamate receptors contribute to the induction of long-term depression in the CA1 region of the hippocampus. Eur J Pharmacol. 1993 Aug 3;239(1-3):265-6.**

**Batchelor AM, Garthwaite J. Novel synaptic potentials in cerebellar Purkinje cells: probable mediation by metabotropic glutamate receptors. Neuropharmacology. 1993 Jan;32(1):11-20.**

**Belanger M, Cote J, Butterworth RF. Neurobiological characterization of an azoxymethane mouse model of acute liver failure. Neurochem Int. 2006 May-Jun;48(6-7):434-40.**

**Bengtsson F, Nobin A, Falck B, Gage FH, Jeppsson B. Portacaval shunt in the rat: selective alterations in behavior and brain serotonin. Pharmacol Biochem Behav. 1986; 24(6): 1611-6.**

**Bergeron M, Reader TA, Layrargues GP, Butterworth RF. Monoamines and metabolites in autopsied brain tissue from cirrhotic patients with hepatic encephalopathy. Neurochem Res. 1989 Sep;14(9):853-9.**

**Bergqvist PB, Vogels BA, Bosman DK, Maas MA, Hjorth S, Chamuleau RA, Bengtsson F. Neocortical dialysate monoamines of rats after acute, subacute, and chronic liver shunt. J Neurochem. 1995 Mar;64(3):1238-44.**

**Bleakman D, Rusin KI, Chard PS, Glaum SR, Miller RJ. Metabotropic glutamate receptors potentiate ionotropic glutamate responses in the rat dorsal horn. Mol Pharmacol. 1992 Aug;42(2):192-6.**

**Bordi F, Ugolini A. Group I metabotropic glutamate receptors: implications for brain diseases. Prog Neurobiol. 1999 Sep;59(1):55-79.**

**Bouyer JJ, Park DH, Joh TH, Pickel VM. Chemical and structural analysis of the relation between cortical inputs and tyrosine hydroxylase-containing terminals in rat neostriatum. Brain Res. 1984 Jun 8;302(2):267-75.**

**Brandstatter JH, Koulen P, Kuhn R, van der Putten H, Wassle H. Compartmental localization of a metabotropic glutamate receptor (mGluR7): two different active sites at a retinal synapse. J Neurosci. 1996 Aug 1;16(15):4749-56.**

**Bruton RK, Ge J, Barnes NM. Group I mGlu receptor modulation of dopamine release in the rat striatum in vivo. Eur J Pharmacol. 1999 Mar 19;369(2):175-81.**

**Burkhard PR, Delavelle J, Du Pasquier R, Spahr L. (2003) Chronic parkinsonism associated with cirrhosis: a distinct subset of acquired hepatocerebral degeneration. Arch Neurol. 60(4):521-8.**

**Butterworth RF. Pathogenesis and treatment of portal-systemic encephalopathy: an update. Dig Dis Sci. 1992 Mar;37(3):321-7.**

**Butterworth RF. Hepatic encephalopathy: a neuropsychiatric disorder involving multiple neurotransmitter systems. Curr Opin Neurol. 2000 Dec;13(6):721-7.**

**Butterworth RF, Giguere JF. Cerebral aminoacids in portal-systemic encephalopathy: lack of evidence for altered gamma-aminobutyric acid (GABA) function. Metab Brain Dis. 1986 Sep;1(3):221-8.**

**Butterworth RF, Girard G, Giguere JF. Regional differences in the capacity for ammonia removal by brain following portocaval anastomosis. J Neurochem. 1988 Aug;51(2):486-90.**

**Butterworth RF, Lavoie J, Giguere JF, Pomier-Layrargues G. Affinities and densities of high-affinity [3H]muscimol (GABA-A) binding sites and of central benzodiazepine receptors are unchanged in autopsied brain tissue from cirrhotic patients with hepatic encephalopathy. Hepatology. 1988 Sep-Oct;8(5):1084-8.**

**Cadranel JF, Lebiez E, Di Martino V, Bernard B, El Koury S, Tourbah A,**



**Pidoux B, Valla D, Opolon P. Focal neurological signs in hepatic encephalopathy in cirrhotic patients: an underestimated entity? Am J Gastroenterol. 2001 Feb;96(2):515-8.**

**Canales JJ, Elayadi A, Errami M, Llansola M, Cauli O, Felipo V. (2003) Chronic hyperammonemia alters motor and neurochemical responses to activation of group I metabotropic glutamate receptors in the nucleus accumbens in rats in vivo. Neurobiol Dis. 14(3):380-90.**

**Carlsson A. On the neuronal circuitries and neurotransmitters involved in the control of locomotor activity. J Neural Transm Suppl. 1993;40:1-12.**

**Cartmell J, Schoepp DD. Regulation of neurotransmitter release by metabotropic glutamate receptors. J Neurochem. 2000 Sep;75(3):889-907.**

**Catafau AM, Kulisevsky J, Berna L, Pujol J, Martin JC, Otermin P, Balanzo J, Carrio I. Relationship between cerebral perfusion in frontal-limbic-basal ganglia circuits and neuropsychologic impairment in patients with subclinical hepatic encephalopathy. J Nucl Med. 2000 Mar;41(3):405-10.**

**Cauli O, Llansola M, Rodrigo R, Mili NE, Errami M, Felipo V. Altered modulation of motor activity by group I metabotropic glutamate receptors in the nucleus accumbens in hyperammonemic rats. Metab Brain Dis. 2005 Dec;20(4):347-58.**

**Clemmensen, J.O., Larsen, F.S., Kondrup, J., Hansen, B.A., and Ott, P. (1999). Cerebral herniation in patients with acute liver is correlated with arterial ammonia concentration. *Hepatology* 29:648–653.**

**Coccarello R, Breyse N, Amalric M. Simultaneous blockade of adenosine A2A and metabotropic glutamate mGlu5 receptors increase their efficacy in reversing Parkinsonian deficits in rats. *Neuropsychopharmacology*. 2004 Aug;29(8):1451-61.**

**Colwell CS, Levine MS. Metabotropic glutamate receptors modulate N-methyl-D-aspartate receptor function in neostriatal neurons. *Neuroscience*. 1994 Aug;61(3):497-507.**

**Conn PJ, Battaglia G, Marino MJ, Nicoletti F. Metabotropic glutamate receptors in the basal ganglia motor circuit. *Nat Rev Neurosci*. 2005 Oct;6(10):787-98.**

**Conn HO, Lieberthal MM. The hepatic coma syndromes and lactulose. Baltimore: Williams and Wilkins, 1979.**

**Conquet F, Bashir ZI, Davies CH, Daniel H, Ferraguti F, Bordi F, Franz-Bacon K, Reggiani A, Matarese V, Conde F, et al. Motor deficit and impairment of synaptic plasticity in mice lacking mGluR1. *Nature*. 1994 Nov 17;372(6503):237-43.**

**Cordoba J, Sanpedro F, Alonso J, Rovira A. 1H magnetic resonance in the study of hepatic encephalopathy in humans. *Metab Brain Dis*. 2002 Dec;17(4):415-29.**

**Cordoba J, Ragner N, Flavia M, Vargas V, Jacas C, Alonso J, Rovira A. T2 hyperintensity along the cortico-spinal tract in cirrhosis relates to functional abnormalities. Hepatology. 2003 Oct;38(4):1026-33.**

**Chan CY, Huang SW, Wang TF, Lu RH, Lee FY, Chang FY, Chu CJ, Chen YC, Chan CC, Huang HC, Lee SD. Lack of detrimental effects of nitric oxide inhibition in bile ductligated rats with hepatic encephalopathy. Eur J Clin Invest. 2004 Feb;34(2):122-8.**

**Chesselet MF. Presynaptic regulation of neurotransmitter release in the brain: facts and hypothesis. Neuroscience. 1984 Jun;12(2):347-75.**

**Choi DW. Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. Neuron. 1988 Oct;1(8):623-34.**

**Chu CJ, Chen CT, Wang SS, Lee FY, Chang FY, Lin HC, Wu SL, Lu RH, Chan CC, Huang HC, Lee SD. Hepatic encephalopathy in rats with thioacetamide-induced fulminant hepatic failure: role of endotoxin and tumor necrosis factor-alpha. Zhonghua Yi Xue Za Zhi (Taipei). 2001 Jun;64(6):321-30.**

**Churchill L, Zahm DS, Kalivas PW. The mediodorsal nucleus of the thalamus in rats—I. forebrain gabaergic innervation. Neuroscience. 1996 Jan;70(1):93-102**

**Dalezios Y, Lujan R, Shigemoto R, Roberts JD, Somogyi P. Enrichment of mGluR7a in the presynaptic active zones of GABAergic and non-**

**GABAergic terminals on interneurons in the rat somatosensory cortex. Cereb Cortex. 2002 Sep;12(9):961-74.**

**Damsma G, Pfaus JG, Wenkstern D, Phillips AG, Fibiger HC. Sexual behavior increases dopamine transmission in the nucleus accumbens and striatum of male rats: comparison with novelty and locomotion. Behav Neurosci. 1992 Feb;106(1):181-91.**

**Datta DV, Singh S, Nair R, Chhuttani PN, Nair CR. Hepatic bromsulphthalein-glutathione conjugating enzyme activity in patients with liver disease with particular reference to effects of enzyme inducer. Indian J Med Res. 1976 Jul;64(7):1070-6.**

**Ehrlich M, Plum F, Duffy TE. Blood and brain ammonia concentrations after portacaval anastomosis. Effects of acute ammonia loading. J Neurochem. 1980 Jun;34(6):1538-42.**

**Felipo V, Butterworth RF. Neurobiology of ammonia. Prog Neurobiol. 2002 Jul;67(4):259-79**

**Felipo V, Minana MD, Grisolia S. Paradoxical protection of both protein-free and high protein diets against acute ammonium intoxication. Biochem Biophys Res Commun. 1988 Oct 14;156(1):506-10.**

**Ferenci P. Pathophysiology of hepatic encephalopathy. Hepatogastroenterology. 1991 Oct;38(5):371-6. Review.**

**Ferenci P, Lockwood A, Mullen K, Tarter R, Weissenborn K, Blei AT. Hepatic encephalopathy—definition, nomenclature, diagnosis, and**

quantification:final report of the working party at the 11th World Congresses of Gastroenterology, Vienna, 1998. *Hepatology*. 2002 Mar;35(3):716-21.

Floresco SB, Seamans JK, Phillips AG. Differential effects of lidocaine infusions into the ventral CA1/subiculum o the nucleus accumbens on the acquisition and retention of spatial information. *Behav Brain Res*. 1996 Nov;81(1-2):163-71.

Freund HJ. Clinical aspects of premotor function. *Behav Brain Res*. 1985 Nov-Dec;18(2):187-91.

Frisell WR. Synthesis and catabolism of nucleotides. In: Frisell WR, ed. *Human biochemistry*. New York: Mac- Millan, 1982:292-304.

Gammal SH, Basile AS, Geller D, Skolnick P, Jones EA. Reversal of the behavioral and electrophysiological abnormalities of an animal model of hepatic encephalopathy by benzodiazepine receptor ligands. *Hepatology*. 1990 Mar;11(3):371-8.

Garcia-Rill E. The basal ganglia and the locomotor regions. *Brain Res*. 1986 Mar;396(1):47-63.

Gazzard BG, Price H, Dawson AM. Detection of hepatic encephalopathy. *Postgrad Med J*. 1986 Mar;62(725):163-6.

Gereau RW 4th, Conn PJ. Multiple presynaptic metabotropic glutamate receptors modulate excitatory and inhibitory synaptic transmission in hippocampal area CA1. *J Neurosci*. 1995 Oct;15(10):6879-89.

**Gibson GE, Zimber A, Krook L, Richardson EP, Vissek WJ. Brain histology and behavior of mice injected with urease J Neuropathol Exp Neurol. 1974 Apr;33(2):201-11.**

**Glaum SR, Miller RJ. Metabotropic glutamate receptors mediate excitatory transmission in the nucleus of the solitary tract. J Neurosci. 1992 Jun;12(6):2251-8.**

**Graybiel AM. Neurochemically specified subsystems in the basal ganglia. Ciba Found Symp. 1984;107:114-49.**

**Greenamyre JT, Porter RH. Anatomy and physiology of glutamate in the CNS. Neurology. 1994 Nov;44(11 Suppl 8):S7-13.**

**Greenslade RG, Mitchell SN. Selective action of (-)-2-oxa-4-aminobicyclo[3.1.0]hexane-4,6-dicarboxylate (LY379268), a group II metabotropic glutamate receptor agonist, on basal and phencyclidine-induced dopamine release in the nucleus accumbens shell. Neuropharmacology. 2004 Jul;47(1):1-8.**

**Grippon P, Le Poncin Lafitte M, Boschhat M, Wang S, Faure G, Dutertre D, Opolon P. Evidence for the role of ammonia in the intracerebral transfer and metabolism of tryptophan. Hepatology. 1986 Jul-Aug;6(4):682-6.**

**Guo W, Wei F, Zou S, Robbins MT, Sugiyo S, Ikeda T, Tu JC, Worley PF, Dubner R, Ren K. Group I metabotropic glutamate receptor NMDA receptor coupling and signalling cascade mediate spinal dorsal horn**

**NMDA receptor 2B tyrosine phosphorylation associated with inflammatory hyperalgesia. J Neurosci. 2004 Oct 13;24(41):9161-73.**

**Ha JH, Basile AS. Modulation of ligand binding to components of the GABAA receptor complex by ammonia: implications for the pathogenesis of hyperammonemic syndromes. Brain Res. 1996 May 13;720(1-2):35-44.**

**Hauber W. Involvement of basal ganglia transmitter systems in movement initiation. Prog Neurobiol. 1998 Dec;56(5):507-40.**

**Hauser RA, Zesiewicz TA, Rosemurgy AS, Martinez C, Olanow CW. Manganese intoxication and chronic liver failure. Ann Neurol. 1994 Dec;36(6):871-5.**

**Hawkins RA, Mans AM. Brain metabolism in encephalopathy caused by hyperammonemia. Adv Exp Med Biol. 1994;368:11-21. Review.**

**Hermenegildo C, Marcaida G, Montoliu C, Grisolia S, Minana MD, Felipo V. NMDA receptor antagonists prevent acute ammonia toxicity in mice. Neurochem Res. 1996 Oct;21(10):1237-44.**

**Hermenegildo C, Montoliu C, Llansola M, Munoz MD, Gaztelu JM, Minana MD, Felipo V. Chronic hyperammonemia impairs the glutamate-nitric oxide-cyclic GMP pathway in cerebellar neurons in culture and in the rat in vivo. Eur J Neurosci. 1998 Oct;10(10):3201-9.**

**Herrero I, Miras-Portugal MT, Sanchez-Prieto J. Positive feedback of glutamate exocytosis by metabotropic presynaptic receptor stimulation. Nature. 1992 Nov 12;360(6400):163-6.**

**Herrero Hernandez E, Valentini MC, Discalzi G. T1-weighted hyperintensity in basal ganglia at brain magnetic resonance imaging: are different pathologies sharing a common mechanism? Neurotoxicology. 2002 Dec;23(6):669-74.**

**Hilsabeck RC, Perry W, Hassanein TI. Neuropsychological impairment in patients with chronic hepatitis C. Hepatology. 2002 Feb;35(2):440-6.**

**Holler T, Cappel E, Klein J, Loffelholz K. Glutamate activates phospholipase D in hippocampal slices of newborn and adult rats. J Neurochem. 1993 Oct;61(4):1569-72.**

**Hopkins KJ, Oster-Granite ML. Characterization of N-methyl-D-aspartate receptors in the hyperammonemic sparse-fur mouse. Brain Res. 1998 Jun 29;797(2):209-17.**

**Hu G, Duffy P, Swanson C, Ghasemzadeh MB, Kalivas PW. The regulation of dopamine transmission by metabotropic glutamate receptors. J Pharmacol Exp Ther. 1999 Apr;289(1):412-6.**

**Joebges EM, Heidemann M, Schimke N, Hecker H, Ennen JC, Weissenborn K.**

**Bradykinesia in minimal hepatic encephalopathy is due to disturbances in movement initiation. J Hepatol. 2003 Mar;38(3):273-80.**



**Jongen-Relo AL, Kaufmann S, Feldon J. A differential involvement of the shell and core subterritories of the nucleus accumbens of rats in memory processes. Behav Neurosci. 2003 Feb;117(1):150-68.**

**Jellinger K, Riederer P, Rausch WD, Kothbauer P. Brain monoamines in hepatic encephalopathy and other types of metabolic coma. J Neural Transm Suppl. 1978;(14):103-20.**

**Jones EA, Weissenborn K. Neurology and the liver. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 1997 Sep;63(3):279-93.**

**Johnson JW, Ascher P. Glycine potentiates the NMDA response in cultured mouse brain neurons. Nature. 1987 Feb 5-11;325(6104):529-31.**

**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. Am J Gastroenterol 98(7):1599-604.**

**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. Clinical significance of extrapyramidal signs in patients with cirrhosis. J Hepatol. 2005 May;42(5):659-65.**

**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. Brain edema and inflammatory activation in bile duct ligated rats with**

**diet-induced hyperammonemia: A model of hepatic encephalopathy in cirrhosis. *Hepatology*. 2006 Jun;43(6):1257-66.**

**Kachroo A, Orlando LR, Grandy DK, Chen JF, Young AB, Schwarzschild MA. Interactions between metabotropic glutamate 5 and adenosine A2A receptors in normal and parkinsonian mice. *J Neurosci*. 2005 Nov 9;25(45):10414-9.**

**Karasawa J, Yoshimizu T, Chaki S. A metabotropic glutamate 2/3 receptor antagonist, MGS0039, increases extracellular dopamine levels in the nucleus accumbens shell. *Neurosci Lett*. 2006 Jan 30;393(2-3):127-30.**

**Katz PS. Neurons, networks, and motor behavior. *Neuron*. 1996 Feb;16(2):245-53.**

**Kaur S, Ozer H, Starr M. MK 801 reverses haloperidol-induced catalepsy from both striatal and extrastriatal sites in the rat brain. *Eur J Pharmacol*. 1997 Aug 6;332(2):153-60.**

**Kearney JA, Frey KA, Albin RL. Metabotropic glutamate agonist-induced rotation: a pharmacological, FOS immunohistochemical, and [14C]-2-deoxyglucose autoradiographic study. *J Neurosci*. 1997 Jun 1;17(11):4415-25.**

**Kemp JM, Powell TP. The termination of fibres from the cerebral cortex and thalamus upon dendritic spines in the caudate nucleus: a study with the Golgi method. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 1971 Sep 30;262(845):429-39**

**Kerner JA, Standaert DG, Penney JB Jr, Young AB, Landwehrmeyer GB. Expression of group one metabotropic glutamate receptor subunit mRNAs in neurochemically identified neurons in the rat neostriatum, neocortex, and hippocampus. Brain Res Mol Brain Res. 1997 Sep;48(2):259-69.**

**Kim DK, Rordorf G, Nemenoff RA, Koroshetz WJ, Bonventre JV. Glutamate stably enhances the activity of two cytosolic forms of phospholipase A2 in brain cortical cultures. Biochem J. 1995 Aug 15;310 ( Pt 1):83-90.**

**Knell AJ, Davidson AR, Williams R, Kantamaneni BD, Curzon G. Dopamine and serotonin metabolism in hepatic encephalopathy. Med J. 1974 Mar 23;1(907):549-51.**

**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(1):147-55.**

**Kulisevsky J, Pujol J, Balanzo J, Junque C, Deus J, Capdevilla A, Villanueva C. (1992) Pallidal hyperintensity on magnetic resonance imaging in cirrhotic patients: clinical correlations. Hepatology. 16(6): 1382-8.**

**Layrargues GP. (2001) Movement dysfunction and hepatic encephalopathy. Metab Brain Dis. 16(1-2): 27-35.**

**Lee SH, Fisher B. Portacaval shunt in the rat. Surgery. 1961 Oct;50:668-72.**

**Lehman J, Langer SZ. The striatal cholinergic interneurons; Synaptic target of dopaminergic terminals? Neuroscience 1983;10:1105-1120**

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

**Lockwood AH. "What's in a name?" Improving the care of cirrhotics. J Hepatol. 2000 May;32(5):859-61.**

**Lockwood AH, Weissenborn K, Butterworth RF. An image of the brain in patients with liver disease. Curr Opin Neurol. 1997 Dec;10(6):525-33. Review.**

**Lockwood AH, Murphy BW, Donnelly KZ, Mahl TC, Perini S. Positron-emission tomographic localization of abnormalities of brain metabolism in patients with minimal hepatic encephalopathy. Hepatology. 1993 Nov;18(5):1061-8.**

**Lozeva V, Montgomery JA, Tuomisto L, Rocheleau B, Pannunzio M, Huet PM, Butterworth RF. Increased brain serotonin turnover correlates with the degree of shunting and hyperammonemia in rats following variable portal vein stenosis. Hepatol. 2004 May;40(5):742-8.**

**Lombardi G, Mannaioni G, Leonardi P, Cherici G, Carla V, Moroni F. Ammonium acetate inhibits ionotropic receptors and differentially affects metabotropic receptors for glutamate. J Neural Transm Gen Sect. 1994;97(3):187-96.**

**Lujan R, Nusser Z, Roberts JD, Shigemoto R, Somogyi P. Perisynaptic location of metabotropic glutamate receptors mGluR1 and mGluR5 on dendrites and dendritic spines in the rat hippocampus. Eur J Neurosci. 1996 Jul;8(7):1488-500.**

**Lujan R, Roberts JD, Shigemoto R, Ohishi H, Somogyi P. Differential plasma membrane distribution of metabotropic glutamate receptors mGluR1 alpha, mGluR2 and mGluR5, relative to neurotransmitter release sites. J Chem Neuroanat. 1997 Oct;13(4):219-41.**

**Maddison JE, Dodd PR, Johnston GA, Farrell GC. Brain gamma-aminobutyric acid receptor binding is normal in rats with thioacetamide-induced hepatic encephalopathy despite elevated plasma gamma-aminobutyric acid-like activity. Gastroenterology. 1987 Nov;93(5):1062-8.**

**Maeda H, Sato M, Yoshikawa A, Kimura M, Sonomura T, Terada M, Kishi K. (1997) Brain MR imaging in patients with hepatic cirrhosis: relationship between high intensity signal in basal ganglia on T1-weighted images and elemental concentrations in brain. Neuroradiology. 39(8):546-50.**

**Maldonado-Irizarry CS, Swanson CJ, Kelley AE. Glutamate receptors in the nucleus accumbens shell control feeding behavior via the lateral hypothalamus J Neurosci. 1995 Oct;15(10):6779-88.**

**Martinez-Hernandez A, Bell KP, Norenberg MD. Glutamine synthetase: glial localization in brain. Science. 1977 Mar 25;195(4284):1356-8.**

**Mans AM, Consevage MW, DeJoseph MR, Hawkins RA. Regional brain monoamines and their metabolites after portacaval shunting. etab Brain Dis. 1987 Sep;2(3):183-93**

**Mans AM, Hawkins RA. Brain monoamines after portacaval anastomosis.**

**Metab Brain Dis. 1986 Mar;1(1):45-52.**

**Marchesini G, Bianchi G, Amodio P, Salerno F, Merli M, Panella C, Loguercio C, Apolone G, Niero M, Abbiati R; Italian Study Group for quality of life in cirrhosis. Factors associated with poor health-related quality of life of patients with cirrhosis. Gastroenterology. 2001 Jan;120(1):170-8.**

**Marsden CD, Obeso JA. The functions of the basal ganglia and the paradox of stereotaxic surgery in Parkinson's disease. Brain. 1994 Aug;117 ( Pt 4):877-97.**

**Martin JR. Discordant motor activity levels of portacaval-shunted rats in runway and swim tests. Behav Neurosci. 1986; 100(3): 427-37.**

**Masu M, Nakajima Y, Moriyoshi K, Ishii T, Akazawa C, Nakanashi S. Molecular characterization of NMDA and metabotropic glutamate receptors. Ann N Y Acad Sci. 1993 Dec 20;707:153-64.**

**Masu M, Tanabe Y, Tsuchida K, Shigemoto R, Nakanishi S. Sequence and expression of a metabotropic glutamate receptor. Nature. 1991 Feb 28;349(6312):760-5.**

**Mateos JM, Benitez R, Elezgarai I, Azkue JJ, Lazaro E, Osorio A, Bilbao A, Donate F, Sarria R, Conquet F, Ferraguti F, Kuhn R, Knopfel T, Grandes P. Immunolocalization of the mGluR1b splice variant of the metabotropic glutamate receptor 1 at parallel fiber-Purkinje cell synapses in the rat cerebellar cortex. J Neurochem. 2000 Mar;74(3):1301-9.**

**Mayer ML, Westbrook GL, Guthrie PB. Voltage-dependent block by Mg<sup>2+</sup> of NMDA responses in spinal cord neurones. Nature. 1984 309(5965):261-3.**

**McCrea M, Cordoba J, Vessey G, Blei AT, Randolph C. Neuropsychological characterization and detection of subclinical hepatic encephalopathy. Arch Neurol. 1996 Aug;53(8):758-63.**

**McFarland K, Davidge SB, Lapish CC, Kalivas PW. Limbic and motor circuitry underlying footshock-induced reinstatement of cocaine-seeking behavior. J Neurosci. 2004 Feb 18;24(7):1551-60.**

**Mechtcheriakov S, Graziadei IW, Rettenbacher M, Schuster I, Hinterhuber H, Vogel W, Marksteiner J. Diagnostic value of fine motor**

deficits in patients with low-grade hepatic encephalopathy. *World J Gastroenterol.* 2005 May 14;11(18):2777-80.

Mechtcheriakov S, Graziadei IW, Kugener A, Wiedemann J, Galbavy C, Hinterhuber H, Marksteiner J, Vogel W. Multidimensional assessment of neuro-psychiatric symptoms in patients with low-grade hepatic encephalopathy: a clinical rating scale. *World J Gastroenterol.* 2005 Oct 7;11(37):5893-8.

Meeker D, Kim JH, Vezina P. Depletion of dopamine in the nucleus accumbens prevents the generation of locomotion by metabotropic glutamate receptor activation. *Brain Res.* 1998 Nov 23;812(1-2):260-4.

Michalak A, Butterworth RF. Ornithine transcarbamylase deficiency: pathogenesis of the cerebral disorder and new prospects for therapy. *Metab Brain Dis.* 1997 Sep;12(3):171-82.

Millan C, Lujan R, Shigemoto R, Sanchez-Prieto J. Subtype-specific expression of group III metabotropic glutamate receptors and Ca<sup>2+</sup> channels in single nerve terminals. *J Biol Chem.* 2002 Dec 6;277(49):47796-803

Miñana MD, Felipo V, Grisolia S. Protective effect of long term ammonium ingestion against acute ammonium intoxication. *Biochem Biophys Res Commun.* 1988 Jun 30;153(3):979-83.

Miñana MD, Llansola M, Hermenegildo C, Cucarella C, Montoliu C, Kosenko E, Grisolia S, Felipo V. Glutamate and muscarinic receptors in



**the molecular mechanisms of acute ammonia toxicity and of its prevention. *Adv Exp Med Biol.* 1997;420:45-56.**

**Mogenson GJ, Jones DL, Yim CY. From motivation to action: functional interface between the limbic system and the motor system. *Prog Neurobiol.* 1980;14(2-3):69-97.**

**Monfort P, Munoz MD, ElAyadi A, Kosenko E, Felipo V. Effects of hyperammonemia and liver failure on glutamatergic neurotransmission. *Metab Brain Dis.* 2002 Dec;17(4):237-50.**

**Morgan MY. (1998) Cerebral magnetic resonance imaging in patients with chronic liver disease. *Metab Brain Dis.* 13(4):273-90.**

**Mousseau DD, Perney P, Layrargues GP, Butterworth RF. Selective loss of pallidal dopamine D2 receptor density in hepatic encephalopathy. *Neurosci Lett.* 1993 Nov 12;162(1-2):192-6.**

**Msall M, Batshaw ML, Suss R, Brusilow SW, Mellits ED. Neurologic outcome in children with inborn errors of urea synthesis. Outcome of urea-cycle enzymopathies. *N Engl J Med.* 1984 Jun 7;310(23):1500-5.**

**Nicolao F, Efrati C, Masini A, Merli M, Attili AF, Riggio O. (2003) Role of determination of partial pressure of ammonia in cirrhotic patients with and without hepatic encephalopathy. *J Hepatol.* 38(4):441-6.**

**Nicoletti F, Bruno V, Catania MV, Battaglia G, Copani A, Barbagallo G, Cena V, Sanchez-Prieto J, Spano PF, Pizzi M. Group-I metabotropic glutamate receptors: hypotheses to explain their dual role in**

neurotoxicity and neuroprotection. *Neuropharmacology*. 1999 Oct;38(10):1477-84.

Nolano M, Guardascione MA, Amitrano L, Perretti A, Fiorillo F, Ascione A, Santoro L, Caruso G. (1997) Cortico-spinal pathways and inhibitory mechanisms in hepatic encephalopathy. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*. 105(1):72-8.

Norton NS, McConnell JR, Zetterman RK, Rodriguez-Sierra JF. (1994) A quantitative evaluation of magnetic resonance image signal changes of the brain in chronic hepatic encephalopathy. *J Hepatol*. 21(5):764-70.

Norenberg MD. The role of astrocytes in hepatic encephalopathy. *Neurochem Pathol*. 1987 Feb-Apr;6(1-2):13-33.

Norenberg MD, Huo Z, Neary JT, Roig-Cantesano A. The glial glutamate transporter in hyperammonemia and hepatic encephalopathy:relation to energy metabolism and glutamatergic neurotransmission. *Glia*. 1997 Sep;21(1):124-33.

Norenberg MD, Martinez-Hernandez A. Fine structural localization of glutamine synthetase in astrocytes of rat brain. *Brain Res*. 1979 Feb 2;161(2):303-10.

Nowak L, Bregestovski P, Ascher P, Herbet A, Prochiantz A. Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurones. *Nature*. 1984 Feb 2-8;307(5950):462-5.

**Okada D. Two pathways of cyclic GMP production through glutamate receptor-mediated nitric oxide synthesis. J Neurochem. 1992 Oct;59(4):1203-10.**

**Ong JP, Aggarwal A, Krieger D, Easley KA, Karafa MT, Van Lente F, Arroliga AC, Mullen KD. (2003) Correlation between ammonia levels and the severity of hepatic encephalopathy. Am J Med. 15;114(3):188-93.**

**Oueslati A, Breyse N, Amalric M, Kerkerian-Le Goff L, Salin P. Dysfunction of the cortico-basal ganglia-cortical loop in a rat model of early parkinsonism is reversed by metabotropic glutamate receptor 5 antagonism. Eur J Neurosci. 2005 Dec;22(11):2765-74**

**Owens MJ and Risch SC (1998) Atypical antipsychotics, in Textbook of Psychopharmacology (Schatzberg AF and Nemeroff CB eds) pp 323-348, The American Psychiatric Press, Washington, DC.**

**Pahapill PA, Lozano AM. The pedunculopontine nucleus and Parkinson's disease. Brain. 2000 Sep;123 ( Pt 9):1767-83.**

**Paquet M, Smith Y. Group I metabotropic glutamate receptors in the monkey striatum: subsynaptic association with glutamatergic and dopaminergic afferents. J Neurosci. 2003 Aug 20;23(20):7659-69.**

**Parent A, Ciccetti. The current model of basal ganglia organization under scrutiny. Movement Disorders 1998; 13:199-202**

**Parent A, Hazrati L-N. Functional anatomy of the basal ganglia. I. The cortico-basal ganglia-thalamo-cortical loop. Brain Res Rev 1995;20:91-127.**

**Park SA, Heo K. (2004) Prominent cerebellar symptoms with unusual magnetic resonance imaging findings in acquired hepatocerebral degeneration. Arch Neurol. 61(9):1458-60.**

**Paul F, Muller J, Christe W, Steinmuller T, Poewe W, Wissel J. Postural hand tremor before and following liver transplantation and immunosuppression with cyclosporine or tacrolimus in patients without clinical signs of hepatic encephalopathy. Clin Transplant. 2004 Aug;18(4):429-33.**

**Paxinos and C. Watson. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. , Academic Press, New York. 1996.**

**Peterson C, Giguere JF, Cotman CW, Butterworth RF. Selective loss of N-methyl-D-aspartate-sensitive L-[3H]glutamate binding sites in rat brain following portacaval anastomosis. J Neurochem. 1990 Aug;55(2):386-90.**

**Pin JP, Duvoisin R. The metabotropic glutamate receptors: structure and functions. Neuropharmacology. 1995 Jan;34(1):1-26.**

**Powell EE, Pender MP, Chalk JB, Parkin PJ, Strong R, Lynch S, Kerlin P, Cooksley WG, Cheng W, Powell LW. (1990) Improvement in chronic hepatocerebral degeneration following liver transplantation. Gastroenterology. 98(4):1079-82**

**Prezeau L, Manzoni O, Homburger V, Sladeczek F, Curry K, Bockaert J. Characterization of a metabotropic glutamate receptor: direct negative coupling to adenylyl cyclase and involvement of a pertussis toxin-sensitive G protein. Proc Natl Acad Sci U S A. 1992 Sep 1;89(17):8040-4.**

**Puca FM, Antonaci F, Panella C, Guglielmi FW, Barone M, Francavilla A, Cerutti R. Psychomotor dysfunctions in alcoholic and post-necrotic cirrhotic patients without overt encephalopathy. Acta Neurol Scand. 1989 Apr;79(4):280-7.**

**Pycock CJ, Dawbarn D. Acute motor effects of N-methyl-D-aspartic acid and kainic acid applied focally to mesencephalic dopamine cell body regions in the rat. Neurosci Lett. 1980 May 15;18(1):85-90.**

**Rai GS, Buxton-Thomas M, Scanlon M. Ocular bobbing in hepatic encephalopathy. Br J Clin Pract. 1976 Oct;30(10):202-5.**

**Rodriguez-Moreno A, Sistiaga A, Lerma J, Sanchez-Prieto J. Switch from facilitation to inhibition of excitatory synaptic transmission by group I mGluR desensitization. Neuron. 1998 Dec;21(6):1477-86.**

**Rehnstrom S, Simert G, Hansson JA, Johnson G, Vang J. Chronic hepatic encephalopathy. A psychometrical study. Scand J Gastroenterol. 1977;12(3):305-11.**

**Robbins TW, Everitt BJ. Functional studies of the central catecholamines. Int Rev Neurobiol. 1982;23:303-65.**

**Romero-Gomez M, Ramos-Guerrero R, Grande L, de Teran LC, Corpas R, Camacho I, Bautista JD. Intestinal glutaminase activity is increased in liver cirrhosis and correlates with minimal hepatic encephalopathy. J Hepatol. 2004 Jul;41(1):49-54.**

**Rose C, Butterworth RF, Zayed J, Normandin L, Todd K, Michalak A, Spahr L, Huet PM, Pomier-Layrargues G. Manganese deposition in basal ganglia structures results from both portal-systemic shunting and liver dysfunction. Gastroenterology. 1999 Sep;117(3):640-4.**

**Roy S, Pomier-Layrargues G, Butterworth RF, Huet PM. Hepatic encephalopathy in cirrhotic and portacaval shunted dogs: lack of changes in brain GABA uptake, brain GABA levels, brain glutamic acid decarboxylase activity and brain postsynaptic GABA receptors. Hepatology. 1988 Jul-Aug;8(4):845-9.**

**Saez R, Llansola M, Felipe V. Chronic exposure to ammonia alters pathways modulating phosphorylation of microtubule-associated protein 2 in cerebellar neurons in culture. J Neurochem. 1999 Dec;73(6):2555-62.**

**Schafer DF, Jones EA. Hepatic encephalopathy and the gamma-aminobutyric-acid neurotransmitter system. Lancet. 1982 Jan 2;1(8262):18-20.**

**Schoepp DD, Johnson BG, Salhoff CR, Valli MJ, Desai MA, Burnett JP, Mayneb NG, Monn JA. Selective inhibition of forskolin-stimulated cyclic**

**AMP formation in rat hippocampus by a novel mGluR agonist, 2R,4R-4-aminopyrrolidine-2,4-dicarboxylate. Neuropharmacology. 1995 Aug;34(8):843-50.**

**Schomerus H, Hamster W. Neuropsychological aspects of portal-systemic encephalopathy. Metab Brain Dis. 1998 Dec;13(4):361-77.**

**Schomerus H, Hamster W. Quality of life in cirrhotics with minimal hepatic encephalopathy. Metab Brain Dis. 2001 Jun;16(1-2):37-41.**

**Schultz W, Apicella P, Scarnati E, Ljungberg T. Neuronal activity in monkey ventral striatum related to the expectation of reward. J Neurosci. 1992 Dec;12(12):4595-610.**

**Sergeeva OA, Schulz D, Doreulee N, Ponomarenko AA, Selbach O, Borsch E, Kircheis G, Huston JP, Haussinger D, Haas HL. Deficits in cortico-striatal synaptic plasticity and behavioral habituation in rats with portacaval anastomosis. Neuroscience. 2005;134(4):1091-8.**

**Shah NJ, Neeb H, Zaitsev M, Steinhoff S, Kircheis G, Amunts K, Haussinger D, Zilles K. (2003) Quantitative T1 mapping of hepatic encephalopathy using magnetic resonance imaging. Hepatology. 38(5):1219-26.**

**Shigemoto R, Kinoshita A, Wada E, Nomura S, Ohishi H, Takada M, Flor PJ, Neki A, Abe T, Nakanishi S, Mizuno N. Differential presynaptic localization of metabotropic glutamate receptor subtypes in the rat hippocampus. J Neurosci. 1997 Oct 1;17(19):7503-22.**

**Skehan S, Norris S, Hegarty J, Owens A, MacErlaine D. (1997) Brain MRI changes in chronic liver disease. Eur Radiol. 7(6):905-9.**

**Slowik A, Ciecko-Michalska I, Bogdal J, Szczudlik A. The diagnosis of subclinical hepatic encephalopathy. Przegl Lek. 2001;58(12):1059-62.**

**Somogyi P, Dalezios Y, Lujan R, Roberts JD, Watanabe M, Shigemoto R. High level of mGluR7 in the presynaptic active zones of select populations of GABAergic terminals innervating interneurons in the rat hippocampus. Eur J Neurosci. 2003 Jun;17(12):2503-20.**

**Spahr L, Butterworth RF, Fontaine S, Bui L, Therrien G, Milette PC, Lebrun LH, Zayed J, Leblanc A, Pomier-Layrargues G. Increased blood manganese in cirrhotic patients: relationship to pallidalmagnetic resonance signal hyperintensity and neurological symptoms. Hepatology. 1996 Nov;24(5):1116-20.**

**Spahr L, Vingerhoets F, Lazeyras F, Delavelle J, DuPasquier R, Giostra E, Mentha G, Terrier F, Hadengue A. Magnetic resonance imaging and proton spectroscopic alterations correlate with parkinsonian signs in patients with cirrhosis. Gastroenterology. 2000 Sep;119(3):774-81.**

**Spanagel R, Weiss F. The dopamine hypothesis of reward: past and current status. Trends Neurosci. 1999 Nov;22(11):521-7.**

**Steindl P, Puspok A, Druml W, Ferenci P. Beneficial effect of pharmacological modulation of the GABAA-benzodiazepine receptor on hepatic encephalopathy in the rat: comparison with uremic encephalopathy. Hepatology. 1991 Dec;14(6):963-8.**



**Steindl PE, Coy DL, Finn B, Zee PC, Blei AT. A low-protein diet ameliorates disrupted diurnal locomotor activity in rats after portacaval anastomosis. Am J Physiol. 1996 ; 271(4 Pt 1): G555-60.**

**Stell R, Davis S, Carroll WM. Unilateral asterixis due to a lesion of the ventrolateral thalamus. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 1994 Jul;57(7):878-80.**

**Suarez I, Bodega G, Fernandez B. Modulation of glutamate transporters (GLAST, GLT-1 and EAAC1) in the rat cerebellum following portocaval anastomosis. Brain Res. 2000 Mar 24;859(2):293-302.**

**Swanson CJ, Kalivas PW. Regulation of locomotor activity by metabotropic glutamate receptors in the nucleus accumbens and ventral tegmental area. J Pharmacol Exp Ther. 2000 Jan;292(1):406-14.**

**Tamaru Y, Nomura S, Mizuno N, Shigemoto R. Distribution of metabotropic glutamate receptor mGluR3 in the mouse CNS:differential location relative to pre- and postsynaptic sites.Neuroscience. 2001;106(3):481-503.**

**Tarter RE, Switala J, Plail J, Havrilla J, Van Thiel DH. (1992) Severity of hepatic encephalopathy before liver transplantation is associated with quality of life after transplantation. Arch Intern Med. 152(10):2097-101.**

**Taylor-Robinson SD, Oatridge A, Hajnal JV, Burroughs AK, McIntyre N, deSouza NM. (1995) MR imaging of the basal ganglia in chronic liver**

**disease: correlation of T1-weighted and magnetisation transfer contrast measurements with liver dysfunction and neuropsychiatric status. *Metab Brain Dis.* 10(2): 175-88**

**Taylor-Robinson SD, Sargentoni J, Oatridge A, Bryant DJ, Hajnal JV, Marcus CD, Seery JP, Hodgson HJ, deSouza NM (1996) MR imaging and spectroscopy of the basal ganglia in chronic liver disease: correlation of T1-weighted contrast measurements with abnormalities in proton and phosphorus-31 MR spectra. *Metab Brain Dis.* 11(3):249-68.**

**Testa CM, Standaert DG, Young AB, Penney JB Jr. (1994) Metabotropic glutamate receptor mRNA expression in the basal ganglia of the rat. *J Neurosci.* 14(5 Pt 2):3005-18.**

**Testa CM, Friberg IK, Weiss SW, Standaert DG. (1998) Immunohistochemical localization of metabotropic glutamate receptors mGluR1a and mGluR2/3 in the rat basal ganglia. *J Comp Neurol.* 390(1):5-19.**

**Theander B, Apelqvist G, Bugge M, Andersson G, Hindfelt B, Bengtsson F. Gender and diurnal effects on specific open-field behavioral patterns in the portacaval shunted rat. *Metab Brain Dis.* 1996 ; 12(1): 47-59.**

**Timmermann L, Butz M, Gross J, Kircheis G, Haussinger D, Schnitzler A. Neural synchronization in hepatic encephalopathy. *Metab Brain Dis.* 2005 Dec;20(4):337-46.**

**Timmermann L, Gross J, Butz M, Kircheis G, Haussinger D, Schnitzler A. Pathological oscillatory coupling within the human motor system in**

**different tremor syndromes as revealed by magnetoencephalography. *Neurol Clin Neurophysiol.* 2004 Nov 30;2004:26.**

**Timmermann L, Gross J, Kircheis G, Haussinger D, Schnitzler A. Cortical origin of mini-asterixis in hepatic encephalopathy. *Neurology.* 2002 Jan 22;58(2):295-8.**

**Ueki Y, Isozaki E, Miyazaki Y, Koide R, Shimizu T, Yagi K, Hirai S. (2002) Clinical and neuroradiological improvement in chronic acquired hepatocerebral degeneration after branched-chain amino acid therapy. *Acta Neurol Scand.* 106(2):113-6.**

**Uribe M, Marquez MA, Garcia-Ramos G, Escobedo V, Murillo H, Guevara L, Lisker R. Treatment of chronic portal-systemic encephalopathy with lactose in lactase-deficient patients. *Dig Dis Sci.* 1980 Dec;25(12):924-8.**

**Wang JQ, Mao L. Sustained behavioral stimulation following selective activation of group I metabotropic glutamate receptors in rat striatum. *Pharmacol Biochem Behav.* 2000 Mar;65(3):439-47.**

**Watanabe A. Portal-systemic encephalopathy in non-cirrhotic patients: classification of clinical types, diagnosis and treatment. *J Gastroenterol Hepatol.* 2000 Sep;15(9):969-79.**

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

**Weissenborn K, Ennen JC, Schomerus H, Ruckert N, Hecker H. Neuropsychological characterization of hepatic encephalopathy. Hepatol. 2001 May;34(5):768-73.**

**Weissenborn K, Kolbe H. (1998) The basal ganglia and portal-systemic encephalopathy. Metab Brain Dis. 13(4): 261-72**

**Winder DG, Smith T, Conn PJ. Pharmacological differentiation of metabotropic glutamate receptors coupled to potentiation of cyclic adenosine monophosphate responses and phosphoinositide hydrolysis. J Pharmacol Exp Ther. 1993 Aug;266(2):518-25.**

**Woodward DJ, Chang JY, Janak P, Azarov A, Anstrom K. Activity patterns in mesolimbic regions in rats during operant tasks for reward. Prog Brain Res. 2000;126:303-22.**

**Young WS 3rd, Alheid GF, Heimer L. The ventral pallidal projection to the mediodorsal thalamus: a study with fluorescent retrograde tracers and immunohistofluorescence. J Neurosci. 1984 Jun;4(6):1626-38.**

**Yano M, Adachi N, Liu K, Arai T. Flumazenil-induced improvement of the central dopaminergic system in rats with acute hepatic failure. J Neurosurg Anesthesiol. 2005 Apr;17(2):69-74.**

**Yen CL, Liaw YF. Somatosensory evoked potentials and number connection test in the detection of subclinical hepatic encephalopathy. Hepatogastroenterology. 1990 Jun;37(3):332-4.**

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

**Yurdaydin C, Herneth AM, Puspok A, Steindl P, Singer E, Ferenci P. Modulation of hepatic encephalopathy in rats with thioacetamide-induced acute liver failure by serotonin antagonists. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 1996 Jul;8(7):667-71.**

**Zahm DS, Williams E, Wohltmann C. Ventral striatopallidothalamic projection: IV. Relative involvements of neurochemically distinct subterritories in the ventral pallidum and adjacent parts of the rostroventral forebrain. *J Comp Neurol*. 1996 Jan 8;364(2):340-62.**

**Zeneroli ML, Cioni G, Crisi G, Vezzelli C, Ventura E. Globus pallidus alterations and brain atrophy in liver cirrhosis patients with encephalopathy: an MR imaging study. *Magn Reson Imaging*. 1991;9(3):295-302.**





