



Doctorado en Neurociencias

**Caracterización de la neuroinflamación en modelos  
animales y en pacientes con encefalopatía  
hepática. Implicaciones terapéuticas.**

**Autor**

Tiziano Balzano

**Directores**

Vicente Felipo

Marta Llansola

Jerónimo Forteza

**Tutor académico**

Carmina Montoliu

Julio 2017

# INDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
1.1. Encefalopatía Hepática.....	1
1.2. Patogénesis.....	2
1.2.1. Hígado.....	3
1.2.2. Esteatosis hepática .....	7
1.2.3. Esteatohepatitis.....	10
1.2.4. Fibrogénesis hepática, regeneración hepatocelular y progresión a cirrosis .....	12
1.3. Amonio y Encefalopatía hepática.....	13
1.4. Alteraciones neurológicas en encefalopatía hepática crónica.....	17
1.4.1. Alteraciones motoras .....	18
1.4.2. Alteraciones cognitivas.....	20
1.4.3. Función cognitiva: Memoria y Aprendizaje. Papel del hipocampo y del cerebelo .....	22
1.5. Sinergia entre inflamación periférica e hiperamonemia en la inducción de EH.....	24
1.6. Papel de la Neuroinflamación en la Encefalopatía Hepatica .....	25
1.6.1. Células gliales y neuroinflamación: la microglía.....	29
1.6.2. Células gliales y neuroinflamación: los astrocitos .....	30
1.7. Papel de la inflamación periférica en la inducción de neuroinflamación y en el deterioro cognitivo y motor en encefalopatía hepática .....	33
1.7.1. Anti-TNF- $\alpha$ : infliximab .....	35
1.7.2. Infiltración de células del sistema inmune periférico en el SNC .....	36
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>42</b>
<b>3. MATERIAL Y METODOS</b> .....	<b>44</b>
3.1. Animales .....	44

3.1.1. Anastomosis porta-cava y tratamiento con Infliximab .....	44
3.2. Determinación de amonio en sangre de ratas .....	45
3.3. Obtención de plasma.....	46
3.3.1. Determinación de PGE2 en plasma .....	46
3.3.2. Determinación de factores inflamatorios en plasma.....	46
3.4. Microdiálisis en cerebelo in vivo y determinación del GABA extracelular.....	47
3.5. Microdiálisis en cerebelo in vivo y determinación del GABA extracelular Analisis de la expresion de membrana de los transportadores de GABA GAT1 y GAT3 en cerebelo y de los receptores GluR1, GluR2, NR2A y NR1 en hipocampo .....	48
3.6. Inmunohistoquímica.....	48
3.6.1. Analisis de las imagenes de inmunohistoquimica .....	50
3.6.1.1. Activación de la microglía (Iba1) .....	50
3.6.1.2. Activación de los astrocitos (GFAP) .....	51
3.6.1.3. Analisis del contenido de TNF- $\alpha$ e IL-1 $\beta$ en hipocampo y cerebelo de ratas.....	51
3.6.1.4. Análisis de las subunidades p50 y p65 de NF- $\kappa$ B mediante inmunofluorescencia .....	51
3.6.1.5. Hibridación in situ por fluorescencia (FISH) del ARNm de TNF-a .....	52
3.6.1.6. Analisis del contenido de GAT3 y GAT1 en cerebelo de ratas.....	53
3.7. Test de aprendizaje y memoria .....	53
3.7.1. Test de aprendizaje de una tarea de discriminación condicionada en un laberinto en Y .....	53
3.7.2. Laberinto radial de 8 brazos.....	55
3.7.3. Laberinto acuático de Morris .....	56
3.7.4. Beam walking .....	57
3.8. Recolección de muestras y procesamiento de tejido cerebral de humanos .....	58
3.9. Histología del hígado .....	59
3.10. Inmunohistoquímica.....	60
3.10.1. Análisis de las imágenes de inmunohistoquímica .....	60

3.10.2. Análisis de la densidad neuronal en cortes de cerebelos de pacientes con distintos grados de enfermedad hepática .....	60
3.10.3. Analisis de linfocitos en espacio meningeo cerebelar de pacientes con distintos grados de enfermedad hepática .....	61
3.11. Análisis estadístico .....	61
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>62</b>
4.1. El tratamiento con infliximab reduce la inflamación periférica pero no la hiperammonemia en ratas PCS.....	62
4.2. Las ratas PCS muestran neuroinflamación en cerebelo e hipocampo que se reduce con infliximab.....	64
4.3. Alteración de la expresión en membrana de los transportadores de GABA y del GABA extracelular en cerebelo en ratas PCS. Efectos del infliximab.....	82
4.4. Alteración de la expresión en membrana de los receptores AMPA y NMDA en hipocampo de ratas PCS. Efectos del infliximab .....	86
4.5. El tratamiento con infliximab restaura la coordinación motora y el aprendizaje en el laberinto en Y en las ratas PCS .....	87
4.6. El aprendizaje y la memoria espacial están alterados en las ratas PCS pero no en ratas PCS tratadas con infliximab.....	88
4.7. Estudios en cerebelo de pacientes fallecidos con distintos grados de enfermedad hepática.....	90
4.7.1. La enfermedad hepática induce pérdida neuronal en cerebelo ya desde estadios tempranos de esteatohepatitis.....	90
4.7.2. La activación de microglía y astrocitos se inicia antes en la capa molecular que en la sustancia blanca en pacientes con esteatohepatitis.....	93
4.7.3. Los pacientes con esteatohepatitis presentan infiltración de linfocitos T pero no de linfocitos.....	99
<b>5. DISCUSIÓN .....</b>	<b>103</b>
<b>6. CONCLUSIONES.....</b>	<b>119</b>
<b>7. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>121</b>

## **AGRADECIMIENTOS**

A todo el personal del laboratorio de Neurobiología del Centro de Investigación Príncipe Felipe e INCLIVA por la ayuda en la realización del trabajo y el apoyo mostrado durante estos años.

A todo el personal del Instituto Valenciano de Patología que ha contribuido de manera muy importante a la obtención de muchos de los resultados presentes en esta tesis.

A todo el personal del Instituto de Medicina Legal de Valencia por su colaboración con el estudio en pacientes.

A Sara y Laura, del grupo de investigación de Esclerosis múltiple y regeneración neural de Valencia por la colaboración y la realización de la técnica de Hibridación in situ.

Tanto al personal del Laboratorio de Neurobiología Comparada del Instituto Cavanilles de Biodiversidad y Biología Evolutiva de Valencia como al Departamento de Patología de la Universidad de Valencia por la disponibilidad y la paciencia mostrada durante mi periodo de estancia.

Un agradecimiento especial a mi familia, que siempre está a mi lado a pesar de la distancia.

Y a Angela, mi esposa, por toda la paciencia, apoyo, comprensión y motivación que me ha dado.

## **ABREVIATURAS**

**AFLD:** Esteatosis hepática alcohólica  
**ASH:** Esteatohepatitis alcohólica  
**BDL:** Ligadura de ducto biliar  
**BHE:** Barrera hemato-encefálica  
**CHC:** Carcinoma hepatocelular  
**CHE:** Células hepáticas estrelladas  
**DAB:** Diaminobenzidina  
**EH:** Encefalopatía hepática  
**EHG:** Enfermedad de hígado graso  
**EHM:** Encefalopatía hepática mínima  
**FISH:** Hibridación in situ por fluorescencia  
**GFAP:** Proteína ácida fibrilar glial  
**HC:** Hepatitis C  
**HPA:** Hipotalámico-hipofisario-adrenal  
**HRP:** Peroxidas de rábano  
**IBA1:** Molécula adaptadora de unión a calcio ionizado 1  
**IL-1 $\beta$ :** Interleucina 1 beta  
**LCR:** Líquido ceforraquídeo  
**LPS:** Lipopolisacárido  
**MCP-1:** Proteína quimioatrayente de monocitos 1  
**ML:** Capa molecular  
**NAFLD:** Esteatosis hepática no alcohólica  
**NASH:** Esteatohepatitis no alcohólica  
**NO:** Óxido nítrico  
**NTS:** Núcleo del tracto solitario  
**PCS:** Anastomosis porto-cava  
**PET:** Tomografía de emisión de positrones  
**PGE2:** Prostaglandina E2  
**pHE:** Encefalopatía hepática proliferativa  
**PHES:** Psychometric Hepatic Encephalopathy Score  
**SEM:** Error estándar de la media  
**SH1:** Esteatohepatitis de grado 1  
**SH2:** Esteatohepatitis de grado 2  
**SH3:** Esteatohepatitis de grado 3  
**SNC:** Sistema nervioso central  
**TGF- $\beta$ :** Factor de crecimiento transformante- $\beta$   
**TNF- $\alpha$ :** Factor de necrosis tumoral alfa  
**VC:** Vena centrolobulillar  
**WM:** Sustancia blanca

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. Encefalopatía Hepática

La encefalopatía hepática (EH) es un síndrome neuropsiquiátrico complejo presente en pacientes con enfermedades hepáticas, principalmente cirrosis. La EH cubre un amplio rango de alteraciones neuropsiquiátricas como alteraciones del sueño, deterioro cognitivo y de la función motora, alteración de la personalidad y pérdida de consciencia, pudiendo llegar al coma y la muerte. La EH clínica se clasifica en 3 tipos: A, B y C (Ferenci et al., 2002)

- EH tipo A: EH 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 o por las reacciones idiosincrásicas a fármacos. Puede ser reversible o conducir a la muerte. El grado de mortalidad en la EH aguda es muy elevado y se debe frecuentemente a un aumento de la presión intracraneal como consecuencia de un edema cerebral.
- EH tipo B: EH crónica, por derivación porto-sistémica sin enfermedad hepatocelular intrínseca. Se han descrito muchos casos entre la población japonesa (Watanabe, 2000). Existen derivaciones portosistémicas espontáneas, como la causada por la obstrucción de la vena porta extra-hepática (EHPVO). Es una causa común de hipertensión portal en niños (Yachha et al., 1996). Estos pacientes presentan flujo sanguíneo hepático reducido, concentraciones de amonio en sangre aumentadas, la relación glutamina/creatinina aumentada y en ocasiones anastomosis porta-cava espontánea. También puede originar EH tipo B la ausencia congénita de vena porta aunque es poco frecuente. En este caso los pacientes presentan una malformación de forma que las venas mesentéricas drenan su sangre directamente a la circulación sistémica (Grazioli et al., 2000). Normalmente se detecta cuando son niños y no porque presenten encefalopatía sino porque la función hepática está dañada. A medida que crecen y llegan a la edad adulta desarrollan encefalopatía y daño hepático y renal (Wojcicki et al., 2004).
- EH tipo C: EH crónica, asociada a cirrosis hepática e hipertensión portal. Es la más frecuente. También genera derivaciones portosistémicas como consecuencia de enfermedades crónicas del hígado, generalmente cirrosis, con

una apreciable derivación de la sangre portal a la circulación sistémica (Encefalopatía Porto-Sistémica, PSE).

Se pueden producir episodios de EH clínica como consecuencia de determinados factores desencadenantes (hemorragia digestiva, alta ingesta de proteínas, estreñimiento, infección). Estos episodios de EH son habitualmente reversibles cuando el factor desencadenante es eliminado. La derivación porto-sistémica también se realiza en los hospitales para tratar problemas como la hemorragia digestiva secundaria a ruptura de várices esofagogástricas, una complicación muy frecuente y severa de los pacientes con cirrosis hepática e hipertensión portal. La EH es un factor predictivo de mortalidad en los pacientes cirróticos. Se estima que 3 años después del primer episodio de encefalopatía clínica la mortalidad es del 60-80% (Bustamante et al., 1999).

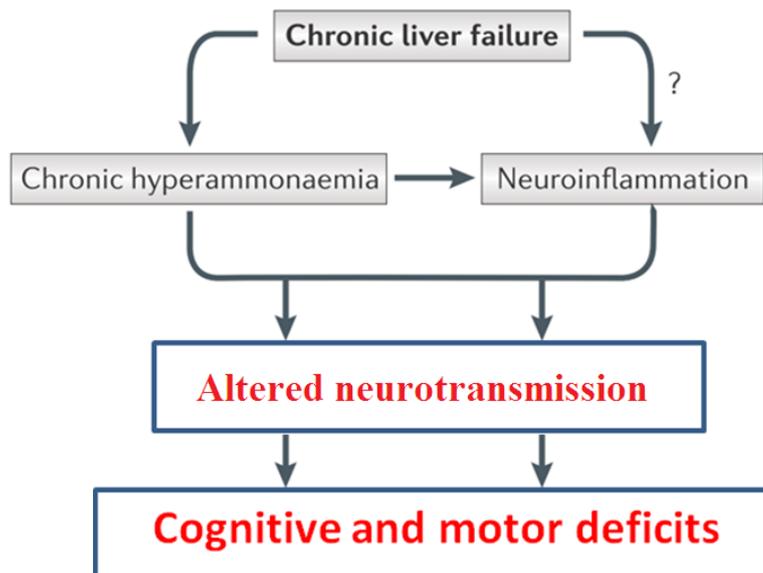
Un 40% de los pacientes con cirrosis sin síntomas evidentes de EH presentan EH mínima (EHM), con deterioro cognitivo leve, déficits de atención y enlentecimiento psicomotor que no son detectables en un examen neurológico rutinario pero se ponen de manifiesto cuando se realizan tests psicométricos o neurofisiológicos adecuados. Este tipo de EH se denominaba encefalopatía hepática subclínica o latente, términos que han sido reemplazados por encefalopatía hepática mínima (EHM) (Lockwood, 1993 y 2000; Schomerus y Hamster, 2001; Ferenci et al., 2002; Amodio et al., 2004; Romero-Gomez et al., 2007). La EHM disminuye la calidad de vida de los pacientes (Slowik et al., 2001), aumenta el riesgo de padecer accidentes laborales, domésticos y de tráfico y predispone a sufrir EH clínica (Felipo, 2013).

Con la finalidad de detectar y valorar la EHM se ha llegado a un consenso en el uso de pruebas psicométricas, seleccionando como tests de referencia la batería PHES (Psychometric Hepatic Encephalopathy Score) (Weissenborn et al., 2001).

## **1.2. Patogénesis**

El principal responsable de las alteraciones neurológicas en EH es la hiperamonemia (Felipo and Butterworth, 2002). La inflamación, consecuencia del fallo hepático, actúa sinérgicamente con ella potenciando la inducción de deterioro cognitivo y motor. La hiperamonemia inducida en pacientes cirróticos deteriora el rendimiento en tests psicométricos durante el estado inflamatorio, pero no tras su resolución (Shawcross et al, 2004). Las interleucinas proinflamatorias IL6 e IL18 están aumentadas en pacientes

con EHM comparados con pacientes sin EHM y su concentración en suero discrimina entre pacientes sin y con EHM (Montoliu et al, 2009). En pacientes con distintos tipos de enfermedades, la presencia simultánea de niveles elevados de inflamación e hiperamonemia son suficientes para inducir deterioro cognitivo leve (Felipo et al, 2012). En modelos animales, la hiperamonemia crónica per se induce activación de la microglía y neuroinflamación, que media el deterioro cognitivo y motor (Rodrigo et al, 2010). Por tanto, la hiperamonemia y la inflamación actúan sinérgicamente produciendo neuroinflamación, la cual contribuye al deterioro cognitivo y motor en EHM y en EH clínica (Figura 1).



Modified from Felipo V, Nat Rev Neurosci 2013

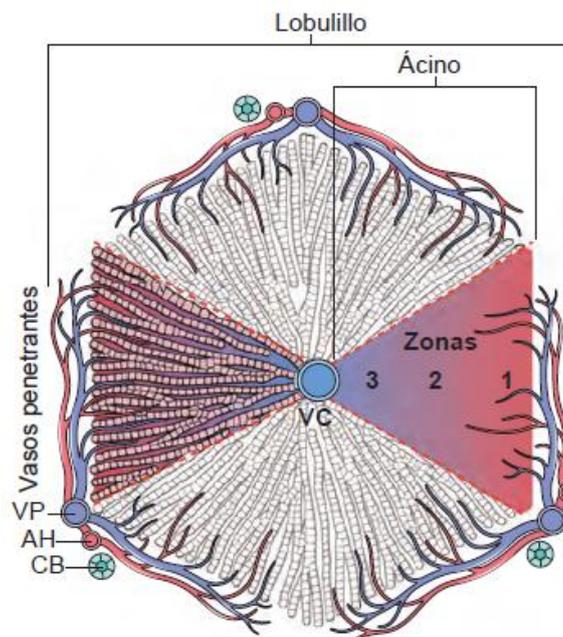
**Figura 1. Patogénesis de la EH.** En la patogénesis de la EH la hiperamonemia juega un papel central. La inflamación, consecuencia del fallo hepático, actúa sinérgicamente con ella induciendo neuroinflamación que es el principal responsable del deterioro cognitivo y motor. Los mecanismos mediante los cuales el fallo hepático y la inflamación periférica inducen la neuroinflamación están por aclarar.

### 1.2.1. Hígado

En la patogénesis de la EH, la pérdida de la función cognitiva y motora ocurre cuando el hígado ya no es capaz de desempeñar su normal función y eliminar las toxinas de la sangre. El hígado de un adulto normal pesa entre 1400 y 1600g y constituye aproximadamente el 2,5% del peso corporal. El hígado recibe un aporte de sangre doble: la vena porta proporciona el 60-70% del flujo sanguíneo hepático y la arteria hepática aporta el 30-40% restante. La vena porta y la arteria hepática entran en el hígado a través del hilio, también conocido como porta hepatis, que es una cisura

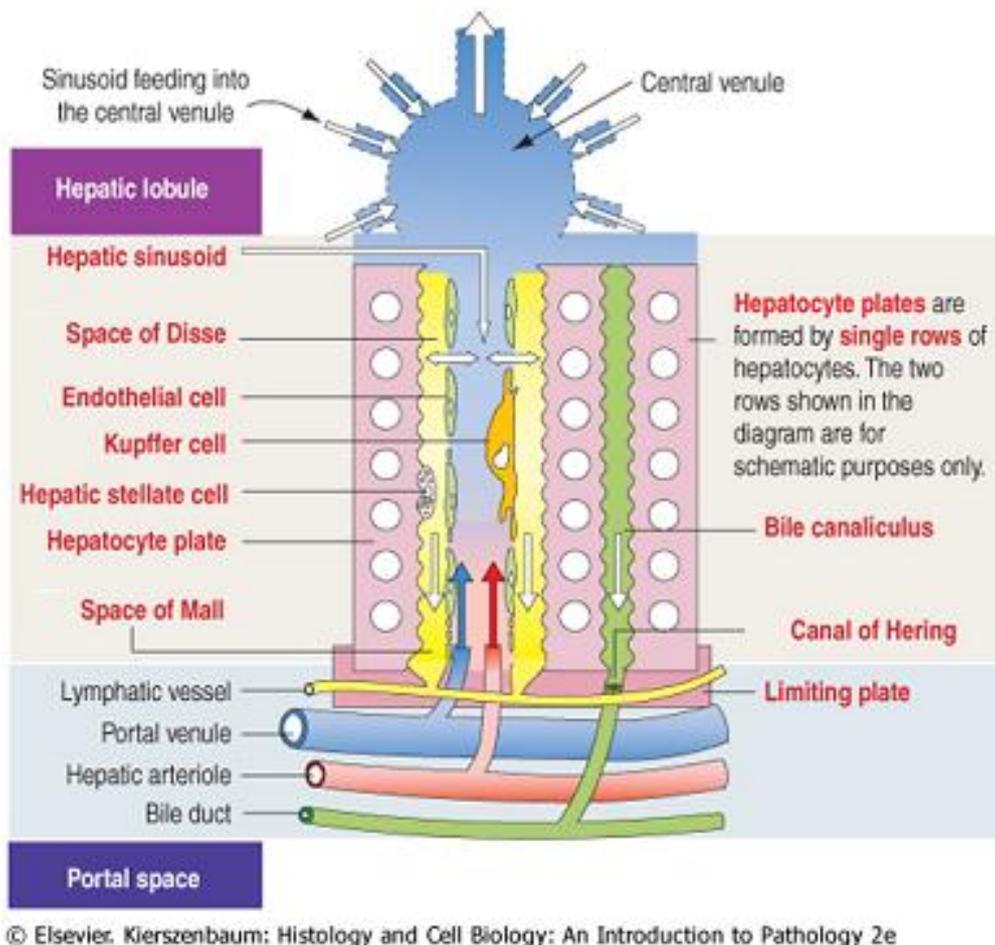
transversa en la superficie inferior del hígado. Dentro del hígado, las ramas de las venas portas, arterias hepáticas y vías biliares discurren en paralelo en los espacios porta, con ramificaciones variables entre 17 y 20 órdenes de ramas. La terminología de la microarquitectura hepática se basa en dos conceptos diferentes: el lobulillo hepático y el ácino hepático.

- En el modelo lobulillar, el hígado se divide en lobulillos hexagonales de 1-2 mm de diámetro alrededor de las ramas tributarias terminales de la vena hepática (venas hepáticas terminales), de forma que los espacios porta quedan localizados en la periferia del lobulillo. Los hepatocitos de la vecindad de la vena hepática terminal se denominan «centrolobulillares»; los situados cerca del espacio porta son «periportales» (Figura 2).
- En el modelo acinar, los hepatocitos cercanos a las venas hepáticas terminales son los vértices distales de los ácinos, con una estructura aproximadamente triangular, cuyas bases están formadas por las vénulas septales penetrantes procedentes de la vena porta que proceden de los espacios porta (MacSween et al., 2002) En el ácino, el parénquima se divide en tres zonas, la zona 1 más cercana al suministro vascular, la zona 3 adyacente a la vénula hepática terminal y la más alejada respecto al aporte de sangre aferente, y la zona 2 intermedia (Figura 2).



**Figura 2.** Anatomía microscópica del hígado. Se muestran los dos modelos, el modelo lobulillar y el modelo acinar. En el modelo lobulillar, la vena hepática terminal (VC) se encuentra en el centro de un «lobulillo», mientras que el espacio porta (VP) se sitúan en la periferia. Los anatomopatólogos hablan de las regiones del parénquima como «periportal y centrilobulillar». En el modelo acinar, según el flujo sanguíneo se pueden definir tres zonas, siendo la zona 1 la más cercana al aporte sanguíneo y la zona 3 la más alejada. AH, arteria hepática; CB, conducto biliar.

Con independencia del modelo usado, la separación del parénquima en zonas es un concepto importante porque indica el gradiente de actividad de muchas enzimas hepáticas y la distribución zonal de determinados tipos de daño hepático. Aunque el modelo acinar es el que mejor describe las relaciones fisiológicas entre los hepatocitos y su aporte vascular, la histopatología del hígado se suele explicar sobre la base de una arquitectura lobulillar (Figura 3). Los hepatocitos se organizan en láminas cribiformes anastomosadas entre sí, o «placas», que se extienden desde los espacios porta a las venas hepáticas terminales. Entre las placas de hepatocitos se encuentran los sinusoides vasculares. La sangre atraviesa los sinusoides y sale hacia las venas hepáticas terminales a través de numerosos orificios de la pared de la vena. De esta forma, los hepatocitos están bañados por ambos lados por la sangre venosa porta y la sangre arterial hepática bien mezclada, lo que les convierte en unas de las células más ricamente perfundidas del cuerpo. Los sinusoides están recubiertos por células endoteliales fenestradas y discontinuas. En la zona profunda de las células endoteliales se encuentra el espacio de Disse, en el que hacen protrusión abundantes microvellosidades de los hepatocitos. Las células de Kupffer dispersas procedentes del sistema mononuclear fagocítico están unidas a la cara luminal de las células endoteliales y en el espacio de Disse hay células hepáticas estrelladas (CHE) que contienen grasa. Entre los hepatocitos colindantes se encuentran los canalículos biliares, que son unos canales de 1-2  $\mu\text{m}$  de diámetro formados por los surcos de las membranas plasmáticas de los hepatocitos enfrentados y separados del espacio vascular por uniones estrechas. Esos canales drenan en los canales de Hering, estructuras a modo de conductillos que conectan los canalículos biliares con los conductillos biliares en la región periportal. Los conductillos se vacían en los conductos biliares terminales dentro de los espacios porta (Crawford, 2002). El hígado también contiene linfocitos, incluida una cantidad relativamente grande de linfocitos citolíticos naturales (células NK) y T.



**Figura 3.** Arquitectura del lobulillo hepático.

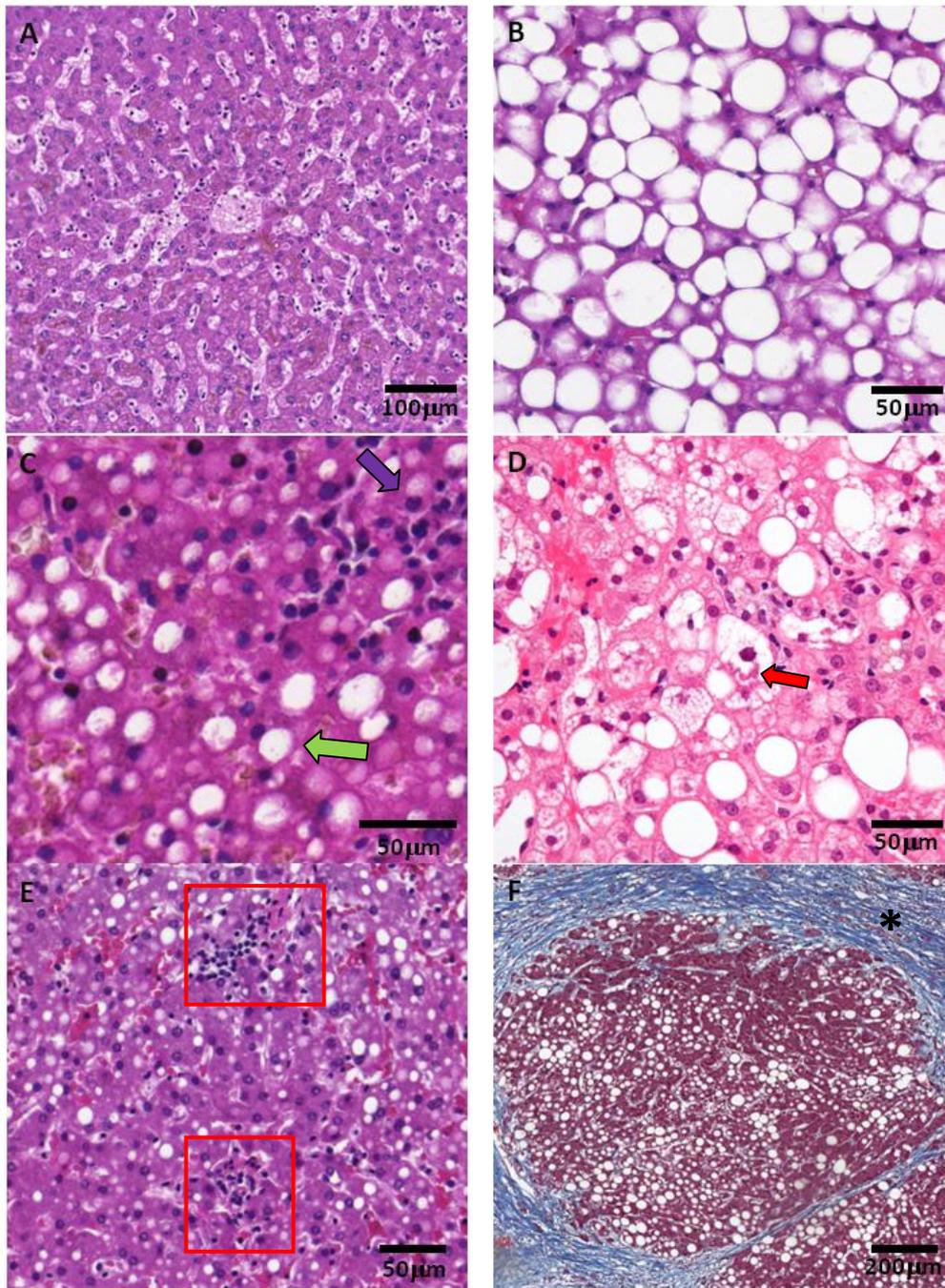
El hígado es vulnerable a una amplia variedad de agentes nocivos metabólicos, tóxicos, microbianos, circulatorios y neoplásicos. Las enfermedades más importantes del hígado son las hepatitis víricas, la hepatopatía alcohólica, el hígado graso no alcohólico (NAFLD) y el carcinoma hepatocelular (CHC). También se produce daño hepático como consecuencia de algunas de las enfermedades más frecuentes en el hombre, como la descompensación cardíaca, el cáncer diseminado y las infecciones extrahepáticas. La enorme reserva funcional del hígado enmascara el impacto clínico de las lesiones hepáticas leves, pero la progresión de la enfermedad difusa o la alteración del flujo biliar pueden desbordar la función hepática y poner en peligro la vida del paciente. Con la rara excepción de la insuficiencia hepática fulminante, la hepatopatía es un proceso insidioso en el que la detección clínica y los síntomas de descompensación hepática aparecen semanas, meses o muchos años después del inicio de la lesión. El flujo y reflujo del daño hepático puede ser imperceptible para el paciente y detectable sólo por las alteraciones analíticas y la lesión hepática y la cicatrización también pueden producirse sin que se detecten en la clínica. Por tanto, en los sujetos con anomalías

hepáticas derivados a los hepatólogos lo más frecuente es encontrar una hepatopatía crónica. En los estudios de seguimiento efectuados en EE. UU. se ha demostrado una incidencia anual de hepatopatía crónica de nuevo diagnóstico de 72 casos por 100.000 habitantes. La hepatopatía es responsable de más de 38.000 muertes al año en EE. UU. (1,5% de todas las muertes) (Kenneth et al., 2016). El hígado tiene un repertorio relativamente escaso de respuestas celulares y tisulares a la lesión, con independencia de la causa. Las respuestas más frecuentes son:

- Degeneración de los hepatocitos y acumulaciones intracelulares
- Necrosis y apoptosis de los hepatocitos
- Inflamación
- Regeneración
- Fibrosis

### **1.2.2. Esteatosis hepática**

La esteatosis hepática consiste en una acumulación de triglicéridos en las células parenquimales del hígado (hepatocitos) y puede ocurrir en condiciones etiológicamente distintas. Morfológicamente, la esteatosis hepática se manifiesta como la acumulación de grandes (macrovesiculares) o pequeñas (microvesiculares) gotas de grasa intracitoplásmica en las células del parénquima hepático. El diagnóstico de esteatosis se produce cuando el contenido de lípidos en el hígado supera el 5-10% en peso. (Adams et al., 2005a y 2005b; Crabb et al., 2004; Ludwig et al., 1980; Rao y Reddy, 2004; Zafrani, 2004). La esteatosis hepática es principalmente de tipo macrovesicular en los estados alcohólicos, obesos y diabéticos, así como en ciertos estados de malnutrición, como el kwashiorkor y el síndrome de inmunodeficiencia adquirida. En la esteatosis macrovesicular, los hepatocitos contienen una gran y única vacuola de grasa, que llena el citoplasma y desplaza el núcleo a la periferia, dando lugar a una característica apariencia de anillo de sello (signet ring appearance) (Fig. 4B). La esteatosis macrovesicular puede manifestarse en la zona 3 o puede presentarse predominantemente como panacinar con creciente gravedad. En la esteatosis microvesicular, los hepatocitos están ocupados por numerosas pequeñas gotas lipídicas que no desplazan el núcleo localizado centralmente a la periferia (Figura 4C).



**Figura 4.** Características histopatológicas de biopsias hepáticas de pacientes con enfermedad hepática grasa no alcohólica (NAFLD). **A:** Hematoxilina-eosina (10x) de un sujeto con hígado sano. **B:** Hematoxilina-eosina (20x) de un paciente con esteatosis hepática macrovesicular con una gran vacuola lipídica llenando el citoplasma de hepatocitos resultando en desplazamiento periférico del núcleo. **C:** Hematoxilina-eosina (40x) mostrando esteatosis microvesicular con esteatohepatitis. Pequeñas gotas de grasa llenan el citoplasma de los hepatocitos sin una localización central del núcleo (flecha verde). También se observan pequeños grupos de células inflamatorias (flecha morada). **D:** Hematoxilina-eosina (40x) mostrando hialina de Mallory (flecha roja) visto como agregados eosinofílicos serpiginosos en NAFLD con esteatosis macrovesicular. **E:** Hematoxilina-eosina (20x) de un paciente con esteatohepatitis muestra agregados de células inflamatorias (rectángulo rojo) en hígado esteatosico **F:** tinción tricrómica (5x) que ilustra la cirrosis (asterisco) en una biopsia hepática.

Las anomalías genéticas o inducidas por toxinas en la  $\beta$ -oxidación mitocondrial y peroxisomal de los ácidos grasos conducen a esteatosis hepática microvesicular. Este tipo tiende a ser más severo y a progresar más rápidamente. Algunos hepatocitos en estos hígados con esteatosis microvesicular también pueden revelar un cambio a grasa macrovesicular, lo que implica que con la progresión de la enfermedad algunas de estas vacuolas lipídicas pequeñas pueden fundirse para convertirse en una gotita grande. En la enfermedad grasa hepática alcohólica (AFLD) y en la enfermedad grasa hepática no alcohólica (NAFLD) de larga duración, la esteatosis hepática es generalmente macrovesicular y, en algunos casos, se puede mezclar con gotitas microvesiculares (Adams et al., 2005b; Crabb et al., 2004; Ludwig et al., 1980; Zafrani, 2004).

La patogénesis de la degeneración grasa en AFLD y NAFLD parece ser multifactorial. En la AFLD, los principales factores que parecen contribuir a la sobrecarga lipídica global en el hígado son: el deterioro o la inhibición de la función del receptor gamma activado por el factor proliferador de peroxisomas PPAR- $\alpha$  y PPAR- $\gamma$ , la estimulación de la proteína de unión al elemento regulador del esteroide SREBP 1 y las alteraciones en las moléculas receptoras que controlan las enzimas responsables de la oxidación y síntesis de ácidos grasos. (Browning et al., 2004; Bugianesi et al., 2002; Ip et al., 2003; Kashireddy y Rao, 2004; Rao y Reddy, 2004; Reddy y Hashimoto, 2001).

Además, se sabe que el alcoholismo crónico daña las mitocondrias, el retículo endoplasmático y otras estructuras celulares, contribuyendo además a la inhibición de la oxidación de los ácidos grasos (Crabb et al., 2004; Nakajima et al., 2004). El papel relativo de los diversos factores en el desarrollo de esteatosis hepática son difíciles de estimar, pero el resultado neto es que los hepatocitos progresivamente esteatóticos comienzan a romperse o morir. Los hepatocitos rotos o apoptóticos liberan triacilglicérolos que, junto con los ácidos grasos de cadena muy larga no metabolizados potencian la lesión hepática.

La esteatosis hepática en la NAFLD está relacionada con la resistencia a la insulina, pero cada vez es más evidente que puede ocurrir también en ausencia de resistencia manifiesta a la insulina (Adams et al., 2005a y 2005b; Browning et al., 2004; Evans et al., 2004; Hamaguchi et al., 2005). Estas observaciones sugieren que la esteatosis hepática en NAFLD puede comenzar como una simple sobrecarga de energía no metabolizada en aquellos hepatocitos que consumen energía en exceso (Browning et al., 2004; Hamaguchi et al., 2005; Matsusue et al., 2003; Yu et al., 2003) que supera la capacidad de combustión de energía de los sistemas de oxidación de ácidos grasos

mediados por PPAR- $\alpha$  (Hashimoto et al., 2000; Rao y Reddy, 2004). La incidencia de NAFLD es casi el 50% en personas con diabetes, el 76% en obesos y el 100% en obesos mórbidos con diabetes (Adams et al., 2005a). Por lo tanto, la causa subyacente de la acumulación de grasa en AFLD y NAFLD se debe principalmente a la síntesis de ácidos grasos y a la inhibición de la oxidación de ácidos grasos.

### **1.2.3. Steatohepatitis**

La esteatosis hepática se considera inocua en su forma suave, reversible, y en gran medida no progresiva si cesa o se elimina la causa subyacente. La progresión a esteatohepatitis, ASH (esteatohepatitis alcohólica) o NASH (esteatohepatitis no alcohólica), está influenciada por la persistencia y severidad de la causa de la esteatosis hepática (Crabb et al., 2004; Evans et al., 2004; Hamaguchi et al., 2005; Ludwig et al., 1980). La NASH se asemeja a la ASH en cuanto al espectro de las lesiones patológicas (Adams et al., 2005a; Crabb et al., 2004; Zafrani, 2004). La única característica distintiva es clínica ya que los individuos con NASH presumiblemente consumen bajas cantidades de alcohol. Según el dictamen predominante, la AFLD está asociada con el consumo de etanol de más de 20 g/día para las mujeres y 30 g/día para los hombres (Adams et al., 2005a; Zafrani et al., 2004).

La esteatohepatitis en ASH y NASH representa una asociación de esteatosis macrovesicular con características necroinflamatorias tales como hepatocitos balonizados, células apoptóticas, presencia de hialina de Mallory y/o megamitocondrias en el citoplasma de hepatocitos e infiltración de células inflamatorias y macrófagos cargados de pigmento, junto con algunos lipogranulomas (Figura 4, D y E) (Adams et al., 2005b; Browning y Horton, 2004, Crabb et al., 2004; Hamaguchi et al., 2005; Ludwig et al., 1980; Rao y Reddy, 2004; Zafrani, 2004). La extensión de la respuesta inflamatoria varía considerablemente y no siempre se correlaciona con el grado de esteatosis. La respuesta inflamatoria lobular consiste en linfocitos dispersos y leucocitos polimorfonucleares junto con lipogranulomas distribuidos aleatoriamente y de tamaño variable. En la esteatosis microvesicular asociada con ciertos trastornos genéticos que afectan el sistema de oxidación de ácidos grasos, también se encuentran cambios inflamatorios junto con los lipogranulomas (Figura 4C). La esteatohepatitis con esteatosis macrovesicular o microvesicular que conduce al desarrollo de tumores hepáticos también se observa en varios modelos murinos transgénicos y en trastornos

genéticos que tienden a imitar la enfermedad de hígado graso (FLD) humana (Fan et al., 1993; Horie et al., 2004; Yanagitani et al., 2004).

La patogénesis de ASH y NASH es multifactorial e incluye varios eventos superpuestos (Day y James, 1998). La acumulación de grasa en los hepatocitos (esteatosis) y el inicio de la esteatohepatitis pueden reflejar etapas sucesivas en la enfermedad del hígado graso (EHG). La hipótesis de "two hits" postula que el hígado esteatótico es susceptible a insultos secundarios, incluyendo una mayor vulnerabilidad a especies reactivas de oxígeno, endotoxinas derivadas del intestino y adipocitocinas así como al factor de necrosis tumoral TNF-alfa y otras citocinas (Day y James, 1998). Aunque estos eventos pueden ser importantes para provocar la respuesta inflamatoria en el hígado graso, el evento precipitante puede estar directamente relacionado con la ruptura o apoptosis de hepatocitos marcadamente esteatóticos y la consecuente liberación de triglicéridos y ácidos grasos tóxicos. La sobrecarga de ácidos grasos en los hepatocitos actúa como un sustrato y un inductor del citocromo microsomal P-450 (CYP) 2E1 y los sistemas de oxidación de ácidos grasos que generan especies reactivas de oxígeno resultando en estrés oxidativo (Rao y Reddy, 2004). El estrés oxidativo provoca la liberación por las células de Kupffer de varias citocinas, incluyendo el TNF- $\alpha$  y el factor de crecimiento transformante- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) (Day y James, 1998). Las especies reactivas del oxígeno así como el etanol activan las células estrelladas que participan en la fibrogenesis. Los productos de peroxidación de lípidos, así como proteínas modificadas por especies reactivas de oxígeno, tienen propiedades inmunogénicas que causan una respuesta inflamatoria. Además, respuestas autoinmunes hacia los constituyentes de hepatocitos también están implicadas en la lesión de células hepáticas. Tanto en ASH como en NASH, se sabe que factores derivados del intestino, tales como el lipopolisacárido bacteriano y la endotoxina, activan las células de Kupffer, dando como resultado la generación de citocinas y una reducción de la adiponectina circulante. Aunque no se conoce el papel exacto de las adipocitocinas (adiponectina y leptina) en NASH, se ha demostrado la sobreexpresión de ambas citocinas por las células estrelladas en los estados de resistencia a la insulina. Se considera generalmente que la leptina promueve la fibrosis (Leclercq et al., 2002) y la adiponectina inhibe la fibrosis y provoca la apoptosis de las células estrelladas (Ding et al., 2005).

La esteatohepatitis cubre un amplio rango de cambios histopatológicos. Por lo tanto, con el fin de realizar un correcto diagnóstico del estadio del paciente y decidir una terapia adecuada, es muy importante realizar una correcta clasificación que tenga en

cuenta el grado de esteatosis y de actividad inflamatoria, la magnitud de la lesión hepatocelular y la extensión de la fibrosis. La más usada es la clasificación semicuantitativa de Brunt, luego modificada por Kleiner y validada por el “Pathology Committee of the NASH Clinical Research Network” (Kleiner et al., 2005; Brunt et al., 2000); Kleiner y colaboradores agruparon las características histológicas en cinco grandes categorías: esteatosis, inflamación, fibrosis, ballooning hepatocelular y otras características. Para llevar a cabo esta clasificación es suficiente realizar una Hematoxilina-Eosina y la tinción tricromica de Masson. La puntuación se define como la suma no ponderada de todas las puntuaciones.

#### **1.2.4. Fibrogénesis hepática, regeneración hepatocelular y progresión a cirrosis.**

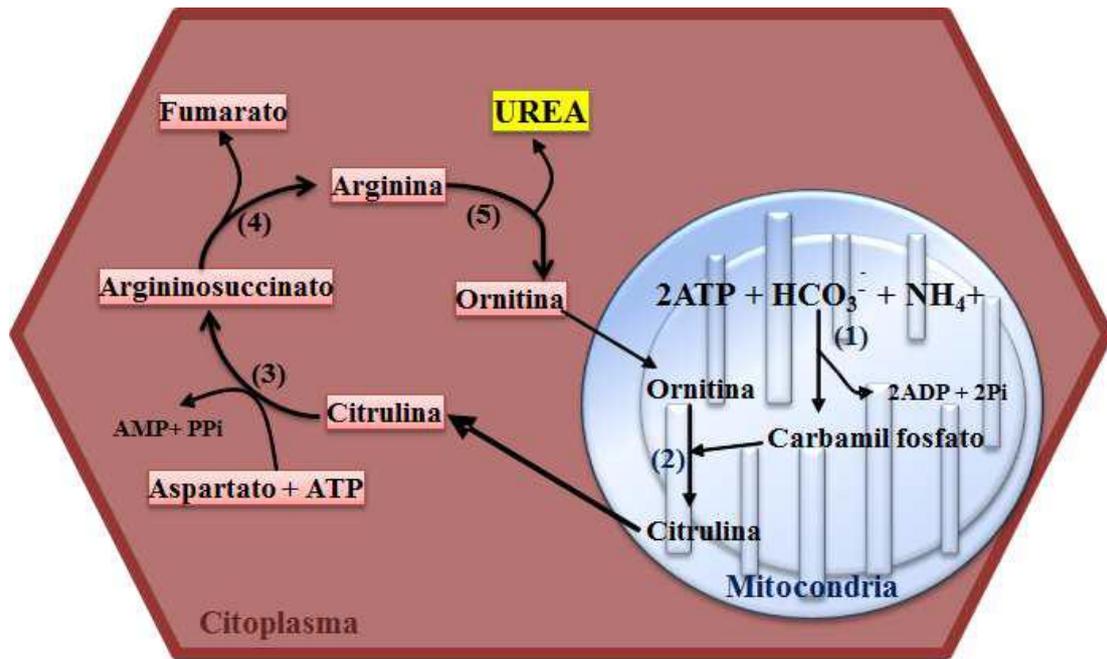
La muerte de las células hepáticas y las respuestas inflamatorias conducen a la activación de células estrelladas, que desempeñan un papel fundamental en la fibrosis hepática. La respuesta fibrogénica comienza en la zona 3 y se manifiesta como perisinusoidal, perivenular (alrededor de las venas hepáticas terminales) y pericelular (Figura 4F). La prolongación de esta respuesta fibrogénica contribuye a la formación y expansión de los septos fibrosos que puentean entre las vénulas hepáticas terminales y las tríadas portales y también genera tracto fibroso entre espacios porta (fibrosis en puente). La lesión de células hepáticas y la apoptosis sirven como estímulos mitogénicos para que las células del hígado proliferen y se dividan. Estas células proliferantes y recién regeneradas del hígado tienden a acumular menos y menos grasa a medida que aumenta su frecuencia de proliferación. En AFLD, en fase terminal con cirrosis, la esteatosis generalmente se vuelve inexistente debido a la elevada resistencia de los hepatocitos de nueva proliferación para acumular grasa. Las razones de esta refractariedad no están claras. Estas colonias en expansión de células hepáticas contribuyen a la distorsión de la arquitectura hepática y a la formación de nódulos hepáticos en un medio de aumento de la fibrosis hepática. Esta fibrogénesis agresiva así como la proliferación hepatocelular sostenida contribuyen al desarrollo de la cirrosis hepática. La progresión a cirrosis puede estar influenciada por la cantidad de grasa y grado de esteatohepatitis y por una variedad de otros factores sensibilizantes. En AFLD, la transición a la cirrosis con abuso continuado de alcohol ha sido bien establecida, pero en NAFLD por obesidad el proceso no está bien delineado.

### 1.3. Amonio y Encefalopatía Hepática

El amonio es un compuesto derivado del metabolismo nitrogenado y se produce en todas las células del organismo como resultado de la degradación de aminoácidos, nucleótidos y otros compuestos nitrogenados. En solución acuosa el amoniaco ( $\text{NH}_3$ ) se encuentra en equilibrio con el ion amonio ( $\text{NH}_4^+$ ). A pH fisiológico la reacción está desplazada hacia la formación de  $\text{NH}_4^+$ :

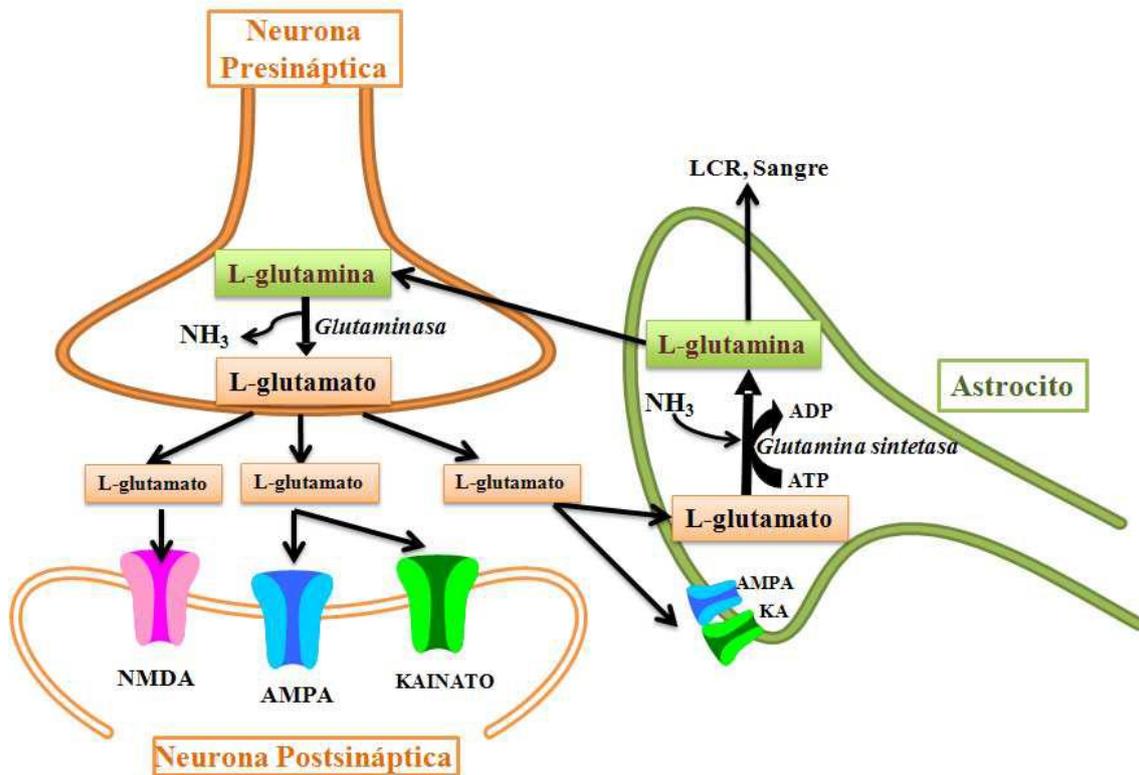


$\text{NH}_3$  es un gas capaz de atravesar libremente las membranas celulares. Sin embargo, el ion  $\text{NH}_4^+$  necesita transportadores para atravesarlas, como los que se han descrito en hígado y cerebro (Amlal y Soleimani, 1997; Ramirez et al., 1999; Marcaggi y Coles, 2001; Weiner, 2004). El amonio tiene un papel fundamental en la homeostasis del nitrógeno, participando en la síntesis de importantes compuestos para el organismo como la glutamina o el glutamato. No obstante, a concentraciones en sangre y cerebro elevadas, resulta tóxico produciendo alteraciones funcionales en el sistema nervioso central (Gerok y Haussinger, 1984; Felipe y Butterworth, 2002). Así pues, en condiciones fisiológicas, los niveles de amonio en sangre ( $\sim 100 \mu\text{M}$  en humanos,  $\sim 150 \mu\text{M}$  en rata) y en cerebro están estrictamente regulados por distintas reacciones que mantienen el equilibrio entre su formación y su eliminación. En mamíferos, la formación de amonio está catalizada principalmente por las enzimas (i) glutamato deshidrogenasa, (ii) glutaminasa y (iii) enzimas del ciclo de los nucleótidos de purina. En los animales ureotélicos, incluidos los seres humanos, el amonio es eliminado principalmente en el hígado, a través del ciclo de la urea (Figura 5). Mediante este ciclo el amonio se incorpora en urea, la cual se excreta por la orina.



**Figura 5. Ciclo de la urea.** En la mitocondria la carbamil fosfato sintetasa (1) incorpora el amonio al carbamil fosfato. Éste se combina con la ornitina formando citrulina mediante la ornitina transcarbamilasa (2). En el citoplasma la citrulina reacciona con el aspartato vía argininosuccinato sintetasa (3) formando argininosuccinato. La argininosuccinasa (4) cataliza la ruptura de argininosuccinato en fumarato y arginina. El fumarato puede reconvertirse en oxalacetato en el ciclo de Krebs y regenerar aspartato. La ruptura de la arginina catalizada por la arginasa (5) origina ornitina y urea. La urea es secretada del hígado a la sangre y eliminada en la orina. La ornitina se regenera para comenzar un nuevo ciclo en la mitocondria

En otros órganos, como cerebro y músculo, que no poseen el ciclo de la urea, el amonio es detoxificado esencialmente por la glutamina sintetasa. Esta enzima tiene un papel muy importante en el sistema nervioso central donde se localiza en los astrocitos (Martinez-Hernandez et al., 1977; Norenberg y Martinez-Hernandez, 1979), participando en el ciclo glutamato-glutamina entre astrocitos y neuronas (Figura 6).



**Figura 6. Ciclo glutamato-glutamina.** El glutamato es liberado a la hendidura sináptica por la neurona presináptica. Para evitar la excesiva activación de sus receptores ionotrópicos (NMDA, AMPA, Kainato), el glutamato es rápidamente eliminado de la hendidura sináptica por transportadores de glutamato localizados tanto en los astrocitos circundantes como en las neuronas. El astrocito incorpora amonio al glutamato mediante la glutamina sintetasa formando glutamina. Esta glutamina, liberada por el astrocito, es captada por las neuronas donde se transforma en glutamato y amonio por la acción de la glutaminasa. El glutamato se incorpora en vesículas sinápticas que serán liberadas de nuevo a la hendidura sináptica.

La glutamina sintetasa incorpora el ion amonio al glutamato formando glutamina en una reacción que consume ATP.



La glutamina formada se libera al torrente sanguíneo permitiendo el transporte del amonio en forma no tóxica desde estos órganos hasta el hígado, donde la glutamina es escindida por la glutaminasa, formando amonio que se eliminará a través del ciclo de la urea. Cuando existe fallo hepático, la detoxificación del amonio no se lleva a cabo correctamente y se elevan sus niveles en sangre y cerebro. El estado de hiperamonemia en el organismo daña la función cerebral, produciendo buena parte de las alteraciones neurológicas presentes en el síndrome de encefalopatía hepática crónica. Los niveles

elevados de amonio alteran la transmisión sináptica. Por otro lado, el ciclo glutamato-glutamina entre astrocitos y neuronas (Figura 6) es el principal mecanismo por el que se recicla el neurotransmisor glutamato. Por tanto, este ciclo es esencial para mantener un correcto funcionamiento de la neurotransmisión glutamatérgica. El amonio tiene un papel importante en este ciclo y el aumento de amonio en hiperamonemia afecta su función en algunas circunstancias.

Existen evidencias tanto experimentales como clínicas que indican que la hiperamonemia es el principal factor responsable de las alteraciones neurológicas presentes en la encefalopatía hepática:

1. Los tratamientos clínicos que son eficaces en la reversión de las alteraciones neurológicas en pacientes con EH son los dirigidos a disminuir los niveles de amonio por: reducción de la ingesta proteica, control de la flora bacteriana intestinal productora de amonio, y acidificación del pH en el intestino y colon (con lactulosa, etc) para mantener el amonio en la forma protonada y reducir su transporte al torrente sanguíneo.
2. Los agentes desencadenantes de la EH (ingesta proteica, hemorragia gastrointestinal,...) en los pacientes cirróticos van asociados a un aumento de los niveles de amonio.
3. El funcionamiento del hígado en deficiencias congénitas en enzimas del ciclo de la urea es normal excepto en la detoxificación de amonio por incorporación en urea. Las restantes alteraciones asociadas al fallo hepático no están presentes en estos pacientes. No obstante, estos pacientes muestran encefalopatía similar a la EH y su gravedad va en paralelo con el incremento de los niveles de amonio y la duración de la hiperamonemia neonatal (Msall et al., 1984).
4. En modelos animales, la hiperamonemia crónica sin fallo hepático reproduce muchas de las alteraciones metabólicas, neuroquímicas y neurológicas presentes en fallo hepático como alteraciones del ritmo circadiano, disminución en la capacidad de aprendizaje y alteraciones motoras.
5. Existe una buena correlación entre la gravedad de los síntomas neurológicos en los pacientes y la concentración arterial de amonio que presentan (Clemmesen et al., 1999).

6. La neuropatología que se manifiesta en la encefalopatía hepática coincide con la que se observa como consecuencia de la exposición del cerebro a niveles altos de amonio:
- Tanto en EH aguda como en la exposición aguda a amonio los astrocitos aumentan su volumen provocando edema cerebral. Esta complicación se presenta en pacientes con síndromes hiperamonémicos agudos (fallo hepático agudo, síndrome de Reye, enzimopatías congénitas del ciclo de la urea, etc.) y se correlaciona con los niveles de amonio alcanzados en esos pacientes (Clemmesen et al., 1999).
  - Tanto en EH crónica como en la exposición crónica a amonio los astrocitos sufren alteraciones morfológicas y funcionales similares, apareciendo los denominados astrocitos de Alzheimer tipo II. Estas alteraciones se observan en pacientes con fallo hepático crónico así 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.

#### **1.4. Alteraciones neurológicas en encefalopatía hepática crónica.**

La encefalopatía hepática crónica se desarrolla lentamente y puede presentar distintos grados en la sintomatología. Los signos varían desde ligeros déficits de atención, cambios en la personalidad y enlentecimiento psicomotor en la EHM, a falta de atención y síntomas extrapiramidales como hipomimia (falta de expresión facial) y bradiquinesia en grado I de EH, desorientación y comportamiento extraño en grado II, acabando finalmente en estupor y coma en grados III y IV (Weissenborn et al., 2005b). Los síntomas más tempranos suelen ser alteraciones en el sueño y cambios en el comportamiento, que no son detectables durante el examen neurológico rutinario del individuo, pero disminuyen su calidad de vida (Slowik et al., 2001). Se ha descrito irritabilidad, apatía, trastornos de la conducta, cambios en el apetito, mirada fija,

amnesia, cambios en el temperamento y en la personalidad. Algunos pacientes pasan de la depresión a la euforia en pocos minutos. Otros pacientes presentan sólo depresión o euforia alternadas con un temperamento estable. Los síntomas paranoicos suelen ser comunes durante el estupor como resultado de las dificultades en la percepción y la interpretación. También pueden aparecer alucinaciones (Sherlock et al., 1954).

Un 50% de los pacientes con cirrosis hepática presentan alteraciones del sueño caracterizadas por somnolencia durante el día, sobre todo a primeras horas, letargia y sopor, mientras que durante la noche la calidad del sueño esta disminuida, duermen menos tiempo y el sueño está fragmentado con múltiples despertares (Cordoba et al., 1998). El espectro clínico de la EH es muy amplio, por lo que su diagnóstico puede ser difícil dado que no existe un síntoma o examen de laboratorio específico para su diagnóstico. La gravedad de la EH clínica se clasifica en 4 grados según las manifestaciones neuropsicológicas. En la Tabla 1 se presentan los criterios de West-Haven para la estadificación del estado mental en pacientes con EH clínica.

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

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

### **1.4.1. Alteraciones motoras**

Los pacientes con EH crónica presentan frecuentemente alteraciones en la actividad y coordinación motoras (Tabla 2).

El sistema motor en mamíferos se organiza en tres sistemas: (i) vía corticoespinal, (ii) circuitos de los ganglios basales y (iii) cerebelo. En los pacientes con EH crónica se han descrito alteraciones y síntomas relacionados con los 3 niveles de organización. Manifestaciones clínicas motoras relacionadas con un mal funcionamiento de los ganglios basales (signos extrapiramidales como aquinesia, rigidez,...) se han descrito en pacientes con EH mínima y cirrosis hepática compensada (Krieger et al., 1996; Jover et

al., 2003). Alteraciones de la coordinación motora (cerebelares) están presentes en pacientes con EH de grado 1 y 2, y alteraciones de la vía corticoespinal en pacientes desde grado 1 al 4 de EH (Krieger et al., 1996; Jones y Weissenborn, 1997; Weissenborn et al., 2005a). Jover et al. (2005) realizaron una serie de tests psicométricos para medir el deterioro cognitivo, los signos extrapiramidales y la calidad de vida. De los 46 pacientes cirróticos estudiados, 22 manifestaron alteraciones motoras extrapiramidales y obtuvieron peores resultados en los tests psicométricos y de calidad de vida. En otro estudio, se comprobó que la presencia de alteraciones motoras extrapiramidales predice el desarrollo de EH clínica y que los signos avanzan a medida que avanza la enfermedad reduciendo la calidad de vida (Company et al., 2010).

<b>Grado</b>	<b>Sintomatología</b>
<b>1</b>	Temblor, incoordinación, apraxia <sup>a</sup> .
<b>2</b>	Asterixis <sup>b</sup> , lenguaje lento o incomprensible, ataxia <sup>c</sup> .
<b>3</b>	Reflejos hipoactivos, nistagmo <sup>d</sup> , rigidez muscular y clonus <sup>e</sup> .
<b>4</b>	Postura descerebrada y dilatación pupilar, reflejo oculocefálico <sup>f</sup> , ausencia de respuesta a estímulos en estadios avanzados.

**Tabla 2.** Alteraciones motoras en pacientes con encefalopatía hepática (clasificación West-Haven, (Amodio et al., 2004)).

- a) a Trastorno de la ejecución del movimiento aprendido que no puede ser explicado como consecuencia de debilidad muscular, pérdida sensorial o falta de comprensión o atención a las órdenes verbales
- b) Temblor de las manos en forma de aleteo
- c) Ausencia o irregularidad en la coordinación de los movimientos musculares
- d) Espasmo clónico de los músculos motores del globo ocular, que produce movimientos involuntarios de éste en varios sentidos
- e) Serie de contracciones rítmicas e involuntarias, de un músculo o grupo muscular por la extensión brusca y pasiva de sus tendones
- f) Se desencadena con los ojos abiertos y mediante giro de la cabeza con rapidez de un lado hacia el otro. El paciente comatoso cuyo tallo encefálico esté intacto dirige los ojos en la dirección opuesta a aquella en que se gira la cabeza

Estudios recientes, utilizando tests más sensibles, muestran que los pacientes con EHM presentan alteraciones en la coordinación bimanual y visuomotora moduladas principalmente en cerebelo (Denniston et al., 2003, Felipe et al., 2012a).

### **1.4.2. Alteraciones cognitivas**

Las alteraciones cognitivas iniciales son falta de concentración y de atención y disminución de la capacidad intelectual. Los pacientes con EH presentan un descenso continuo en la atención acompañado de un descenso en el estado de alerta desde el grado II al grado III finalizando en coma (Weissenborn et al., 2005a). Incluso los pacientes que parecen no estar clínicamente afectados manifiestan distintos déficits de atención en tests psicométricos, indicando una disfunción de los tres subsistemas que cooperan en la atención: vigilia (capacidad para mantener el estado de alerta), orientación y funciones ejecutivas (como hacer planes, detección de errores, resolución de conflictos, etc). El test de retención de dígitos mide la memoria a corto plazo, cuantificando el número de dígitos ordenados de forma seriada que un paciente puede recordar de forma correcta tras haberlos escuchado o leído. Otro test de memoria a corto plazo es la lista de palabras de Luria (Christensen, 1984). En estos dos tests los pacientes con EH obtienen peores resultados que los sujetos control (Weissenborn et al., 2005b). El test de memoria de fotografías o dibujos mide la memoria a largo plazo. Se muestran al paciente varias imágenes duplicadas y desordenadas y tiene que recordar donde estaban las imágenes duplicadas y emparejarlas. En este test también se han observado alteraciones en los pacientes con EH (Weissenborn et al., 2005b).

Los pacientes con EH presentan otros déficits cognitivos como alteraciones en la percepción visuoespacial, que se manifiesta por ejemplo en la apraxia, incapacidad para reproducir figuras simples con bloques o figuras. También presentan déficits de aprendizaje, mostrando dificultad a la hora de aprender nuevas tareas. Los pacientes cirróticos con EH obtienen peores resultados que individuos controles en pruebas de inteligencia, aprendizaje y memoria así como de percepción motora y espacial (Puca et al., 1989), sin embargo la capacidad verbal no está alterada. La etiología de la cirrosis no influye en los resultados obtenidos en estas pruebas (Rehnstrom et al., 1977). Los pacientes con hepatitis crónica causada por el virus C también muestran alteraciones cognitivas en tareas que requieren atención, aprendizaje, velocidad psicomotora y flexibilidad mental, indicando que estos pacientes presentan alteraciones psicomotoras similares a los de los pacientes con otras enfermedades crónicas del hígado como la cirrosis por consumo crónico de alcohol (Hilsabeck et al., 2002). Como se ha mencionado anteriormente, en los pacientes con EHM las alteraciones cognitivas no son evidentes y sólo se pueden detectar realizando tests psicométricos específicos. El

término EHM se refiere a cambios sutiles en la función cognitiva y/o motora que pueden ser observados en pacientes con cirrosis que no presentan evidencias clínicas de EH (Amodio et al., 2004). Para diagnosticar la presencia de EHM, se utiliza actualmente la batería denominada Psychometric Hepatic Encephalopathy Score (PHES) que consta de 5 tests psicométricos (Weissenborn et al., 2001):

- **Test de conexiones numéricas A:** consiste en unir por orden los números (del 1 al 25) dispersos en un papel y lo más rápidamente posible, escogiendo siempre el camino más corto. Se mide el tiempo que el paciente tarda en realizar el test.
- **Test de conexión numérica B:** se debe realizar inmediatamente después del test de conexión numérica A. El paciente tiene una hoja con números del 1 al 13 y letras de la A hasta la L. La tarea consiste en conectar números y letras alternándolos, es decir unir el número 1 con la letra A, ésta con el número 2, con la letra B, así sucesivamente. Se mide el tiempo que el paciente necesita para terminar la tarea.
- **Test de la clave de números:** consiste en una hoja con cuadrados en los que se puede ver un número en la parte superior del cuadrado y un símbolo en la parte inferior. Cada símbolo corresponde a un número. El paciente tiene una hoja con cuadrados en los que ve los números en la parte superior y tiene que completarlos con el símbolo que le corresponda lo más rápidamente posible. Tiempo máximo disponible 90 segundos. Se cuantifica el número de cuadrados que el paciente es capaz de completar correctamente.
- **Test de puntos seriados:** consiste en 10 filas de círculos en los que el paciente tiene que poner un punto en el centro de cada círculo de la forma más precisa y rápida posible. Cuando termine una fila deberá empezar con la siguiente. Se mide el tiempo que necesita para llevar a cabo la tarea.
- **Test de trazado de líneas:** consiste en trazar una línea continua entre dos líneas paralelas de trazado irregular. No debe tocar ni cruzar las líneas pintadas. No puede mover el papel ni levantar la punta del rotulador. Se mide el tiempo que necesita para realizar la tarea y los errores cometidos.

Los resultados obtenidos en los test de la batería PHES se ajustan en función de la edad y el nivel de formación de acuerdo con las tablas de normalidad de los sujetos control ([www.redeh.org](http://www.redeh.org)). Se considera que un paciente presenta EHM cuando en esta batería obtiene una puntuación igual o inferior a - 4 (Weissenborn et al., 2001).

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

### **1.4.3. Función cognitiva: Memoria y Aprendizaje. Papel del hipocampo y del cerebelo**

El aprendizaje es el proceso de adquisición de conocimientos, habilidades o actitudes a través de la experiencia o la educación, lo que origina un cambio persistente, cuantificable y específico en el comportamiento de un individuo. La memoria incluye todos los procesos que permiten el registro, codificación, consolidación, almacenamiento y recuperación de la información (Kandel, 2000). El hipocampo es la principal área involucrada en la memoria declarativa junto con otras estructuras del lóbulo temporal medial (Squire y Zola, 1996). Está implicado en la formación y consolidación de la memoria espacial, como se ha demostrado en distintos estudios de lesión del hipocampo. Por otro lado, la memoria implícita o no declarativa responde a la pregunta de “cómo”. Incluye la adquisición de habilidades motoras y hábitos y está mediada principalmente por el neocórtex y el cerebelo (Salmon y Butters, 1995). Cualquier tipo de aprendizaje y memoria depende de una red neuronal específica, sin embargo en el sistema nervioso los circuitos están interconectados (Kandel, 2000).

El hipocampo juega un papel esencial en la modulación del aprendizaje y la memoria espacial. Una de las teorías más importantes de la función del hipocampo ha sido la teoría del mapa cognitivo propuesta por O'Keefe y Nadel (1978). El principal impulso para la teoría del mapa cognitivo fue el descubrimiento de que la tasa de disparo de las neuronas del hipocampo correlacionaba con la ubicación del animal en un test espacial (O'Keefe y Dostrovsky, 1971; O'Keefe, 1976; O'Keefe y Conway, 1978). En el modelo de O'Keefe y Nadel, en la memoria y aprendizaje participan dos sistemas independientes: el primero es el sistema cartográfico, dependiente de hipocampo, cuya característica fundamental es la capacidad de reajustarse de forma continua a los cambios en las pistas visuales del entorno conforme el individuo se mueve hacia el

objetivo. El segundo es el sistema táxico, independiente del hipocampo y que implica una asociación entre estímulo y respuesta. Desde su creación, la teoría del mapa cognitivo obtuvo un apoyo considerable principalmente gracias a estudios con lesiones. Por ejemplo, ratas con lesiones del hipocampo presentan déficits en el aprendizaje del laberinto radial (Olton et al., 1979; Jarrard 1983), del laberinto en T (Rawlins y Olton, 1982) y del laberinto acuático de Morris (Morris et al., 1982).

En esta tesis se emplearán el laberinto radial y el laberinto acuático de Morris para evaluar el deterioro de la memoria y del aprendizaje espacial de las ratas.

Observaciones clínicas realizadas durante décadas han mostrado que el cerebelo es la principal área cerebral responsable de la regulación de determinados aspectos de la función y la coordinación motoras (Snider et al., 1976; Schmähmann, 1991). Otros estudios evidencian el papel del cerebelo en el aprendizaje motor (Vezina y Kim, 1999), en la memoria de trabajo (Desmond et al., 1997; Wiggs et al., 1999) y en ciertas funciones cognitivas no motoras (Arriada-Mendicoa et al., 1999). Se ha demostrado recientemente la implicación del cerebelo en diversos tipos de procesos cognitivos, como la atención visuo-espacial, navegación espacial, mecanismos de aprendizaje, planificación y adecuación temporal y en la modulación de la función verbal (Gordon, 2007; Oliveri et al., 2007). Algunos tipos de aprendizaje, como la respuesta de parpadeo condicionada, también se forman y almacenan en el cerebelo (Krupa et al., 1993; Krupa y Thompson, 1995). El cerebelo también juega un papel en el aprendizaje espacial que no se limita a los componentes motores sino que incluye componentes cognitivos del aprendizaje espacial (Martin et al., 2003). Además, existen datos que apoyan que la función de la vía glutamato-óxido nítrico (NO)-GMPc en cerebelo modula algunos tipos de aprendizaje, incluyendo la capacidad de aprendizaje de una tarea en el laberinto en Y (Yamada et al., 1996; Erceg et al., 2005a; Piedrafita et al., 2007; Llansola et al., 2009). La capacidad de aprendizaje de esta tarea está disminuida en ratas con hiperamonemia o EHM (Hernandez-Rabaza et al., 2016a; Erceg et al., 2005a), que también presentan incoordinación motora. Estos datos y otros de la literatura (Felipo et al., 2014; Butz et al., 2010) indican que el cerebelo es una de las primeras áreas que se altera en EHM, contribuyendo a las alteraciones cognitivas y motoras tempranas en EHM. Ratas con hiperamonemia y encefalopatía hepática mínima muestran un aumento del GABA extracelular y del tono GABAérgico. (Cauli et al., 2009a; Gonzalez-Usano et al., 2014, Agusti et al., 2017). Reduciendo la activación del receptor GABA<sub>A</sub> se recupera la

coordinación motora y la alteración del aprendizaje en el laberinto en Y (Cauli et al., 2009a; Gonzalez-Usano et al., 2014). Estos datos sugieren que el GABA extracelular podría mediar los efectos de la neuroinflamación sobre la coordinación motora y el aprendizaje del laberinto en Y.

En esta tesis se emplearán una tarea de aprendizaje en el laberinto en Y para medir el deterioro cognitivo dependiente de cerebelo y el beam walking test para evaluar la coordinación motora de nuestro modelo animal.

### **1.5.Sinergia entre inflamación periférica e hiperamonemia en la inducción de EH**

Los principales factores que contribuyen al deterioro cognitivo en EH son la hiperamonemia y la inflamación. La hiperamonemia es el principal factor que contribuye a las alteraciones cerebrales en EH (Felipo y Butterworth, 2002; Felipo, 2008). Estudios recientes sugieren que la inflamación potencia las alteraciones neuropsicológicas inducidas por la hiperamonemia y que el efecto sinérgico de hiperamonemia e inflamación es el principal responsable de las alteraciones neurológicas en EH. La hiperamonemia inducida en pacientes cirróticos deteriora el rendimiento en los tests neuropsicológicos durante el estado inflamatorio, pero no tras su resolución (Shawcross et al., 2004). Además, la presencia y severidad de EHM son independientes de la severidad de la enfermedad del hígado y de la concentración de amonio en sangre, pero la concentración de marcadores de inflamación son más altos en los pacientes con EHM (Shawcross et al., 2007).

Se ha estudiado la contribución de la hiperamonemia y de factores inflamatorios al deterioro cognitivo en EHM, encontrando que los niveles de las interleucinas proinflamatorias IL6 e IL18 están aumentadas en pacientes con EHM comparados con pacientes sin EHM y que la concentración en suero de estas interleucinas es útil para discriminar entre pacientes cirróticos sin y con EHM (Montoliu et al., 2009). Esto sugiere que la inflamación relacionada con IL6 e IL18 parece contribuir a la EHM.

Se ha investigado también el papel de la inflamación y la hiperamonemia en la inducción de deterioro cognitivo leve (o EHM) en pacientes con distintas enfermedades hepáticas y dermatológicas, con diferentes grados de hiperamonemia y/o inflamación (Felipo et al., 2012b). Todos los grupos de pacientes muestran algún grado de inflamación, pero el grado y el tipo de inflamación es diferente para los diferentes tipos

de pacientes, con diferentes aportaciones relativas de IL-6 y de IL-18. La hiperamonemia por sí sola no induce deterioro cognitivo según la evaluación realizada con la batería PHES. Los pacientes con queloides o cirrosis sin deterioro cognitivo muestran niveles de amonío no muy diferentes de los niveles de pacientes con queloides o cirrosis con deterioro cognitivo. La inflamación sola tampoco induce deterioro cognitivo. Los pacientes con esteatohepatitis no alcohólica (NASH) sin EHM muestran niveles muy altos de IL-18 ( $194 \pm 57$  pg/ml) y niveles moderados de IL-6 ( $9,4 \pm 1,3$  pg/ml) e hiperamonemia leve ( $115 \pm 19$   $\mu$ M) y no muestran déficits cognitivos. Un ligero aumento de amonío ( $124 \pm 13$   $\mu$ M) y un aumento de IL-6 a  $14 \pm 4$  pg/ml conducen a un deterioro cognitivo leve en pacientes con NASH. Estos datos coinciden con un estudio anterior que muestra que los pacientes cirróticos con niveles de IL-6 inferiores a 11 pg/ml no muestran MHE y los pacientes con niveles de IL-6 por encima de 11 pg / ml muestran MHE (Montoliu et al., 2009). Felipe y colaboradores (2012) concluyeron que en pacientes con enfermedades hepáticas (cirrosis, esteatohepatitis) el deterioro cognitivo puede aparecer antes de la progresión a cirrosis, si los niveles de amonío y de inflamación son lo suficientemente altos, y que niveles elevados de inflamación e hiperamonemia son suficientes para inducir deterioro cognitivo leve incluso en ausencia de cirrosis.

### **1.6. Papel de la Neuroinflamación en la Encefalopatía Hepática**

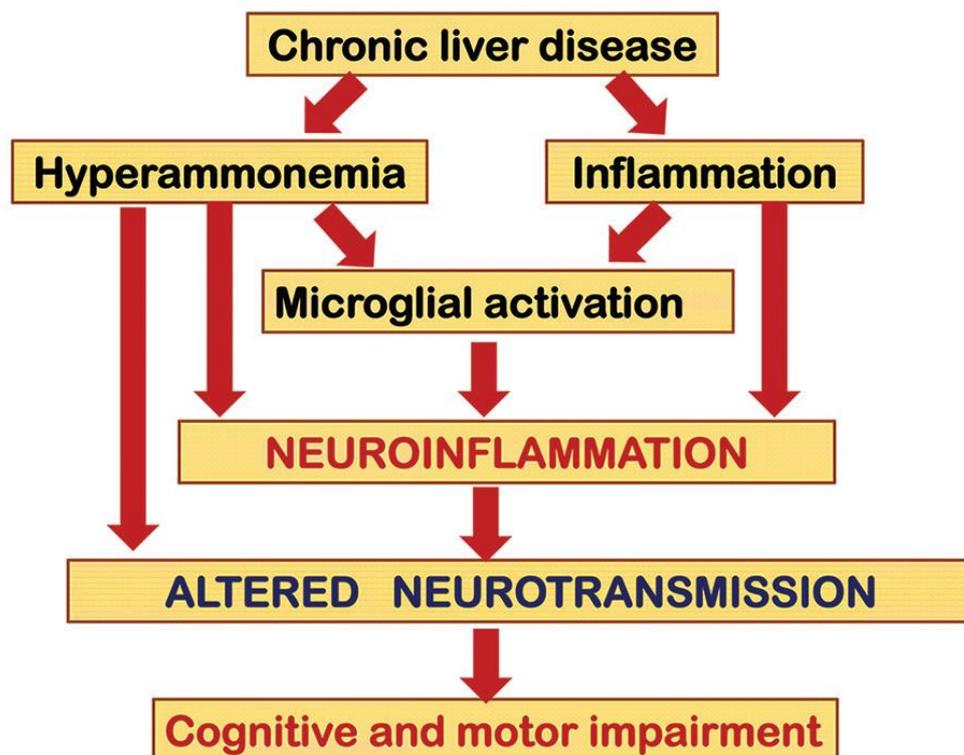
Estudios realizados en los últimos años, proporcionan pruebas convincentes de un papel de la neuroinflamación (inflamación del cerebro en sí) en las alteraciones neurológicas en encefalopatía hepática. Se ha observado en modelos de EH aguda activación de células gliales, (microglía y astrocitos), junto con un aumento de la síntesis in situ de citocinas proinflamatorias TNF, IL-1 $\beta$  e IL-6 (Butterworth, 2013).

Uno de los principales métodos para evaluar la neuroinflamación es el análisis por tomografía de emisión de positrones (PET) de la unión de ligandos a la proteína translocadora (18 kDa) (TSPO). Cagnin et al. (2006) mostraron utilizando técnicas PET que los pacientes cirróticos con HE presentaban un aumento de la unión de PK11195 a TSPO en el cerebro. Además, los pacientes con deterioro cognitivo más severo tuvieron un mayor aumento en la unión de PK11195. Los autores sugirieron que una alteración de las células gliales podría estar relacionada con la alteración de la función cerebral en HE. Estos datos sugieren la presencia de neuroinflamación en pacientes con HE,

correlacionando con el grado de deterioro cognitivo. Dennis y colaboradores (2014) realizaron estudios de inmunohistoquímica y análisis de citocinas en tejido cerebral postmortem de alcohólicos crónicos con cirrosis y HE, alcohólicos sin HE y controles. Alrededor de la mitad de los pacientes con HE mostraron la que se conoce como "HE proliferativa (pHE)" y la otra mitad no. La microglía en pHEs mostraba una morfología activada con cuerpos celulares hipertrofiados y procesos cortos y espesos. Estos pacientes también mostraban niveles aumentados de IL-6. En contraste, la microglía en las regiones de sustancia blanca de los casos de HE no proliferativos estaba menos activada y distrófica. Los autores sugieren que la proliferación microglial puede formar parte de una respuesta neuroprotectora temprana en HE que finalmente falla en detener el curso de la enfermedad debido a factores etiológicos subyacentes como el amonío cerebral elevado y la inflamación sistémica. Zemtsova et al., (2011) también analizaron marcadores de neuroinflamación en tejido cerebral post mortem de pacientes cirróticos con y sin HE y controles no cirróticos. Encontraron un aumento de la expresión del marcador de activación microglial Iba-1 en la corteza cerebral de pacientes con cirrosis con HE, pero no en pacientes con cirrosis sin HE. En este estudio, se analizó la expresión del mRNA y de las proteínas de iNOS y ciclooxigenasa (COX-2) o la expresión del mRNA de las citocinas pro-inflamatorias y proteína quimioatrayente de monocitos 1 (MCP-1) en corteza cerebral. La expresión de estos factores no fue diferente en pacientes con cirrosis hepática y HE y en pacientes sin HE o en sujetos control sin cirrosis. Este estudio muestra un aumento de la activación microglial en pacientes con HE pero no encontró aumento en los niveles de marcadores proinflamatorios.

También se ha observado la presencia de neuroinflamación en pacientes con hepatitis C (HC). Sin embargo, en estos pacientes la neuroinflamación podría ser consecuencia de la presencia del virus en el cerebro. Estudios postmortem indican que la replicación viral puede ocurrir en el cerebro y la microglía puede ser el locus para la infección y la posterior actividad neuroinflamatoria. (Vivithanaporn et al., 2010; Grover et al., 2012). Grover et al. (2012) utilizaron dos técnicas de imagen in vivo independientes para evaluar la presencia de neuroinflamación en pacientes con HC crónica leve y sujetos control. Utilizando la espectroscopia de resonancia magnética, encontraron que los ratios mio-inositol/creatina y colina/creatina en ganglios basales estaban significativamente elevados en pacientes con HC crónica en comparación con los controles. Utilizando la técnica PET con un ligando para la activación de

microglía/macrófagos cerebrales, PK11195, Grover et al. (2012) encontraron evidencia de activación microglial, que se correlacionó positivamente con la viremia de HC y el metabolismo cerebral alterado. Esto sugiere que el virus de la hepatitis C induce neuroinflamación, lo que contribuiría a las alteraciones cognitivas en los pacientes con HC. Aunque en los pacientes con HC la neuroinflamación parece ser causada principalmente por la presencia del virus en el cerebro, (Vivithanaporn et al., 2010; Grover et al., 2012) los estudios de Cagnin (2006), Dennis (2014) y Zemtsova (2011) sugieren que la neuroinflamación también podría estar presente en pacientes con cirrosis hepática en ausencia de infección viral.



**Figure 7. Papel de la neuroinflamación en la inducción de EH.** En fallo hepático crónico, la hiperamonemia y la inflamación actúan sinérgicamente induciendo la activación de microglia y neuroinflamación la cual altera la neurotransmisión que es el responsable del deterioro cognitivo y motor.

La presencia de la neuroinflamación y su contribución al deterioro cognitivo se ha demostrado en estudios con modelos animales de hiperamonemia y EH. Cauli et al., (2007) mostraron que las ratas con anastomosis porto-cava (PCS), uno de los modelos principales de EHM presentan neuroinflamación, con un aumento en los niveles de marcadores inflamatorios como la IL-6 o actividad de COX en el cerebro. Las ratas PCS presentan una capacidad reducida para aprender una tarea en un laberinto en Y debido a la alteración de la función de la vía glutamato-óxido nítrico (NO)-cGMP en cerebelo

(Erceg et al., 2005b). Cauli et al. (2007) demostraron también que el tratamiento crónico con ibuprofeno, un antiinflamatorio, reducía la neuroinflamación y restauraba la capacidad de aprender la tarea del laberinto en Y restaurando la función de la vía del glutamato-NO-GMPc en cerebelo in vivo. Estos resultados mostraron por primera vez que la neuroinflamación es un contribuyente esencial al deterioro cognitivo en EHM (Figura 7) La neuroinflamación también contribuye a otros tipos de alteraciones cognitivas y motoras alterando otros mecanismos específicos que las modulan. Por ejemplo, la neuroinflamación también contribuye a la hipoquinesia en ratas con EHM y el tratamiento crónico con ibuprofeno recupera la función motora (Cauli et al., 2009b). Los mecanismos y las áreas cerebrales involucradas en la hipoquinesia inducida por neuroinflamación son diferentes de las involucradas en el aprendizaje en el laberinto Y. La hipoquinesia en las ratas PCS se debe al aumento de los niveles de glutamato extracelular en la sustancia nigra pars reticulata (SNr). Una disminución de la cantidad de transportadores de glutamato contribuye a este aumento. El tratamiento crónico de ratas PCS con ibuprofeno normaliza la cantidad de transportadores de glutamato, reduce el glutamato extracelular en SNr y normaliza la actividad motora.

La presencia de neuroinflamación y su contribución a las alteraciones cognitivas y motoras también se han demostrado en otro modelo animal de EHM: ratas con ligadura del conducto biliar (BDL). Rodrigo et al. (2010) demostraron por inmunohistoquímica que las ratas BDL presentan activación de la microglia, principalmente en el cerebelo. Esto se asocia con aumento de los niveles de factores inflamatorios (óxido nítrico sintasa inducible, IL-1 $\beta$ , prostaglandina E2) y con deterioro cognitivo e hipoquinesia. De forma similar a los estudios anteriores, el tratamiento crónico con ibuprofeno reducía la activación microglial y los marcadores inflamatorios y restauraba las funciones cognitivas y motoras en las ratas BDL.

Los estudios anteriores apoyan claramente la idea de que la EHM en condiciones de fallo hepático crónico se asocia con neuroinflamación que afecta a diferentes procesos cerebrales que resultan en diferentes tipos de alteraciones cognitivas y motoras (Figura 7). Esta neuroinflamación es consecuencia de la activación de dos tipos de células gliales, la microglía y los astrocitos.

### **1.6.1. Células gliales y neuroinflamación: la microglía**

Las células gliales, descritas como células no excitables del SNC, son una población altamente heterogénea, que inicia, participa y regula muchas funciones cerebrales importantes. El principal promotor de la neuroinflamación en muchas condiciones patológicas, incluyendo la hiperamonemia crónica y la EH es la microglía. (Rodrigo et al., 2010; Agusti et al., 2011; Hernandez-Rabaza et al., 2015, 2016a, 2016b; Cabrera et al., 2016.)

La microglía, las células arquetípicas de la inmunidad innata del SNC (Ransohoff y Cardona, 2010), son una única población celular mieloide, derivada del saco vitelino durante una estrecha ventana de tiempo antes de la vascularización o hematopoyesis definitiva en el embrión (Ginhoux et al., 2010). Una vez establecida en el parénquima del SNC, la microglía se mantiene por la proliferación de progenitores residentes, independientemente de las células sanguíneas (Ajami et al., 2007).

En condiciones fisiológicas, la microglía presenta una morfología muy ramificada que se denomina “estado de reposo”. La célula microglial en reposo se caracteriza por un pequeño cuerpo celular y procesos finos muy elaborados, que envían múltiples ramas que reconocen continuamente su microambiente local (Nimmerjahn et al., 2005). Al igual que los astrocitos, cada célula microglial tiene su propio territorio, de aproximadamente 15 a 30  $\mu\text{m}$  de ancho. Hay muy poco solapamiento entre territorios vecinos. Los procesos de las células microgliales en reposo se mueven constantemente a través de su territorio. Esto es un movimiento relativamente rápido con una velocidad de aproximadamente 1,5  $\mu\text{m}/\text{min}$  y por lo tanto los procesos microgliales representan las estructuras móviles más rápidas en el cerebro (Morsch et al., 2015).

Al mismo tiempo, los procesos microgliales también envían y retraen constantemente pequeñas protuberancias, que pueden crecer y encogerse 2-3  $\mu\text{m}/\text{min}$ . La microglía parece estar escaneando aleatoriamente a través de sus dominios y, teniendo en cuenta la velocidad de este movimiento, el parénquima cerebral puede ser completamente escaneado por los procesos microgliales cada varias horas. La motilidad de los procesos no se ve afectada por el disparo neuronal, pero es sensible a los activadores (ATP y sus análogos) e inhibidores de los receptores purinérgicos (Inoue, 2002). El daño neuronal focal induce un movimiento rápido de muchos procesos microgliales hacia el sitio de la lesión, y en menos de una hora la lesión puede estar completamente rodeados por estos procesos. Esta motilidad inducida por lesiones también se rige, al menos en parte, por la

activación de los receptores purinérgicos. La microglía también es sensible a la inhibición de las uniones gap, en las cuales participan los astrocitos. La inhibición de las uniones gap también afecta la motilidad fisiológica de los procesos astrogliales. Por lo tanto, parece que los astrocitos envían señales a la microglía liberando ATP (y posiblemente algunas otras moléculas). En cualquier caso, los procesos microgliales actúan como un sistema de escáner muy sofisticado y rápido. Este sistema puede, en virtud de receptores que residen en la membrana plasmática de la microglía, detectar inmediatamente la lesión e iniciar el proceso de respuesta activa por parte de la microglía.

Cuando un insulto cerebral es detectado por las células microgliales, estas sufren una transformación gradual del estado reposo con morfología ramificada a una forma activada y ameboide (Hanisch y Kettenmann, 2007). Este proceso se denomina generalmente "activación microglial" y se produce a través de varios pasos. Durante la primera fase de la activación de la microglia, las microglías en reposo retraen sus procesos, que disminuyen su número y se vuelven mucho más gruesos, aumentan el tamaño de sus cuerpos celulares, cambian la expresión de varias enzimas y receptores y comienzan a producir moléculas de respuesta inmune. Algunas células microgliales regresan a una modalidad proliferativa y las células microgliales alrededor del sitio de la lesión comienzan a multiplicarse. Las células microgliales se vuelven móviles y mediante movimientos de tipo ameboide se reúnen alrededor de los sitios del insulto. Si el daño persiste y las células del SNC comienzan a morir, las células microgliales sufren una mayor transformación y se convierten en fagocitos. Esto es una explicación resumida e incompleta de los cambios complejos y altamente coordinados que ocurren en las células microgliales. El proceso de activación es gradual y lo más probable es que existan muchos sub-estados en el camino desde la microglía en reposo hasta la microglía fagocítica. Además, las células microgliales activadas pueden mostrar propiedades bastante heterogéneas en diferentes tipos de patologías y en diferentes partes del cerebro.

### **1.6.2. Células gliales y neuroinflamación: los astrocitos**

El segundo tipo de célula glial más importante que participa en el proceso neuroinflamatorio son los astrocitos. Los astrocitos (literalmente "células parecidas a las estrellas") son las células gliales más numerosas y diversas del SNC presentando

propiedades fisiológicas muy diferentes según la región cerebral donde se encuentran (Matyash y Kettenmann, 2010).

La morfología de los astrocitos es muy heterogénea. Algunos astrocitos tienen una apariencia estelar, con varios procesos primarios originados en el soma, aunque existen muchos más perfiles morfológicos. Un rasgo morfológico arquetípico de los astrocitos es su expresión de filamentos intermedios, que forman el citoesqueleto. Los principales tipos de proteínas de filamento intermedio astrogial son la proteína ácida fibrilar glial (GFAP) y vimentina. La expresión de GFAP se utiliza comúnmente como un marcador específico para la identificación de astrocitos. Funciona bien en cultivo de astrocitos, pero in vivo los niveles de expresión de GFAP varían considerablemente: por ejemplo, GFAP se expresa virtualmente en todas las células de Bergmann en el cerebelo, mientras que sólo alrededor del 15-20 por ciento de astrocitos en la corteza de animales maduros expresan GFAP (Middeldorp J y Hol, 2011).

Los **astrocitos protoplasmáticos** están presentes en la materia gris. Tienen muchos procesos finos (aproximadamente  $\sim 50 \mu\text{m}$  de longitud), que son extremadamente elaborados y complejos. Los procesos de los astrocitos protoplasmáticos entran en contacto con los vasos sanguíneos, formando los llamados pies perivasculares y forman múltiples contactos con las neuronas. Algunos astrocitos protoplasmáticos también envían procesos a la superficie pial, donde forman los pies "subpiales" de la membrana limitante glial. La densidad de los astrocitos protoplasmáticos en la corteza varía entre 10.000 y 30.000 por  $\text{mm}^3$ ; La superficie de sus procesos (en rodeos) puede alcanzar hasta 60000 - 80 000  $\mu\text{m}^2$ , y cubren la mayor parte de las membranas neuronales a su alcance (Verkhatsky y Butt, 2007).

Los **astrocitos fibrosos** están presentes en la sustancia blanca. Sus procesos tienen una longitud de hasta 300  $\mu\text{m}$ , aunque mucho menos elaborados en comparación con la astrogia protoplasmática. Los procesos de los astrocitos fibrosos establecen varios contactos perivasculares o subpiales. Los procesos de los astrocitos fibrosos también envían numerosas extensiones (procesos "perinodales") que contactan con axones en los nodos de Ranvier. La densidad de astrocitos fibrosos es  $\sim 200\ 000$  células por  $\text{mm}^3$ . (Verkhatsky y Butt, 2007).

El cerebelo contiene un tipo de astrogia especializada llamada **glia de Bergmann**. Tienen cuerpos celulares relativamente pequeños ( $\sim 15 \mu\text{m}$  de diámetro) y 3 - 6 procesos que se extienden desde la capa de células de Purkinje hasta la superficie pial. Al comienzo del desarrollo, estas células tienen contacto con la superficie ventricular y

son verdaderas células gliales radiales (células con forma bipolar presentes en el desarrollo del sistema nervioso central y que sirven como progenitor primario capaz de generar neuronas, astrocitos y oligodendrocitos). Con el desarrollo de la capa granular, adquieren la morfología clásica de las células gliales de Bergmann. Por lo general, varias células gliales de Bergmann (~ 8 en roedores) rodean una sola neurona de Purkinje y sus procesos forman una envoltura de las dendritas de las células de Purkinje. Los procesos de las glia de Bergmann son extremadamente elaborados y forman estrechos contactos con las sinapsis formadas por fibras paralelas en las dendritas de las neuronas de Purkinje. Cada célula glial de Bergmann proporciona cobertura para hasta 8000 de tales sinapsis. (Verkhatsky y Butt, 2007).

Los astrocitos desempeñan muchas funciones; crean y mantienen el microambiente cerebral (Chouard y Gray, 2010), construyen la microarquitectura del parénquima cerebral (Nave, 2010), mantienen la homeostasis del cerebro, almacenan y distribuyen sustratos energéticos, controlan el desarrollo de las células neurales (Chouard y Gray, 2010), la sinaptogénesis y el mantenimiento sináptico (Eroglu y Barres, 2010) y contribuyen a la defensa del cerebro frente a variados tipos de insultos (Smith, 2010).

El potencial patológico de la neuroglia fue reconocido ya a finales del siglo XIX y principios del siglo XX por neuropatólogos prominentes como Carl Frommann, Franz Nissl, Alois Alzheimer y Pio del Río-Hortega. No obstante, el conocimiento detallado de la importancia patológica de la neuroglia en general y de la astroglia en particular sigue siendo fragmentario. Los astrocitos son fundamentales para el control de la homeostasis del cerebro y también representan una parte importante del sistema intrínseco de defensa cerebral. Los insultos cerebrales de etiología múltiple desencadenan una respuesta de defensa astrogliosa conservada evolutivamente, generalmente denominada astrogliosis reactiva. La astrogliosis es esencial tanto para limitar las áreas de daño (por formación de cicatrices mediante astrogliosis anisomórfica) como para la remodelación post-insulto y recuperación de la función neural (por astrogliosis isomórfica).

Los astrocitos juegan un papel en todo tipo de patologías cerebrales desde lesiones agudas (trauma o infarto) hasta procesos neurodegenerativos crónicos (como las enfermedades de Alexander, de Alzheimer, de Parkinson, la esclerosis múltiple y otras) y en enfermedades psiquiátricas (Heneka et al., 2010). Los procesos neurogliales patológicamente relevantes son muchos, e incluyen varios programas de activación, que

son esenciales para limitar las áreas de daño, producir respuestas neuro-inmunes y para la remodelación post-insulto y la recuperación de la función neural.

Estos programas de activación coinciden con algunos cambios morfológicos y moleculares que son indicativos del estado de activación de los astrocitos. La regulación positiva en astrocitos reactivos de las proteínas de los filamentos intermedios, en particular GFAP y vimentina, es quizás el sello más conocido de reactividad. Esto se acompaña con una hipertrofia característica del cuerpo celular y de sus procesos. Estos cambios se han observado tras muchos tipos de lesiones, incluyendo traumas mecánicos, isquemia/hipoxia, inflamación, neurodegeneración y prácticamente en todas las áreas del SNC (Eng et al., 2000, Sofroniew y Vinters, 2010; Middeldorp y Hol, 2011). Cuando existe una activación extrema de los astrocitos en respuesta a un daño evidente y a una inflamación prolongada del tejido, los astrocitos reactivos forman una cicatriz que puede persistir durante mucho tiempo incluso después de que se elimine el insulto desencadenante. Estudios recientes también enfatizan el papel de la degeneración y la atrofia astrogliar en las primeras etapas de diversos trastornos neurodegenerativos y cognitivos (Rossi et al., 2008; Rajkowska y Stockmeier, 2013; Williams et al., 2013; Verkhratsky et al., 2014a, 2014b). En general, las células astrogliales determinan en gran medida la progresión y el resultado de las enfermedades neurológicas representando por tanto una posible diana terapéutica en enfermedades caracterizadas por procesos neuroinflamatorios.

### **1.7. Papel de la inflamación periférica en la inducción de neuroinflamación y en el deterioro cognitivo y motor en encefalopatía hepática**

Estudios recientes apoyan la idea de que la inflamación periférica puede conducir a alteraciones cognitivas y motoras en diferentes situaciones patológicas como la artritis reumatoide, diabetes, o tras cirugías agresivas (Montoliu et al., 2015).

Los mecanismos implicados en esta relación entre inflamación periférica y SNC no están aún del todo claros. En general, las citocinas no pueden cruzar directamente la barrera hematoencefálica (BHE). Sin embargo, existen mecanismos que conectan el sistema inmune periférico con el cerebro, tales como, por ejemplo:

- infiltración de células sanguíneas en cerebro (Ransohoff et al., 2003);

- estimulación por parte de las citocinas de la sangre de receptores en células endoteliales, disparando de este modo la liberación de factores inflamatorios en el cerebro (Gautron et al., 2002; Rummel et al., 2006).
- la señalización por fibras nerviosas aferentes (nervio vago) (Hosoi et al., 2002)

El mecanismo de inducción de neuroinflamación por señalización por fibras nerviosas aferentes (Hosoi et al., 2002) está poco estudiado. Estudios en las últimas décadas proponen que el nervio vago aferente es un componente importante para transmitir señales inmunes periféricas al cerebro. La inyección periférica de IL-1b aumenta la actividad del nervio aferente vagal en las terminaciones hepática (Niijima, 1996) y gástrica (Kurosawa et al., 1997) de ratas anestesiadas. Además, Ek et al. (1998) demostraron que los somas y/o fibras del nervio vago expresan receptores de IL-1 y prostaglandina E2 y que la IL-1b circulante estimula la actividad sensorial vagal a través de mecanismos tanto dependientes como independientes de la prostaglandina. La administración periférica de IL-1b y LPS produce activación de c-fos en el núcleo del tracto solitario (NTS), que es el sitio de terminación predominante del nervio vago aferente (Ericsson et al., 1994; Brady et al., 1994). La vagotomía subdiafragmática inhibe los efectos conductuales y neuronales de IL-1b o LPS periféricos, incluyendo efectos sobre la exploración social (Bluthe et al., 1994 y 1996) anorexia (Bret-Dibat et al., 1995), respuesta a la fiebre (Hansen y Krueger, 1997; Sehic y Blatteis, 1996), estimulación del eje hipotalámico-hipofisiario-adrenal (HPA) (Gaykema et al., 1995; Kapcala et al., 1996), y la expresión del mRNA de IL-1b en cerebro (Hansen et al., 1998; Laye et al., 1995). Además, la transección selectiva del nervio vago hepático inhibe la respuesta pirogénica inducida por LPS, lo que indica que el nervio vago hepático juega un papel importante en la transducción de esta señal pirogénica de la periferia al cerebro (Simons et al., 1998).

Uno de los mecanismos más estudiado de comunicación entre inflamación periférica y cerebro es la infiltración directa de células sanguíneas en cerebro. Existen varias vías para la entrada de leucocitos en el SNC (Ransohoff et al., 2003). Este mecanismo en concreto, se explicará con más detalle en el apartado 2.6.2.

Otra conexión entre sistema inmune y cerebro es la estimulación de receptores de células endoteliales de la sangre por parte de citocinas periféricas y la subsiguiente producción in situ de factores inflamatorios en cerebro. En modelos animales se ha demostrado que la inducción de inflamación por administración periférica de

lipopolisacárido (LPS) activa STAT3 en células endoteliales de cerebro y en astrocitos (Gautron et al, 2002). Rummel et al (2006) mostraron que la IL-6 periférica activa receptores en células endoteliales conduciendo a la activación de STAT3 y a la inducción de la cyclooxygenasa 2 y el aumento de prostaglandina E2 (inflamatoria) en cerebro. Estos efectos se previenen por un anticuerpo que neutraliza la IL-6. Este mecanismo permite a IL-6 transducir los efectos de la inflamación periférica al cerebro. El TNF- $\alpha$  también puede activar receptores en células endoteliales y conducir en cerebro a neuroinflamación y a deterioro cognitivo. Distintas enfermedades inflamatorias crónicas inducen deterioro cognitivo. El tratamiento periférico con anti-TNF $\alpha$  mejora el deterioro cognitivo en algunas de ellas, como en pacientes con sarcoidosis o con artritis reumatoide (Raftery et al, 2012; Elfferich et al., 2010). Debido a su gran tamaño, el anti-TNF- $\alpha$  no atraviesa la barrera hematoencefálica, lo que indica que sus efectos beneficiosos son consecuencia de la reducción de la inflamación periférica. Bloqueando la acción periférica de TNF $\alpha$  ó IL-1 $\beta$  también se mejora el deterioro cognitivo postoperatorio (Cibelli et al, 2010; Terrando et al, 2010).

### **1.7.1. Anti-TNF- $\alpha$ : Infliximab**

Infliximab o Remicade (nombre comercial) es un anticuerpo monoclonal quimérico que bloquea la acción del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) y se usa como tratamiento para enfermedades autoinmunes. Infliximab se aprobó por la Agencia de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos (U.S. Food and Drug Administration) como tratamiento para la artritis reumatoide, artritis psoriásica, colitis ulcerativa, espondilitis anquilosante, psoriasis y enfermedad de Crohn. (<http://www.remicade.com/>)

Infliximab se administra por infusión intravenosa, típicamente a intervalos de seis a ocho semanas. No se puede administrar por vía oral porque el sistema digestivo destruiría la droga.

Infliximab es un anticuerpo artificial y originalmente se desarrolló en ratones. Debido a que los seres humanos tienen reacciones inmunitarias a las proteínas de ratón, los dominios comunes de ratón se reemplazaron por dominios similares de anticuerpos humanos. Son anticuerpos monoclonales y debido a que son una combinación de secuencias de aminoácidos de anticuerpos de ratón y humanos, se les llama "anticuerpo monoclonal quimérico".

Las vías de eliminación de infliximab no se han caracterizado. No se detecta infliximab inalterado en la orina. A dosis únicas de 3, 5 o 10 mg/kg, la vida media osciló entre 8 y 9.5 días. En la mayoría de los pacientes el infliximab se puede detectar en el suero durante 8 semanas después de una dosis única de 5 mg/kg para la enfermedad de Crohn y de 3 mg/kg cada 8 semanas para la artritis reumatoide como dosis de mantenimiento (Cornillie et al., 2001).

El Infliximab neutraliza la actividad biológica del TNF- $\alpha$  uniéndose con gran afinidad a la forma soluble (en sangre) y transmembrana (presente en la membrana externa de las células T u otras células del sistema inmune) del TNF- $\alpha$ , e inhibe o previene la unión efectiva del TNF- $\alpha$  con su receptor. (Choy y Panayi, 2001).

Infliximab tiene una elevada especificidad por el TNF- $\alpha$  y no neutraliza el TNF-beta (TNF- $\beta$ ), una citocina perteneciente a la misma familia pero que utiliza receptores diferentes al TNF- $\alpha$ .

En esta tesis hemos utilizado el infliximab para comprobar si la inyección periférica de anti TNF- $\alpha$  reduce la neuroinflamación en ratas con EHM.

### **1.7.2. Infiltración de células del sistema inmune periférico en el SNC**

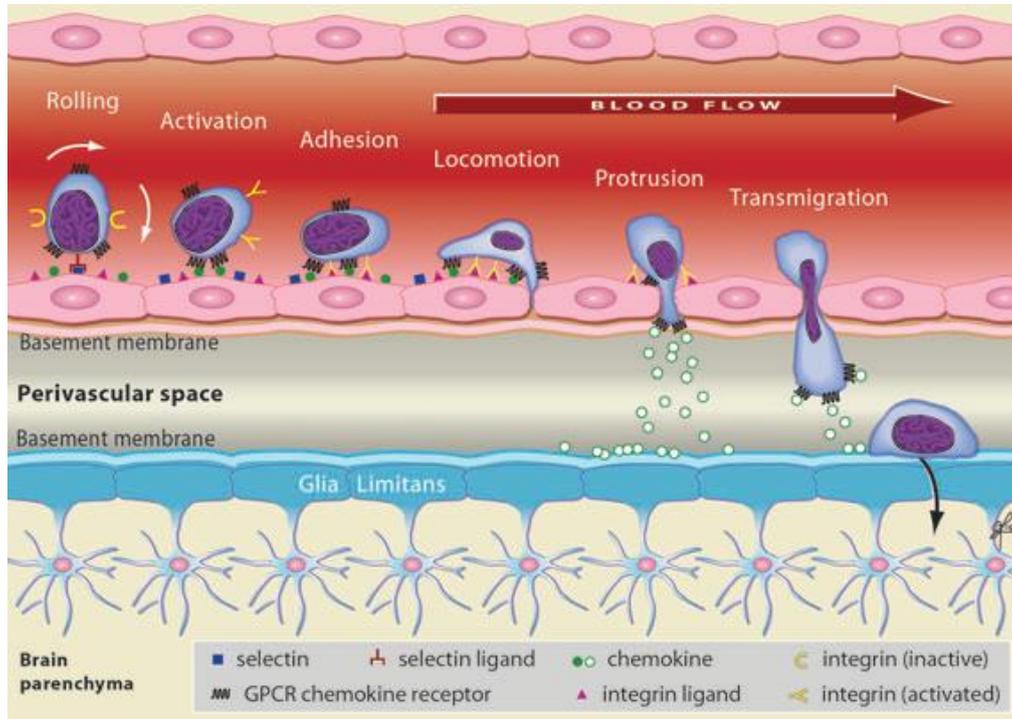
La idea del SNC como un sitio inmunológico privilegiado (Ehrlich, 1885), del cual las células inmunes deberían quedar excluidas, fue inicialmente apoyada por las observaciones de Shirai (1921) y Medawar (1948), que demostraron que injertos de tejidos en ojo o cerebro sobreviven más tiempo que los implantados en otras áreas del cuerpo. En las décadas siguientes, esta noción fue apoyada por datos experimentales que demostraban la separación espacial e inmunológica del SNC de la inmunidad circulante. Espacialmente, se encontró que el SNC era un compartimento cerrado, aislado de la circulación por barreras físicas, y el hecho de que el CNS tiene su propia población de células fagocíticas, la microglia, se utilizó para sostener la opinión de que es un sistema inmunológicamente autónomo, que idealmente funciona en ausencia de vigilancia inmunológica (Barker & Billingham, 1977). En aparente apoyo de este punto de vista, todas las veces que se encontraron células inmunes en los espacios perivasculares del SNC, en el líquido cefalorraquídeo (LCR) o en el mismo parénquima, casi siempre se consideró un signo de enfermedad autoinmune o al menos del comienzo de una enfermedad de este tipo.

En las últimas décadas, la visión generalizada de las células autoinmunes como un rasgo indiscriminadamente negativo de la respuesta inmune ha cambiado radicalmente. Ahora sabemos que el SNC es constantemente vigilado por las células inmunes circulantes dentro del líquido cefalorraquídeo (pero no dentro del parénquima), y que en condiciones fisiológicas, las células T activadas patrullan el SNC, sin necesidad de la aparición de enfermedad autoinmune (Hickey, 1999; Engelhardt y Ransohoff, 2005; Kunis et al., 2013). Además, células T específicas del SNC colaboran en la plasticidad cerebral, tanto en condiciones fisiológicas como patológicas (Kipnis et al, 2012; Rook et al, 2011; Schwartz & Shechter, 2010). La capacidad neuroprotectora de las células autoinmunes se ha demostrado en diferentes modelos de patologías del SNC, incluyendo lesiones mecánicas (Moalem et al, 1999, Hauben et al, 2001, Kipnis et al, 2002, Hofstetter et al, 2003, Ling et al, 2006), enfermedades neurodegenerativas crónicas y desequilibrios en los niveles de neurotransmisores (Schori et al., 2001). En cerebro sano, las células T CD4 + autoinmunes desempeñan un papel en el mantenimiento de la plasticidad neuronal, incluyendo la neurogénesis y el aprendizaje/memoria espacial (Kipnis et al, 2004; Ziv et al, 2006; Radjavi et al, 2014). Por otra parte, el sistema inmune periférico también puede inducir neuroinflamación por infiltración de células periféricas. En la periferia las células T inician respuestas inmunes a través de interacciones con células presentadoras de antígenos (tales como células dendríticas). Sin embargo, en el parénquima cerebral, no existe ninguna célula capaz de actuar como las células dendríticas, salir del SNC, migrar a un vaso linfático local e iniciar una respuesta inmune como se observa en las respuestas inmunitarias adaptativas en otras partes del cuerpo (Louveau et al., 2015; Goldmann et al., 2006; Ransohoff y Engelhardt, 2012). Por lo tanto, las células T responden en la periferia y migran hacia el SNC para responder al insulto (Ransohoff y Brown, 2012). Tras activarse, los linfocitos T pueden diferenciarse en distintos subtipos (Th1, Th2, Th17, Th22, iTreg o Tfh) y secretar diferentes citocinas para inducir distintos tipos de respuestas inmunes (Gutcher y Becher 2007)

Entender los mecanismos mediante los cuales las células del sistema inmune periférico llegan a infiltrarse en el SNC podría proporcionar nuevas estrategias para modular la respuesta inmune patológica y mejorar los mecanismos protectores en enfermedades neuroinflamatorias.

Existen varias vías para la entrada de leucocitos en el SNC (Ransohoff et al., 2003).

La primera, y la más ampliamente estudiada, es desde la sangre en el espacio perivascular a través de la barrera hemato-encefálica (BHE). La BHE abarca los capilares y las vénulas post-capilares, que son los sitios principales para la extravasación de leucocitos de la circulación cerebral (Bechmann et al., 2007; Engelhardt y Ransohoff, 2005). La función de barrera de la BHE se lleva a cabo por células endoteliales cerebrales altamente especializadas, que carecen de vesículas pinocitóticas y fenestras pero poseen uniones intercelulares estrechas. Estas características limitan el movimiento transcelular y paracelular de las moléculas y las células. Abluminalmente, las células endoteliales microvasculares cerebrales están asociadas con una membrana basal (Figura 8) y una matriz extracelular, constituida por colágenos, elastina, fibrilina, laminina y fibronectina (Hayashi et al., 1997, Hurwitz et al., 1993). La membrana basal endotelial delimita la parte vascular del espacio perivascular y constituye otro, a través del cual los leucocitos migratorios penetran antes de la entrada al cerebro. Los procesos de los pies de astrocitos y microgliales forman la glia limitans que, junto con su membrana basal, proporcionan la parte parenquimal del espacio perivascular y el obstáculo final a la entrada de leucocitos en el tejido cerebral (Figura 8) (Bechmann et al., 2007).

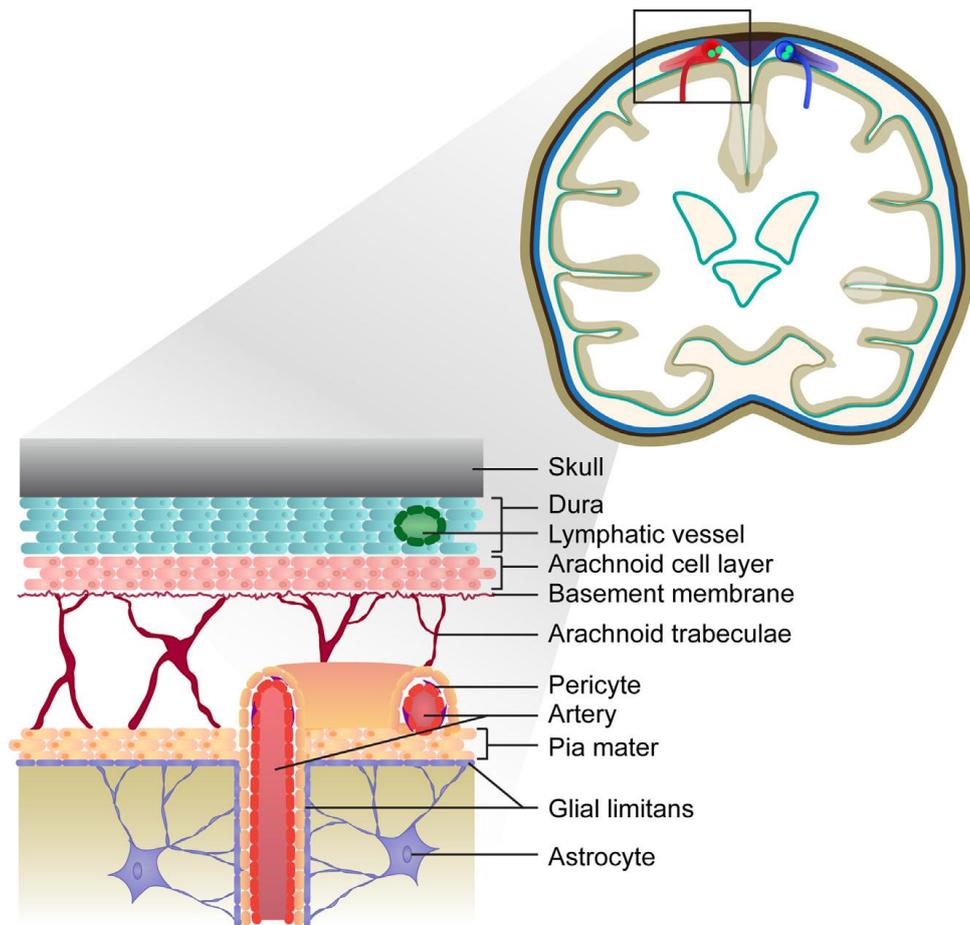


**Figura 8.** Esquema del proceso de infiltración de leucocitos a través de la barrera hemato-encefálica. Paradigma de las interacciones leucocito-celula endotelial en varios pasos en la barrera hematoencefálica y límites anatómicos entre la sangre y el parénquima cerebral.

Los leucocitos activados en la periferia se unen libremente a las células endoteliales a través de la unión de las selectinas a sus ligandos. La unión de los receptores de quimiocinas leucocitarias con las quimiocinas del lumen inicia la señalización (**activación**), lo que conduce al agrupamiento y cambio conformacional en las integrinas leucocitarias, dando lugar a una unión de alta afinidad con sus ligandos (moléculas de adhesión celular o receptores alternativos). Esta unión ocurre sobre el endotelio y media la **adhesión** de los leucocitos. Tras la adhesión, muchos leucocitos se mueven (**locomotion**) a través de la superficie endotelial hasta alcanzar uniones interendoteliales (Figura 8). Los leucocitos entonces extienden protuberancias (**protusion**) a través de la unión interendotelial, en busca de quimiocinas abluminales, que servirán como señales de guía para la extravasación. La transmigración se produce en respuesta a estas quimiocinas abluminales, y puede seguir gradientes quimiotácticos. Las células extravasantes se localizan en el espacio perivascular, entre la membrana basal endotelial y la membrana basal de la glia limitans (Figura 8). La entrada en el parénquima cerebral propio implica atravesar la glia limitans y su membrana basal asociada, y requiere la acción de las metaloproteasas de la matriz. (Man et al., 2007).

Otra vía potencial de entrada de leucocitos en el SNC es a través del plexo coroideo, en el líquido cefalorraquídeo. Esta vía de migración implica un proceso de múltiples etapas en el que los leucocitos primero cruzan los vasos del estroma del plexo coroideo, luego migran a través del estroma a la superficie epitelial de las vellosidades y atraviesan la monocapa de células epiteliales del plexo coroideo en el líquido cefalorraquídeo. Las vénulas del estroma del plexo coroideo son vasos periféricos típicos con fenestraciones y uniones gap intercelulares. Las células epiteliales del plexo coroideo poseen uniones intercelulares estrechas, formando la barrera sangre-líquido cefalorraquídeo.

Las meninges representan otro portal de ingreso y acumulación de leucocitos en el SNC inflamado. Las meninges son una serie de membranas que envuelven el cerebro y la médula espinal, sirviendo de canal para la circulación del líquido cefalorraquídeo. La membrana más externa es la duramadre, que envuelve el SNC y se une al cráneo y la columna vertebral. Las leptomeninges, que envuelven todo el SNC son la aracnoide y la pia madre y están separadas por el espacio subaracnoideo (Figura 9). Los grandes vasos sanguíneos que transectan las leptomeninges se encuentran dentro de la pia madre que está bordeada por la glia limitante. Las células de la pia madre continúan alineando las arterias intracerebrales pero poco a poco se vuelven menos densas a medida que las arterias penetran en el parénquima del SNC (Zhang et al., 1990).



**Figura 9. Representación de las meninges.**

El endotelio sanguíneo que transecta el espacio subaracnoideo (la barrera sangre-liquido cefalorraquideo) representa una vía importante de entrada de leucocitos en las meninges. En condiciones fisiológicas, el espacio subaracnoideo representa una vía para que los linfocitos de inmuno-vigilancia exploren el SNC (Engelhardt y Ransohoff, 2012). La infiltración de linfocitos en las meninges juega un papel importante en la patogénesis de la esclerosis múltiple (Pikor et al., 2016) y del principal modelo experimental de esta enfermedad, la encefalitis autoinmune experimental (Columba-Cabezas et al., 2006). Los estudios que analizan la cinética de la infiltración meníngea en encefalitis autoinmune experimental muestran una afluencia de células inmunitarias antes del inicio de la fase clínica (Walker-Caulfield et al., 2015). Además, se ha demostrado que células T específicas de mielina atraviesan la barrera hematoencefálica en el espacio subaracnoideo, mostrando el antígeno específico para obtener acceso al parénquima e iniciar la respuesta típica de la fase clínica de la enfermedad (Bartholomaeus et al., 2009). Biopsias de pacientes con esclerosis múltiple en fase

temprana mostraron que un subconjunto de pacientes presentan lesiones desmielinizantes corticales asociadas con inflamación meníngea (Lucchinetti et al., 2011). Los estudios de encefalitis autoinmune experimental, mediante análisis histológicos post mortem y con muestras de liquido cefalorraquideo muestran una acumulación de células T (Kivisakk et al., 2009; Matsusomo et al., 2003; Junker et al., 2007) y células B (Magliozzi et al., 2007; Howell et al., 2011) en el compartimiento meníngeo durante la autoinmunidad del SNC. Estudios recientes, muestran que se pueden formar agregados de tipo linfoide dentro de las meninges durante la neuroinflamación sostenida. Esto se observa en encefalitis autoinmune experimental crónica y esclerosis multiple crónica y esclerosis multiple progresiva (Corcione et al., 2004, Magliozzi et al., 2004). Distintas poblaciones de leucocitos migran diferencialmente al cerebro en sitios selectivos, dependiendo de la expresión relativa de moléculas de adhesión durante las condiciones neuroinflamatorias (Engelhardt y Ransohoff, 2012).

En esta tesis hemos analizado la infiltración de linfocitos T y B en meninges de pacientes con distintos grados de enfermedad hepática. Además hemos analizado distintos subtipos de linfocitos T, utilizando marcadores contra linfocitos Th foliculares, Th17 y linfocitos T CD4<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup>.

## 2. OBJETIVOS

La inflamación periférica contribuye a las alteraciones neurológicas en pacientes con encefalopatía hepática. En ratas con encefalopatía hepática, la neuroinflamación y la alteración de la neurotransmisión en hipocampo y cerebelo son responsables de las alteraciones cognitivas y motoras. En base a estos datos, proponemos la hipótesis de que la inflamación periférica conduciría a neuroinflamación, que alteraría la neurotransmisión, conduciendo a las alteraciones cognitivas y motoras en encefalopatía hepática. No se conoce si la inflamación periférica induce la neuroinflamación, ni los mecanismos por los que lo haría. Tampoco se sabe como la neuroinflamación altera la neurotransmisión en hipocampo y cerebelo y la función cognitiva y motora. Tampoco se ha caracterizado la neuroinflamación en cerebro de pacientes fallecidos con enfermedades hepáticas crónicas.

Los objetivos principales de esta tesis son:

- (1) analizar la contribución de la inflamación periférica a la neuroinflamación y al deterioro cognitivo y motor en ratas con encefalopatía hepática inducida por anastomosis porta-cava;
- (2) estudiar los mecanismos por los que la neuroinflamación altera la neurotransmisión en hipocampo y cerebelo;
- (3) caracterizar en muestras post-mortem de cerebelo de pacientes con distintos grados de enfermedad hepática la neuroinflamación y los cambios estructurales y analizar si existe infiltración de células del sistema inmune periférico.

Teniendo en cuenta los datos presentados en la introducción, los objetivos concretos del estudio son

A) en ratas con encefalopatía hepática debida a anastomosis porta-cava (PCS):

1. Analizar si el tratamiento periférico con anti-TNF-a reduce la inflamación periférica;
2. Analizar si el tratamiento periférico con anti-TNF-a previene la neuroinflamación en hipocampo y cerebelo;

3. Analizar los mecanismos por los que la neuroinflamación altera la neurotransmisión en hipocampo y cerebelo: papel de los cambios en la expresión en membrana de receptores y transportadores de glutamato y GABA;
  4. Analizar si el tratamiento con anti-TNF-a previene las alteraciones en la expresión en membrana de los receptores AMPA y/o NMDA en hipocampo y el deterioro de la memoria espacial;
  5. Analizar si el tratamiento con anti-TNF-a previene las alteraciones en la expresión en membrana de los transportadores de GABA GAT1 y/o GAT3 en cerebelo, los niveles del GABA extracelular y el deterioro del aprendizaje en el laberinto en Y y de la coordinación motora.
- B) En muestras post-mortem de cerebelo de pacientes con distintos grados de enfermedad hepática, los objetivos son:
1. Caracterizar la neuroinflamación en cerebelo de pacientes con distintos grados de enfermedad hepática;
  2. Caracterizar los cambios histo-estructurales y neuronales inducidos por la enfermedad hepática;
  3. Analizar si existe infiltración de linfocitos del sistema inmune periférico en cerebelo.
  4. Caracterizar que subtipos de linfocitos del sistema inmune se infiltran en el tejido cerebelar.

### **3. MATERIAL Y METODOS**

#### **3.1. Animales**

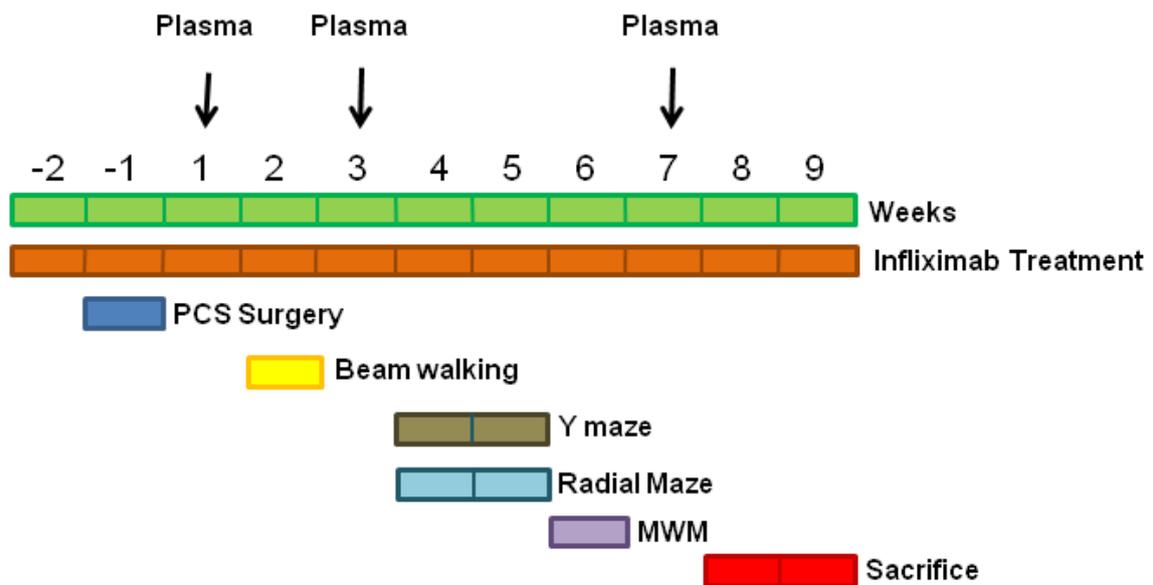
Se utilizaron ratas albinas macho de la cepa Wistar (*Rattus norvegicus*) suministradas por Charles River. Los animales se estabularon en jaulas en un ambiente controlado: ciclo de 12 horas de luz (7h-19h) y 12 h de oscuridad (19h-7h),  $23 \pm 1$  °C de temperatura y una humedad del  $55 \pm 5\%$ . Los animales se alimentaron con piensos comerciales y tuvieron libre acceso a agua y comida, excepto durante la prueba en el laberinto radial a ocho brazos y en el test de discriminación condicionada en el laberinto en Y. Todos los procedimientos con animales fueron supervisados y aprobados por nuestra institución (Centro de Investigación Príncipe Felipe) siguiendo la legislación española “Protección de los Animales Utilizados para Experimentos y Otros Propósitos Científicos” y de acuerdo con las normas de la Unión Europea.

#### **3.1.1. Anastomosis porta-cava y tratamiento con Infliximab**

Se llevó a cabo en ratas Wistar macho de 200 a 220 gramos. Se administró a cada rata 0,3 ml de morfina (20 mg/ml) por vía subcutánea 30 minutos antes de la operación para inducir la analgesia. Se anestesiaron los animales con isoflurano (5% en oxígeno para inducir la anestesia, 2% para mantenerla y 0,5 % en el momento de clampar las venas) y se procedió a la anastomosis porta-cava según la técnica descrita por Lee y Fisher (1961). Para ello, tras laparotomía, se clamparon la vena porta inferior y la vena cava durante un tiempo no superior a 20 minutos, durante el cual se realizó la operación que consiste en la unión de la vena porta con la vena cava. Se realiza una pequeña incisión en la vena cava inferior del diámetro de la vena porta inferior y se suturan ambas. A continuación se evaluó el intestino para ver si existía cianosis y si esta persistía el animal se sacrificaba. A las ratas control (SHAM) se les clampó la vena cava inferior y la porta durante 15 minutos sin practicar la anastomosis. Para comprobar el éxito de la operación de anastomosis, una vez sacrificados los animales, se examinó la atrofia del hígado. Como medida del grado de atrofia se determinó en cada rata la relación entre el peso del hígado y el peso corporal. En una rata control el peso del hígado constituye aproximadamente un 3% del peso corporal. En una rata con anastomosis porta-cava es alrededor del 2%. Los cambios en el peso corporal fueron similares a los que se describe en la literatura para este modelo animal.

Las ratas se distribuyeron aleatoriamente en cuatro grupos: sham; sham + infliximab; PCS; PCS + infliximab. El Infliximab (Remicade; Merck Sharp & Dohme, Spain) se

disolvió en agua y se administró mediante inyección intravenosa (5 mg/kg) en la vena de la cola como en (Karson et al., 2013). La primera administración de infliximab se realizó 2 días antes de la cirugía. El tratamiento semanal con infliximab se mantuvo hasta el sacrificio, excepto durante las pruebas de comportamiento, cuando se administró infliximab cada 2 semanas. Las ratas controles fueron inyectadas por vía intravenosa con solución salina. El diseño experimental se resume en la figura 10. Se realizaron un total de cuatro experimentos, utilizando ocho ratas por grupo en cada experimento. Las ratas de cada grupo y experimento se dividieron al azar en tres subgrupos para estudios de microdiálisis, expresión de membrana o perfusión para estudios de inmunohistoquímica. El número de ratas utilizado para cada parámetro se indica en la leyenda de la figura correspondiente.



**Figura 10.** Resumen del diseño experimental empleado para el experimento con infliximab.

**3.2. Determinación de amonio en sangre de ratas.** La muestra de sangre (20µl) se obtuvo por punción de la vena safena, que se encuentra en la pata de la rata. El amonio en sangre se midió inmediatamente después de la toma de sangre con el kit “Ammonia Test Kit II” distribuido por PocketChemBA system (Arkay, Inc., Kyoto, Japan).

### **3.3. Obtención de plasma**

La muestra de sangre (entre 100 y 500  $\mu$ l) se obtuvo por punción de la vena safena. Para obtener plasma se añade EDTA 7.5 mM, se centrifuga a 270 g durante 5 minutos y se recoge el sobrenadante. La centrifugación se repitió dos veces.

#### **3.3.1. Determinación de PGE2 en plasma.**

La PGE2 se mide en plasma preparado con EDTA 7.5 mM e indometacina 200 nM, para prevenir su degradación. La determinación se realiza mediante un kit ELISA comercial (Biotrak™ de Amersham, GE Healthcare). Se emplea una placa Costar de 96 pocillos recubiertos por un anticuerpo secundario hecho en cabra contra IgGs de ratón (Goat anti-mouse). Se hace una curva de calibrado con el estándar (PGE2) de 50-6400 pg/mL. Se añaden a los pocillos 50  $\mu$ L de muestra o estándar, 50  $\mu$ L del anticuerpo primario anti-PGE2 que será reconocido por el anticuerpo secundario que cubre los pocillos y PGE2 conjugada con peroxidada. Se incuba 1 hora en agitación y a temperatura ambiente. La PGE2 de la muestra y la PGE2-peroxidasa se unirán al anticuerpo primario competitivamente. Se lava con la solución de lavado del kit comercial 3 veces y se aspira el resto de líquido de cada pocillo. Se añaden 150  $\mu$ L de sustrato de la peroxidasa, TMB (3,3', 5,5' tetramethylbenzidine), que produce un compuesto de color azul y se incuba 30 minutos a temperatura ambiente. Se añaden 100  $\mu$ L de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1M para parar la reacción y se lee inmediatamente la absorbancia a 450 nm con el Multiskan Ascent.

#### **3.3.2. Determinación de factores inflamatorios en plasma.**

Las proteínas de interés presentes en plasma se analizaron por Western blot. Las muestras se diluyen (1:1) en tampón de carga 2x (Tris-HCl 0.5 M a pH 6.8, Glicerol 5%, SDS 10%, 2-Mercaptoetanol 2.5%, Bromofenol 1%) y se hierven durante 5 minutos a 100°C en un termoblock. A continuación se cargan las muestras y se separan mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 15% con SDS a intensidad de corriente de 25 mA por gel durante 1 hora. Una vez finalizada la electroforesis, se transfieren las proteínas a una membrana de PVDF (rehidratada previamente en metanol) en tampón de transferencia (Tris Base 0.025 M, Glicina 0.05 M), durante 2 horas a una intensidad de 240 mA. A continuación, se bloquea la membrana con BSA durante 45-60 minutos para evitar uniones inespecíficas y se incuban con el anticuerpo primario específico (IL17, IL-10 e IL-4 (1:1000) de Abcam (ab79056, ab9969 y

ab9811, respectivamente) e IL-6 (1:500) de BioSource (ARC0062) diluido en BSA al 5% en TBS-Tween durante toda la noche en agitación a 4°C. Se lavan las membranas 4 veces durante 10 minutos con TBS-Tween y se incuba con el anticuerpo secundario correspondiente conjugado con fosfatasa alcalina, diluida también en la solución de BSA 5%, durante 1 hora a temperatura ambiente. Las membranas se lavan 4 veces durante 10 minutos con TBS-Tween y se realiza un último lavado de 10 minutos en tampón sustrato (NaCl 100 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, Tris-HCl 100 mM a pH= 9.5). Por último, se revela mediante un método colorimétrico utilizando el sustrato de la enzima fosfatasa alcalina con una solución de revelado (NaCl 100 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, Tris-HCl 100 mM, 0.6% stock NBT, 0.35% stock BCIP, pH= 9.5).

### **3.4. Microdiálisis en cerebelo in vivo y determinación del GABA extracelular.**

Las ratas se anestesiaron con isoflurano (5% en 100% de oxígeno para inducir la anestesia y 2% para mantenerla). Se colocó la cabeza del animal en un sistema de estereotaxia para implantar en el cerebelo la guía de microdiálisis (MD-2251, Omega-ring Intracerebral Guide Cannula and Stylet, 6/pkg. BASi). Tras la anestesia 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 marcaron las coordenadas de introducción de la guía en el cerebelo: -10.5 mm anteroposterior, -1.6 mm medio lateral y 0.8 mm dorsoventral respecto al bregma (Paxinos y Watson, 2007). Se realizaron dos perforaciones (1 mm de diámetro) para insertar dos tornillos de sujeción al cráneo y un agujero (1 mm de diámetro) que permitió el acceso vertical de la guía al cráneo. La guía se sujetó al cráneo mediante los tornillos y cemento dental. Después se suturó la piel y se devolvieron las ratas individualmente a sus jaulas durante un periodo de 48-72 horas hasta el momento de realizar la microdiálisis cerebral.

Para analizar la concentración de GABA extracelular en el cerebelo, se implantó una sonda (CMA/12; 3 mm de longitud). Las sondas perfundieron a 3  $\mu$ L/min con líquido cefaloraquídeo artificial (en mmol/L): NaCl, 145; KCl, 3.0; CaCl<sub>2</sub>, 2.26; pH 7.4 con 2 mmol/L de tampón fosfato. Tras 2 horas de perfusión se inició la recogida de ocho muestras de microdiálisis de 30 minutos cada una. La concentración de GABA se midió por HPLC como se describe por Canales et al. (2003).

### **3.5. Análisis de la expresión de membrana de los transportadores de GABA GAT1 y GAT3 en cerebelo y de los receptores GluR1, GluR2, NR2A y NR1 en hipocampo.**

Las ratas se sacrificaron 8 semanas después de la cirugía de PCS y se sacó rápidamente el cerebro y se transfirió en tampón estándar (Krebs) enfriado con hielo (en mM): NaCl 121, KCl 1,87, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,17, NaHCO<sub>3</sub> 26,2, CaCl<sub>2</sub> 2,5 y glucosa 11 aireado con 95% de O<sub>2</sub> + 5% de CO<sub>2</sub> (pH 7,4). Los hipocampos y los cerebelos se diseccionaron y las secciones transversales (400 µm) se añadieron a tubos que contenían tampón Krebs helado con o sin BS3 2 mM (Pierce, Rockford, IL). Las muestras tratadas o no con BS3 se analizaron mediante Western blot como describen Boudreau y Wolf (2005). Los anticuerpos primarios utilizados fueron: anti-GAT-3 o anti-GAT-1 (Abcam, Cambridge, Reino Unido) para cerebelo y anti-GluR1 (1:500), anti-GluR2 (1:2000), y anti-NR2A (1:1000) de Millipore (Temecula, CA, USA) y anti-NR1 (1:1000) de BD Bioscience (Franklin Lakes, NJ, USA) para hipocampo. El tratamiento con BS3 agrega todas las proteínas presentes en la membrana celular dejando intactas las proteínas intracelulares. En el Western blot, en las muestras obtenidas en ausencia de BS3, la banda teñida por el anticuerpo contiene todo el antígeno (por ejemplo, GluR1) presente en la muestra, tanto en membrana como intracelular. En las muestras tratadas con BS3 las proteínas de membrana se agregan y no entran en el gel. Por lo tanto, en este caso, la banda teñida sólo contiene el antígeno intracelular (no de membrana). La expresión de membrana de los receptores se calculó como la diferencia entre la intensidad de las bandas sin BS3 (proteína total) y las con BS3 (proteína no de membrana).

### **3.6. Inmunohistoquímica**

Para los estudios de inmunohistoquímica en cerebros de ratas, estas se anestesian por inyección intraperitoneal de tiopental 1 ml/kg y se perfunden por vía intracardiaca con suero salino para eliminar la sangre. A continuación, para fijar los tejidos se perfunde con 500 ml de paraformaldehído (PFA) al 4% en tampón fosfato (PB) 0.1 M (Ph 7.4) a temperatura ambiente. Los cerebros se extraen cuidadosamente y se mantienen en PFA durante un periodo no superior a 24 horas, tras el cual se guardan en una solución de PB 0.1 M conteniendo azida sódica al 0.01%. A continuación, el cerebro entero se incluye en parafina y se cortan secciones horizontales de 5µm utilizando un micrótopo.

Para desparafinar las muestras se incuban los cortes 1 hora a 62°C. A continuación se realiza la recuperación antigénica (FLEX TRS High) debido a que durante el proceso de inclusión en parafina se forman enlaces covalentes con los antígenos que dificultan el posterior reconocimiento por el anticuerpo. Mediante un tratamiento con calor (95°C), se consiguen disociar dichos enlaces para un reconocimiento del anticuerpo primario efectivo. Para realizar la inmunohistoquímica se utiliza un equipo de tinción Autostainer Link 48 (Dako Diagnósticos). En primer lugar los cortes se lavan con un tampón y se incuban 5 min con Endogenous Enzyme Block (FLEX peroxidasa Block) para bloquear la actividad peroxidasa endógena. Los cortes se lavan con el mismo tampón y se incuban con el anticuerpo primario diluido en solución de bloqueo. Los anticuerpos primarios usados para los cortes de ratas y humanos se detallan en la Tabla 3. Para eliminar el anticuerpo primario residual que no ha quedado adherido al tejido, se vuelven a lavar los cortes con el mismo tampón. Los anticuerpos secundarios (listos para usar, DAKO) tienen unido un sistema de revelado basado en Horseradish Peroxidase (HRP) que reacciona con un sustrato colorimétrico, diaminobenzidina (DAB). Los cortes se incuban con el anticuerpo secundario durante 20 minutos. El anticuerpo secundario residual es eliminado mediante varios lavados. Para el revelado se incuban los cortes durante 10 minutos con el DAB. A continuación, los cortes son tratados con hematoxilina para contrateñir los núcleos. Finalmente, las muestras se deshidratan con concentraciones crecientes de alcoholes: 70%, 96% y 100% durante 5, 5 y 10 minutos respectivamente. Tras la deshidratación, los cortes se mantienen en xileno al menos durante 10 minutos y se montan. Una vez secas las preparaciones, se escanean con la ayuda de un Scanner Pannoramic 250 (Automatic Brightfield Scan). Las imágenes escaneadas fueron analizadas con el programa Pannoramic Viewer, que permite realizar fotos a distintos aumentos de las regiones de interés.

**Tabla 3.** Anticuerpos primarios utilizados para inmunohistoquímica e inmunofluorescencia

Anticuerpo	Casa comercial	No. Catalogo	Aplicación	Dilución	Tiempo (min)
IBA1	Wako	019-19741	IHC	1:300	30
GFAP	DAKO	IR524	IHC	Ready to use	20
TNF-a	Abcam	Ab66579	IHC	1:2000	45
IL-1b	Abcam	Ab9722	IHC	1:100	30
NF-KB p50	Abcam	Ab7971	IF	1:200	Overnight
NF-KB p65	Abcam	Ab16502	IF	1:200	Overnight
Fibrillarín	Abcam	Ab154806	IF	1:300	Overnight
GAT3	Abcam	Ab431	IHC	1:500	40
GAT1	Abcam	Ab426	IHC	1:200	40
CD4	DAKO	M7310	IHC	1:50	20
CD4	Abcam	Ab846	IF	1:100	Overnight
CD20	DAKO	IR604	IHC	Ready to use	20
PD1	Abcam	Ab52587	IHC	1:100	30
CCR6	R&D System	MAB195	IHC	1:150	30
CX <sub>3</sub> CR <sub>1</sub>	Abcam	Ab8021	IF	1:100	Overnight

### 3.6.1. Análisis de las imágenes de inmunohistoquímica

#### 3.6.1.1. Activación de la microglía (Iba1)

Para analizar la activación de microglía tanto en cortes de ratas como de humanos, se cuantificó el área y perímetro de las células marcadas con Iba1, para diferenciar la morfología de la microglía activada y en. Se hicieron un total de 15 fotos (56X) y se contaron mínimo 40 células por foto, para cada una de las regiones analizadas y por cada animal o caso. A continuación, las imágenes fueron analizadas con el programa de análisis de imagen Image J.

- **Análisis de área y perímetro.** El área y perímetro son menores en el caso de la microglía activada, con forma ameboide, pues disminuyen el tamaño y número de prolongaciones. Las imágenes se filtran antes de cuantificar para eliminar ruido de fondo o marcas de otros planos. Para ello se convierten las imágenes a 8 Bits y se aplica la función Autolocal threshold; a continuación se eligió el método de análisis que más se ajustaba a nuestra inmunohistoquímica, el método Bernsen. Luego, con el filtro de tamaño (3000 – 20000 píxeles), se eliminan las marcas correspondientes a ruido de fondo o a ramas de microglía de otro plano. Para garantizar que todas las marcas que había generado el filtro correspondían únicamente a microglía, todas las fotos fueron revisadas y eliminadas todas aquellas señales que, estando dentro del intervalo de tamaño, correspondían a

ruido de fondo u otro tipo de célula. Finalmente, los datos de área y perímetro obtenidos fueron convertidos a unidades de  $\mu\text{m}$  puesto que el programa genera los datos en unidades de pixeles. Finalmente, se obtuvo la media de los datos obtenidos para cada una de las fotos.

#### **3.6.1.2. Activación de astrocitos (GFAP)**

Para el análisis de la activación de astrocitos se cuantificó la expresión de GFAP. Se hicieron un total de 15 fotos a 56X para cada una de las regiones analizadas y por animal o caso. A continuación, las imágenes fueron analizadas con el programa de análisis de imagen Image J. Se convirtieron las imágenes a 8 Bits y se aplicó la función Autolocal threshold; se eligió como método de análisis, el método Bernsen. A continuación, se filtró por tamaño (0-infinity). Los resultados se expresaron como area total teñida por GFAP.

#### **3.6.1.3. Analisis del contenido de TNF- $\alpha$ e IL-1 $\beta$ en hipocampo y cerebelo de ratas**

Para el análisis de la expresión de TNF- $\alpha$  se hicieron un total de 6 fotos a 40X por animal y por región analizada. Se contaron entre 50 y 90 células por foto. A continuación, las imágenes fueron analizadas con el programa Image J. Se contó el número de células positivas para TNF- $\alpha$  en hipocampo (CA1 y Giro Dentado) y se sacó un porcentaje con respecto al total de células. En cerebelo, se cuantificó el contenido total en sustancia blanca. En el caso de la IL-1 $\beta$ , en el cerebelo, se hicieron entre 10 y 15 fotos a 30X por animal. A continuación, las imágenes fueron analizadas con el programa Image J. Se cuantificó el número total de células que eran positivas para IL-1 $\beta$  y los resultados se expresaron como el número de células por  $\text{mm}^2$ . En el hipocampo el análisis de IL-1 $\beta$  se realizó como el de TNF- $\alpha$ .

#### **3.6.1.4. Análisis de las subunidades p50 y p65 de NF- $\kappa$ B mediante inmunofluorescencia.**

Se cortaron secciones flotantes de hipocampo (30  $\mu\text{m}$ ) utilizando el vibratomo. Se recogieron series paralelas y se guardaron en tampón fosfato con azida sódica al 0,05%. Las secciones se lavaron en tampón de fosfato 0,1 M y se bloquearon con suero de la misma especie que el anticuerpo secundario antes de ser

incubadas durante una noche con el anticuerpo primario (NF- $\kappa$ B p65, 1: 200, NF- $\kappa$ B p50, 1: 200, Fibrillarín, 1: 300) de Abcam, diluido en tampón de bloqueo y anticuerpo fluorescente secundario (1: 400, 1 hora) de Invitrogen. Los núcleos se tiñeron con DAPI (Sigma-Aldrich) y las secciones se montaron en portaobjetos y se cubrieron. Se realizó un control negativo omitiendo los anticuerpos primarios. Las imágenes se observaron al microscopio confocal (Leica TCS-SP2-AOBS) y se registraron fotográficamente.

Las subunidades p50 y p65 pueden localizarse en los núcleos o en el citosol. Los núcleos se marcaron en azul con DAPI. Las subunidades de NF $\kappa$ B nuclear (p50 o p65) se cuantificaron como puntos verdes dentro de tinción azul (DAPI). Los puntos verdes fuera de la tinción con DAPI se cuantificó como NF $\kappa$ B citosólico. La intensidad nuclear de ambas subunidades de NF $\kappa$ B se analizó usando ImageJ (1.48v). Se seleccionaron los nucleos utilizando la función ROI manager sobre el canal azul del DAPI y sobre la selección se aplicó en el canal verde (canal p50 o p65) para medir la fluorescencia nuclear. Se midió el valor medio de la escala de gris para cada núcleo. Se contaron al menos 120 células por sección de al menos ocho secciones diferentes. Los nucleolos marcados con NF $\kappa$ B fueron contados manualmente por dos experimentadores “ciegos”. Se calculó la relación de contenido en nucleolos / células (la media de los datos obtenidos por dos experimentadores ciegos) se calculó y se expresó como porcentaje con respecto al control. Se realizó una doble inmunofluorescencia utilizando el marcador de nucleolos fibrillarina (Abcam, 1: 300) y la subunidad p50 de NF- $\kappa$ B para confirmar la traslocación nucleolar.

#### **3.6.1.5. Hibridación in situ por fluorescencia (FISH) del ARNm de TNF-a**

La hibridación in situ con fluorescencia se realizó para detectar la expresión de ARNm de TNF-a en secciones de hipocampo de 5  $\mu$ m. Los portaobjetos fueron desparafinados y rehidratados. El tejido se trató con 5  $\mu$ g/ml de proteinasa K (Ambion-Life Technologies) en agua de DEPC durante 6 min a temperatura ambiente. Se diluyó una sonda conjugada con fluoresceína de 23 nucleótidos (50  $\mu$ M, Exiqon) en solución de hibridación (50 ng /  $\mu$ l) con formamida al 30% y se desnaturalizó a 80°C durante 2 min. Se enfrió inmediatamente en hielo para evitar el re-hibridación. Las secciones se incubaron durante 16 h en una cámara de hibridación humidificada a 60°C. Al día siguiente, se realizaron 2 lavados

rigurosos con 1X SSC a 48°C durante 15 min y 1X SSC a temperatura ambiente durante 15 min. Las secciones se contrateñieron con 4', 6-diamidino-2-fenilindol (DAPI, Sigma, 5 µg / ml) y Neun (Millipore, 1: 100). Los resultados se observaron al microscopio confocal y se registraron fotográficamente.

#### **3.6.1.6. Análisis del contenido de GAT3 y GAT1 en cerebelo de ratas**

Para el análisis del contenido de GAT3 se hicieron un total de 15 fotos a 56X para cada una de las regiones analizadas y por animal. A continuación, las imágenes fueron analizadas con el programa de análisis de imagen Image J. Se convirtieron las imágenes a 8 Bits y se aplicó la función Autolocal threshold; se eligió como método de análisis, el método Bernsen y no se aplicó ningún filtro de tamaño. Los resultados se expresaron como porcentaje respecto a las ratas control.

Para cuantificar la intensidad de GAT1, las neuronas de Purkinje se contornearon manualmente utilizando la función ROI manager y se midió el valor medio de la intensidad de gris de cada célula de Purkinje. Para cada rata, se cuantificaron al menos 80-100 células.

### **3.7. Tests de aprendizaje y memoria**

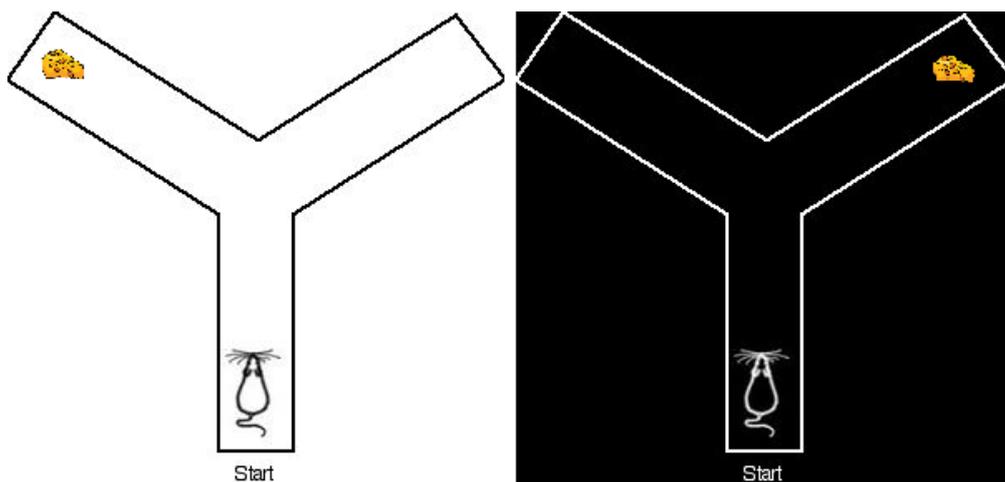
#### **3.7.1. Test de aprendizaje de una tarea de discriminación condicionada en un laberinto en Y**

Este test se realiza en un laberinto de madera de tres brazos idénticos en forma y longitud (60 cm de largo, 11.5 cm de ancho y 25 cm de altura) colocados en forma de Y (Figura 11). Uno de los brazos se elige como salida y los otros dos son los brazos de elección. El color de las paredes del laberinto puede ser blanco o negro. Dependiendo del color del laberinto se colocan los “pellets” de comida (Dutless Precision Pellets®, Rodent Purified Diet, Bio-Serv) en la parte más distal de uno u otro brazo de elección. Cuando el laberinto es negro se colocan los pellets al final de brazo izquierdo. Cuando el laberinto es blanco se colocan los pellets al final del brazo derecho. El animal tiene que aprender donde está el pellet en función del color del laberinto (Erceg et al. 2005; Murray y Ridley. 1997). La realización de este test requiere un período de familiarización del animal con el laberinto (pre-test 4 días) y una restricción de la

comida accesible (unos 8 gramos al día) durante el tiempo que dura el test y el pretest para que el refuerzo en forma de comida tenga el efecto esperado.

El día 1 de pre-test se dejó explorar a las ratas (de 2 en 2) en el mismo laberinto durante 10 minutos con la comida esparcida por todo el laberinto. Este laberinto era de color blanco. El día 2 de pre-test se pusieron las ratas de una en una en el laberinto para que exploraran pero esta vez el laberinto era de color negro y la comida estaba esparcida por todo el laberinto. El día 3 de pre-test las ratas se colocaron en el laberinto de una en una durante 5 minutos y la comida se situó en los extremos distales de los dos brazos de elección siendo el laberinto de color blanco. En el cuarto día el pre-test fue como el tercer día pero con el laberinto negro.

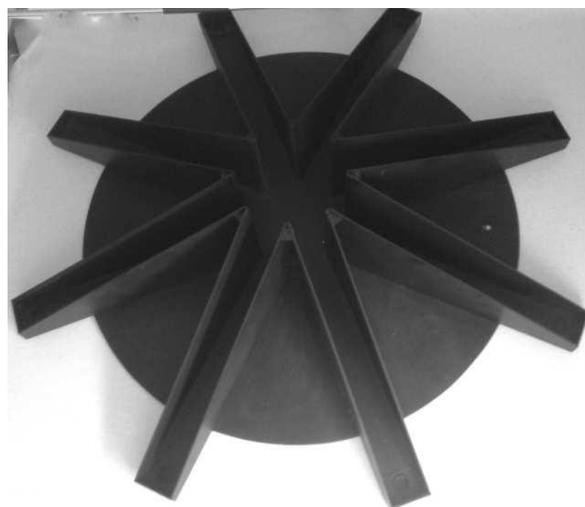
El test se repite diez veces cada día cambiando de forma aleatoria el color de las paredes, y se considera que el animal ha aprendido cuando acierta los 10 ensayos seguidos en un mismo día. Un acierto consiste en que el animal escoge el brazo izquierdo y come los pellets colocados al final del mismo, en el caso de que el laberinto sea negro. En el caso de que el laberinto sea blanco, el animal escoge el brazo derecho. Cada vez que una rata se somete al test se deja como máximo 3 minutos en el laberinto durante los cuales o bien realiza un acierto, un error o bien un no ensayo: se queda en el brazo de salida. Si a los 25 días de la realización del test la rata no ha aprendido ya no se hacen más tests considerando que el animal no es capaz de aprender la tarea.



**Figura11.** Test de aprendizaje de una tarea de discriminación condicionada en un laberinto en Y

### 3.7.2. Laberinto radial de 8 brazos

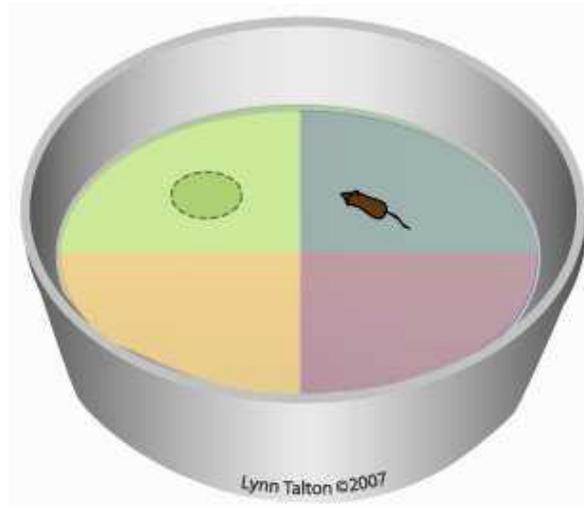
Este test evalúa el aprendizaje espacial y se realiza en un laberinto con un área central que permite el acceso a ocho brazos equidistantes y de idéntico tamaño. Los brazos tienen una longitud de 70 cm y una anchura de 10 cm y el área central tiene 30 cm de diámetro (Figura 12). El laberinto es de plexiglás negro y está a una altura de 1 m sobre el suelo. Cada brazo tiene paredes laterales con una altura superior en el extremo próximo a la zona central (30 cm) que en el extremo distal (5 cm). En el extremo distal de cada brazo, hay un comedero empotrado donde se coloca la comida de recompensa. A las ratas se les reduce la ingesta de comida cuatro días antes de realizar el pre-test y se mantienen con esa dieta restrictiva durante todo el test. En la primera sesión del pre-test se colocan dos ratas en el labirinto durante 5 minutos con comida esparcida por todo el laberinto. En la segunda sesión del pre-test se coloca sólo una rata en el laberinto durante 5 minutos con comida en todos los comederos (2 pellets). A continuación, se realiza el test durante 6 días con 5 ensayos/día. Se coloca la comida en 4 de los 8 comederos: en 2 brazos consecutivos (ejemplo: 1 y 2) y en otros 2 brazos no consecutivos (ejemplo: 4 y 6). Los brazos con/sin comida son diferentes para cada rata. Se espera que la rata se coma todos los pellets pero si no se mueve esperamos como máximo 3 minutos. Si una rata durante 2 días consecutivos no se mueve la eliminamos del estudio. Se analizan (i) los errores de referencia espacial, que se definen como el número de veces que entra el animal en un brazo sin comida; (ii) los errores de memoria de trabajo, el número de veces que entra en un brazo que ya ha visitado durante ese mismo ensayo y (iii) el número de aciertos en cada ensayo, que corresponde al número de entradas en brazos con comida.



**Figura 12.** Laberinto radial de 8 brazos

### **3.7.3. Laberinto acuático de Morris**

Este test mide aprendizaje y memoria espacial. Consiste en poner las ratas individualmente dentro de una piscina (Figura 13) que contiene una plataforma de escape escondida por debajo del agua de forma que la rata no la visualiza. La plataforma, que es de un material plástico y transparente, tiene que quedar sumergida pero sólo a 1-2 cm de profundidad de la superficie. El agua se tiñe con una pintura blanca inocua para que el agua quede turbia y la plataforma no sea visible para las ratas. La rata no quiere permanecer en el agua y busca la plataforma. Mediante pistas visuales como colores o figuras situadas alrededor de la piscina, el animal se ubica en el espacio para encontrar la plataforma. Utilizamos una piscina circular de 190 cm de diámetro y 80 cm de altura. El test consta de 3 fases: pre-test, aprendizaje y test. En el pre-test, se acostumbra a las ratas a nadar en el agua sin la plataforma. Se deja que naden 90 segundos y, a continuación, se sacan de la piscina y se secan. Al día siguiente (día 1 de aprendizaje), se coloca la plataforma en una parte cualquiera de la piscina y ésta permanece en ese cuadrante de la piscina cada día de aprendizaje. Cada día de aprendizaje (días 1, 2 y 3), se realizan cinco ensayos en los que cada rata tiene que nadar y encontrar la plataforma. El tiempo máximo de permanencia en el agua es de 120 segundos. Si pasado este tiempo la rata no ha encontrado la plataforma, la colocamos encima de la plataforma y la dejamos 1 minuto. Cada vez que se realiza un ensayo hay que colocar la rata en el agua en un punto diferente de la piscina, por ejemplo en uno de los 4 puntos cardinales imaginarios (N, S, E y O) de la piscina. Si llegan a la plataforma antes de los dos minutos se anotan los segundos que han tardado en encontrarla y subirse. El cuarto día se realiza el test final (Memoria espacial): se quita la plataforma de la piscina y se coloca cada rata en la piscina, en un punto cualquiera de la piscina (el mismo para todas las ratas). Se deja la rata en la piscina durante 90 segundos y se cuentan los segundos que la rata nada en el cuadrante donde los días anteriores estaba colocada la plataforma.



**Figura 13.** Laberinto acuático de Morris

#### **3.7.4. Beam walking**

Este test mide coordinación motora y equilibrio. Consiste en hacer pasar a la rata por un listón de 1 metro de longitud y 20 mm de anchura, situado a aproximadamente 1 metro del suelo, hasta alcanzar en el final del recorrido una caja cerrada y oscura, que proporciona un ambiente agradable para los roedores (Figura 14). Antes de realizar el test se entrenan a las ratas haciéndolas pasar tres veces por el palo dejándolas dentro de la caja final (unos 2 minutos) para que se sienta protegida. Hay algunas ratas que necesitan más ensayos y otras que tienen mucho miedo y que no pasan el listón (éstas ratas se eliminan del estudio). En este test se mide el tiempo en segundos que el animal tarda en llegar a la caja y el número de resbalones que el animal tiene durante el recorrido por el palo. Un animal tiene incoordinación motora cuando tiene un mayor número de resbalones o cuando tarda mucho tiempo en pasar el listón.



**Figura 14.** Beam walking test

### **3.8. Recolección de muestras y procesamiento de tejido cerebral de humanos**

Las muestras post-mortem de cerebros humanos se obtuvieron de:

- Instituto Medicina Legal y Ciencias Forenses (Valencia)
- Biobanco Hospital Universitario Fundación Alcorcon
- Biobanco A Coruña
- Biobanc Hospital Clinic IDIBAPS

Se recolectaron secciones de cerebelo e hígado humanos de personas recientemente fallecidas con enfermedad hepática crónica y controles (personas sin enfermedad hepática ni neurodegenerativa). Para cada caso, obtuvimos autorización para recoger el tejido para la investigación. Las características de los pacientes se detallan en la Tabla 4. Las secciones extraídas de cerebelo e hígado se fijaron en formol al 10% durante 96 h a 4°C. A continuación, las muestras se colocaron dentro de cassettes histológicos y se procesaron para la inclusión permanente en parafina en un procesador de tejidos Leica ASP 300 (Leica Microsystems).

**Tabla 4.** Resumen de los individuos analizados y de sus datos sobre tipo de enfermedad hepática, sexo, edad, causa de la muerte, intervalo post-mortem y procedencia de la muestra.

CASE	GRADE	SEX	AGE	CAUSE OF DEATH	PMD (h)	BIOBANC
CASE 16	Control	M	79	N.A.	2	FHU
CASE 18	Control	M	76	N.A.	5	FHU
CASE 20	Control	M	62	Mesenteric ischemia	14	FHU
CASE 21	Control	M	72	N.A.	18	FHU
CASE 22	Control	M	60	Bronchoaspiration	-	FHU
CASE 23	Control	M	67	N.A.	-	FHU
CASE 1	SH1	M	46	Ischemic cardiopathy	-	IML
CASE 2	SH1	M	49	Ischemic cardiopathy	14	IML
CASE 7	SH1	M	36	Asphyxia from hanging	14	IML
CASE69	SH1	M	46	Sudden cardiac death	48	IML
CASE70	SH1	M	50	Sudden cardiac death	36	IML
CASE71	SH1	M	53	Sudden cardiac death	36	IML
CASE72	SH1	F	47	Sudden cardiac death	-	IML
CASE73	SH1	M	45	Sudden cardiac death	-	IML
CASE 78	SH1	M	51	Sudden cardiac death	40	IML
CASE 3	SH2	F	70	Lower gastrointestinal bleeding	-	IML
CASE 24	SH2	M	40	N.A.	-	IML
CASE 68	SH2	M	55	Sudden cardiac death	18	IML
CASE 74	SH2	M	48	Sudden cardiac death	-	IML
CASE 75	SH2	M	30	Sudden cardiac death	18	IML
CASE 76	SH2	M	45	Sudden cardiac death	-	IML
CASE 5	SH3	M	49	Severe ischemic cardiopathy	-	IML
CASE 9	SH3	M	44	Alcohol-drug adverse reaction	36	IML
CASE 10	SH3	M	49	N.A.	26	IML
CASE 77	SH3	M	47	Sudden cardiac death	-	IML
CASE 4	Cirrhosis	M	53	Gastrointestinal bleeding	-	IML
CASE 8	Cirrhosis	M	69	Gastrointestinal bleeding	17	IML
CASE 15A51	Cirrhosis	-	-	Intra-abdominal sepsis	-	Biobanco A Coruña
CASE 58	Cirrhosis	M	60	Acute myocardial infarction, hepatic failure and variceal upper gastrointestinal bleeding	5	IDIBAPS
CASE 54	Cirrhosis+HE	F	78	Cardiorespiratory arrest	9,5	IDIBAPS
CASE 55	Cirrhosis+HE	M	76	Acute parotitis	3,5	IDIBAPS
CASE 56	Cirrhosis+HE	M	58	Acute respiratory failure	5	IDIBAPS
CASE 57	Cirrhosis+HE	F	70	Sudden cardiac death and Hepatic Encephalopathy	3,5	IDIBAPS
CASE 13A37	Cirrhosis+HE	M	54	Metabolic coma	-	Biobanco A Coruña

**3.9. Histología del hígado.** El diagnóstico histológico se estableció con tinciones de hematoxilina-eosina y tricromo de Masson de secciones de hígado fijadas en formol e incluidas en parafina. Los pacientes se agruparon en cuatro categorías: control, esteatohepatitis, cirrosis y encefalopatía hepática. El grupo de esteatohepatitis se subdividió en tres subgrupos (SH1, SH2 y SH3) dependiendo de la gravedad. La esteatohepatitis fue evaluada por expertos hepatopatólogos usando una versión más simple del sistema de puntuación propuesta por el Instituto Nacional de Diabetes y Enfermedades Digestivas y del Riñón NASH Clinical (Kleiner et al., 2005). Las características histológicas se agruparon en cuatro grandes categorías: esteatosis,

inflamación, fibrosis y lesión hepatocelular. La puntuación se definió como la suma no ponderada de las puntuaciones para el grado de esteatosis (0-3), la localización de esteatosis (0-3), la inflamación lobular (0-3), el estadio de fibrosis (0-3) y la presencia de necrosis (0- 1); Los pacientes que puntúan <3 o menos de 5% de esteatosis se clasificaron como controles, entre 3-6 se clasificaron como SH1, entre 7-9 se clasificaron como SH2 y los pacientes con una puntuación >9 se clasificaron como SH3.

### **3.10. Inmunohistoquímica**

La inmunohistoquímica del tejido cerebral humano se ha llevado a cabo como se describe en el apartado 3.6. Los anticuerpos primarios utilizados fueron Iba1 y GFAP para el marcaje de microglía y astrocitos, respectivamente; CD4, CD20, PD1 y CCR6 para marcar linfocitos T, B, Tfh y Th17 respectivamente. Las diluciones usadas y el tiempo de incubación de cada anticuerpo se detallan en la Tabla 3.

#### **3.10.1. Análisis de las imágenes de inmunohistoquímica**

El análisis de activación de microglía y astrocitos en cerebelo de pacientes con diferentes grados de enfermedad hepáticas se ha realizado como se describe en los puntos 3.6.1 y 3.6.2.

#### **3.10.2. Análisis de la densidad neuronal en cortes de cerebelos de pacientes con distintos grados de enfermedad hepática**

Para la cuantificación de la densidad neuronal en la capa granular y capa de Purkinje de cerebelo se utilizaron las secciones teñidas con H&E. La densidad de células granulares se cuantificó automáticamente utilizando las funciones Auto Local Threshold y Analyze particles de ImageJ. Para seleccionar células granulares, se usó el método Intermode y no se aplicó ningún filtro de tamaño. Se cuantificaron al menos 10 campos (56x) para cada caso. Los resultados se expresaron como porcentaje respecto a los casos de control.

Para el análisis de la densidad de células de Purkinje se cuantificaron al menos 10 campos (7x) para cada caso. Las células de Purkinje se contaron manualmente usando ImageJ y el resultado se expresó como porcentaje respecto a los casos controles.

### **3.10.3. Analisis de linfocitos en espacio meningeo cerebelar de pacientes con distintos grados de enfermedad hepatica**

El análisis de las células CD4, Tfh, Th17 y CD4<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> se realizó en el espacio meníngeo del cerebelo utilizando anticuerpos contra CD4, CCR6, PD1 y una doble inmunofluorescencia CD4/CX<sub>3</sub>CR<sub>1</sub>, respectivamente; las células positivas se contaron manualmente y la longitud de las meninges se midió usando ImageJ. Para cada caso se cuantificaron 10 campos (20x) y los resultados se expresaron como células/mm. El conteo de las CD4<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> se realizó contando el número de células doble positivas a CX<sub>3</sub>CR<sub>1</sub> y CD4. Los resultados se expresaron como células/mm de longitud.

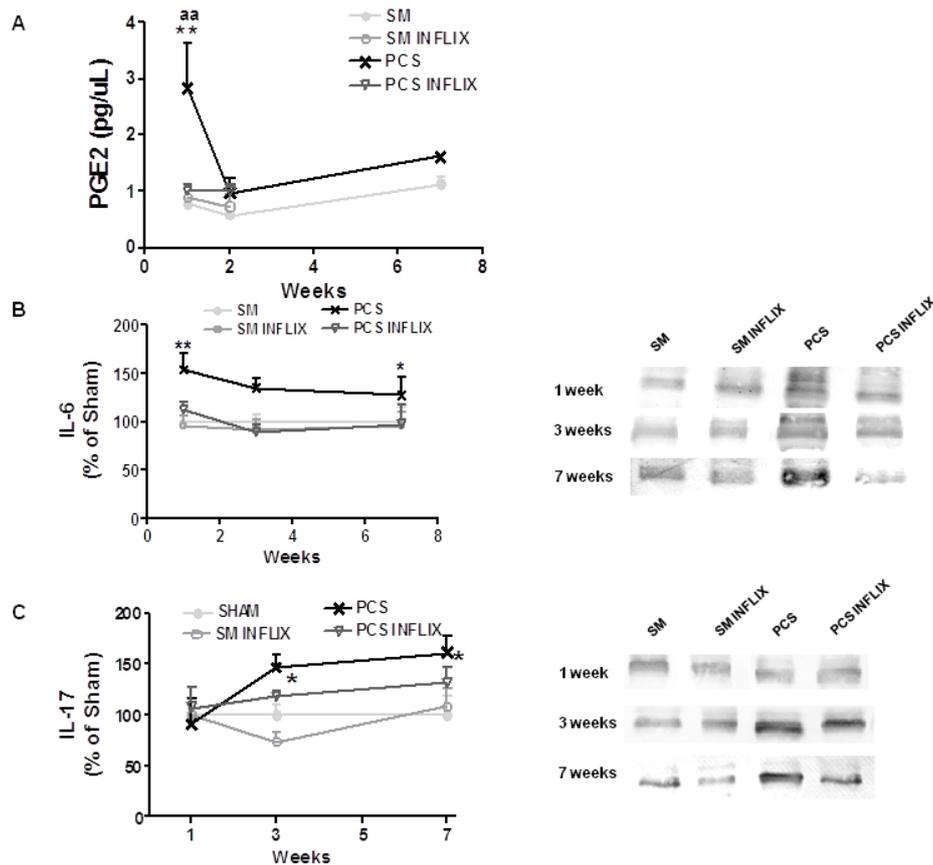
### **3.11. Análisis estadístico**

El análisis estadístico se realizó con el programa Prism 5 (GraphPad Software, Inc.). Se realizó un análisis de la varianza de una o dos vías (ANOVA) seguido de un test post-hoc Turkey. Se consideró como significativo un valor  $p < 0.05$ . Los resultados se expresan como media  $\pm$  SEM (Error estándar de las medias) del número de animales indicados en cada caso.

## 4. RESULTADOS

### 4.1.El tratamiento con infliximab reduce la inflamación periférica pero no la hiperammonemia en ratas PCS

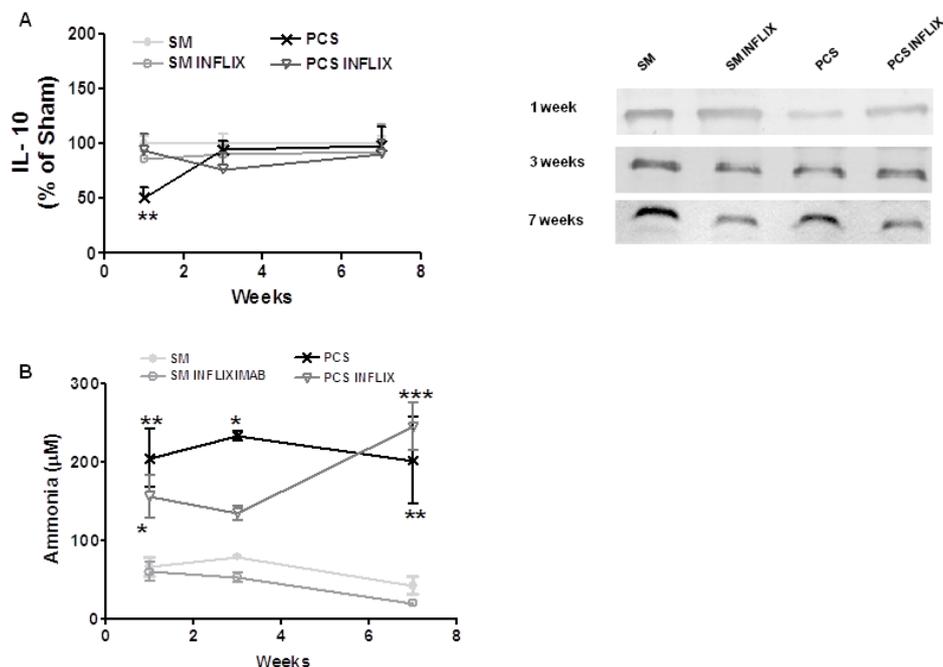
Las ratas PCS muestran inflamación periférica, con niveles plasmáticos aumentados de citocinas pro-inflamatorias IL-6, IL-17 y PGE-2 (Figura 15) y niveles reducidos de citocina anti-inflamatoria IL-10 (Figura 16). Las ratas PCS muestran inflamación periférica con un rápido aumento de los niveles de prostaglandina E2 (PGE2) que alcanzan  $369 \pm 98\%$  ( $p < 0,01$ ) respecto a las control una semana después de la cirugía (Figura 15A). El tratamiento con infliximab previene el aumento de PGE2, manteniéndolo en  $131 \pm 13\%$  de las control. La PGE2 en ratas PCS volvió a niveles normales ( $150 \pm 25\%$  de las control) 2 semanas después de la cirugía, permaneciendo a este nivel a las 7 semanas ( $142 \pm 11\%$  de las control) (Figura 15A).



**Figura 15.** Las ratas PCS muestran inflamación periférica con un aumento de los niveles de PGE2 (A) y citocinas proinflamatorias IL-6 (B) e IL-17 (C) que se revierten con infliximab. Se muestran imágenes representativas de los western blots correspondientes. Los valores son la media  $\pm$  SEM de 6 ratas por cada grupo por PGE2 y 8-14 ratas por cada grupo por la IL-6 y IL-17. Los asteriscos indican diferencia significativa respecto al grupo control \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  y “a” respecto a las ratas PCS “aa”  $p < 0.01$ .

La IL-6 pro-inflamatoria en plasma de ratas PCS aumentó al  $147 \pm 12\%$  ( $p < 0,01$ ),  $123 \pm 7\%$  y  $135 \pm 6\%$  ( $p < 0,05$ ) de los controles a 1, 3 y 7 semanas, respectivamente. El tratamiento con infliximab mantiene la IL-6 en valores normales en todo momento, alcanzando  $113 \pm 10$ ,  $89 \pm 7$  y  $109 \pm 14\%$  de las control a las 1, 3 y 7 semanas, respectivamente (Figura 15B). La IL-17 pro-inflamatoria está aumentada en plasma de las ratas PCS. Sus valores son de  $146 \pm 12$  y  $162 \pm 16\%$  ( $p < 0.05$ ) de las control a 3 y 7 semanas, respectivamente (Figura 15C). El tratamiento con infliximab mantiene la IL-17 en valores inferiores, alcanzando  $118 \pm 6$  y  $132 \pm 15\%$  de las control a las 3 y 7 semanas, respectivamente, resultando no estadísticamente diferente de las ratas control (Figura 15C).

La inflamación periférica en ratas PCS se refleja también en la IL-10 anti-inflamatoria, que disminuye a  $56 \pm 9$  y  $74 \pm 11\%$  ( $p = 0.02$ ) de las control a 1 y 3 semanas, respectivamente. A 7 semanas la IL-10 vuelve a sus niveles normales ( $99 \pm 13\%$ ) en las ratas PCS (Figura 16A). El infliximab previene la disminución de IL-10 en ratas PCS, especialmente a 1 semana. IL-10 se mantuvo a  $80 \pm 12$  y  $77 \pm 15\%$  de los controles a 1 y 3 semanas, respectivamente. El tratamiento con infliximab, por lo tanto, reduce la inflamación periférica en ratas PCS.

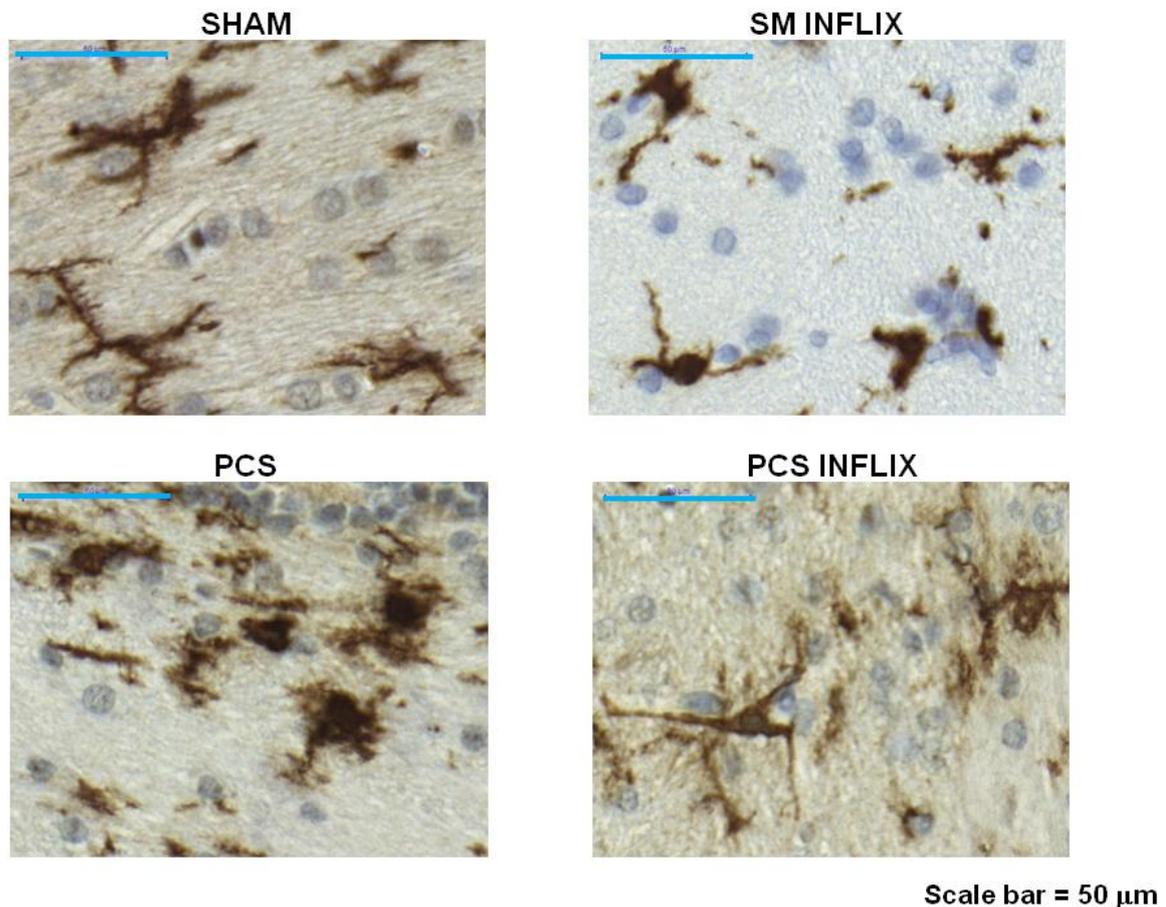


**Figura 16.** Las ratas PCS muestran hiperamonemia (B) y una disminución de la IL-10 anti-inflamatoria (A) que se revierte con infliximab. El tratamiento con anti TNF-a no afecta a los niveles de amonio en sangre de las ratas PCS. Se muestran imágenes representativas del western blot de la IL-10. Los valores son la media  $\pm$  SEM de 8-14 ratas por cada grupo. Los asteriscos indican diferencia significativa respecto al grupo control \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ .

Las ratas PCS muestran además, niveles aumentados de amonio ( $p < 0,0001$ ), que oscilan entre 200 y 240  $\mu\text{M}$  a 1, 3 y 7 semanas, mientras que en las ratas control el amonio oscila entre 40 y 80  $\mu\text{M}$  (Figura 16B). El tratamiento con infliximab no reduce significativamente los niveles de amonio: en las ratas PCS tratadas con infliximab los niveles de amonio oscilaron entre 180 y 245  $\mu\text{M}$  a las 1, 3 y 7 semanas (Figura 16B).

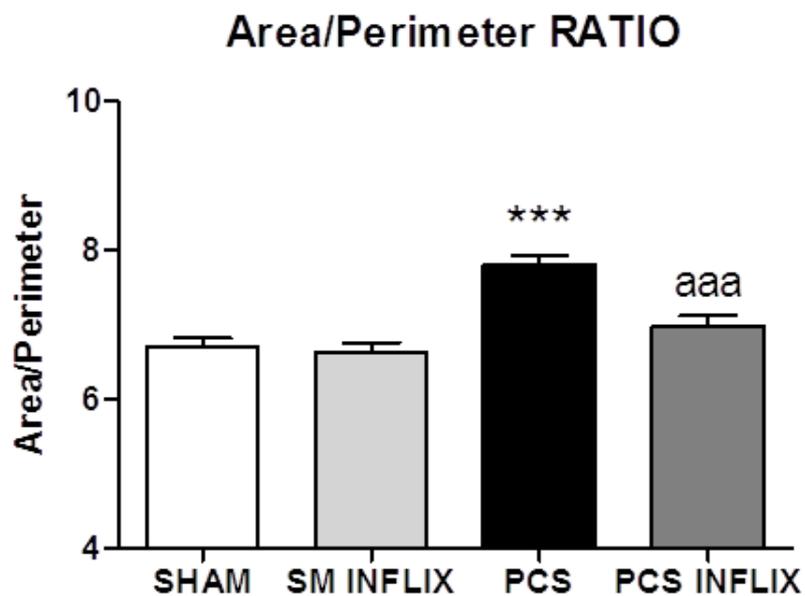
#### 4.2. Las ratas PCS muestran neuroinflamación en cerebelo e hipocampo que se reduce con infliximab

Las ratas PCS muestran activación de la microglía en la sustancia blanca del cerebelo, tal como reveló la morfología de la microglía teñida por inmunohistoquímica con anti-Iba-1 (Figura 17).



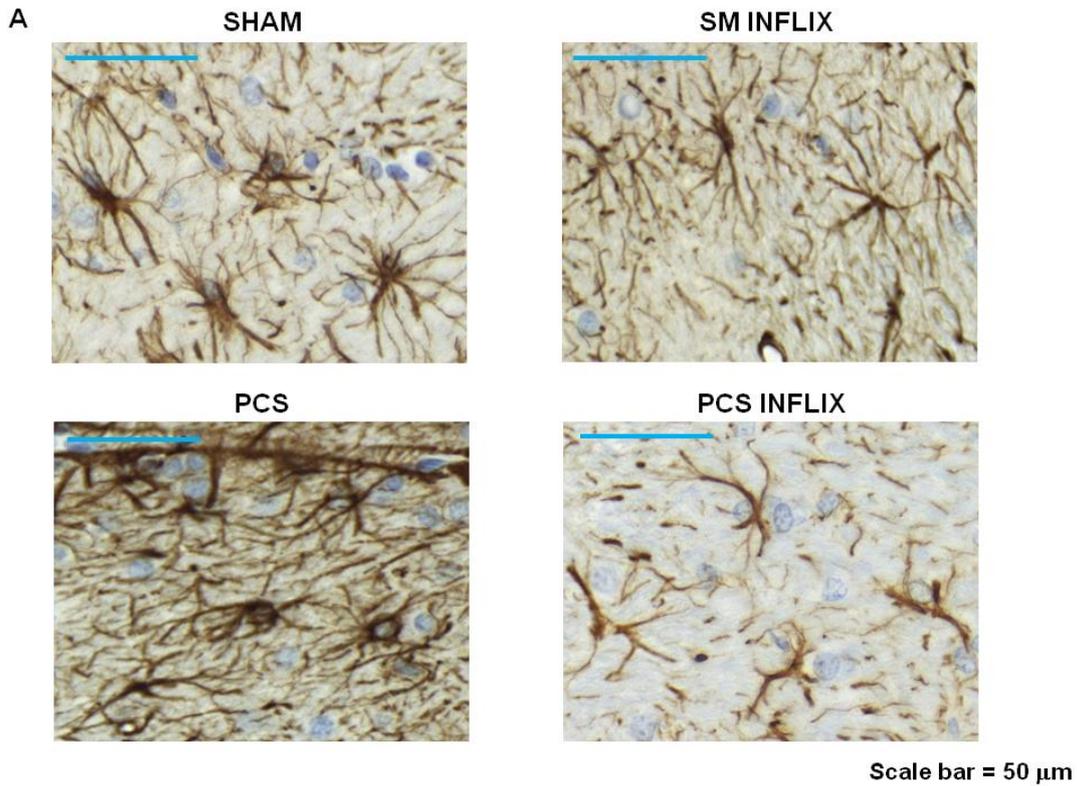
**Figura 17.** Imágenes representativas (x56) que muestran microglía con morfología activada en sustancia blanca de cerebelo de las ratas PCS. El tratamiento con infliximab restaura la morfología de microglía en reposo (no activada).

El ratio área/perímetro de la microglía, una medida del grado de activación, aumentó ( $p < 0,001$ ) en ratas PCS a  $7,8 \pm 0,1$  en comparación con las ratas control ( $6,7 \pm 0,1$ ) (Figura 18). En las ratas PCS tratadas con infliximab, la activación microglial se reduce fuertemente y su relación área/perímetro de microglía fue de  $7,0 \pm 0,1$ , significativamente menor ( $p < 0,001$ ) que en las ratas PCS y no diferente de las controles. No se encontró activación de microglía en la capa molecular. La proporción área/perímetro de la microglía fue incluso ligeramente menor ( $p < 0,05$ ) en las ratas PCS ( $5,5 \pm 0,1$ ) que en las ratas control ( $6,0 \pm 0,1$ ). En ratas PCS tratadas con infliximab, la relación área/perímetro de la microglía fue de  $5,6 \pm 0,1$ , no diferente de las ratas control o PCS (no se muestra).



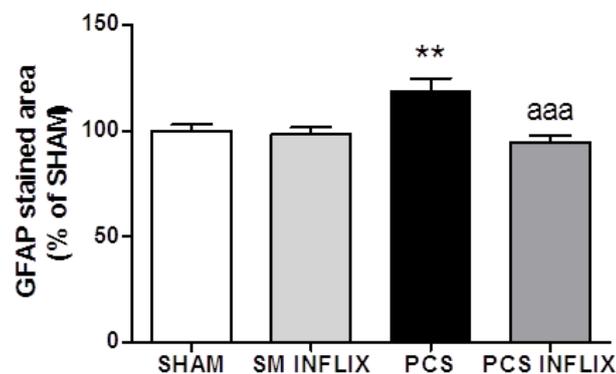
**Figura 18.** Las ratas PCS muestran activación de microglía en sustancia blanca del cerebelo, que se revierte por el tratamiento con infliximab. Los cambios morfológicos asociados a la activación de la microglía se reflejan en el ratio área/perímetro, significativamente mayor en ratas PCS. El tratamiento con infliximab normaliza el ratio. Los valores son la media  $\pm$  SEM de 4 ratas por cada grupo. Los asteriscos indican diferencia significativa respecto al grupo control \*\*\* $p < 0,001$  y “a” respecto a las ratas PCS “aaa”  $p < 0,001$ .

Las ratas PCS también muestran activación astrocitos fibrosos en la sustancia blanca del cerebelo, como se muestra claramente en la Figura 19 por su morfología cuando se tiñe con GFAP.



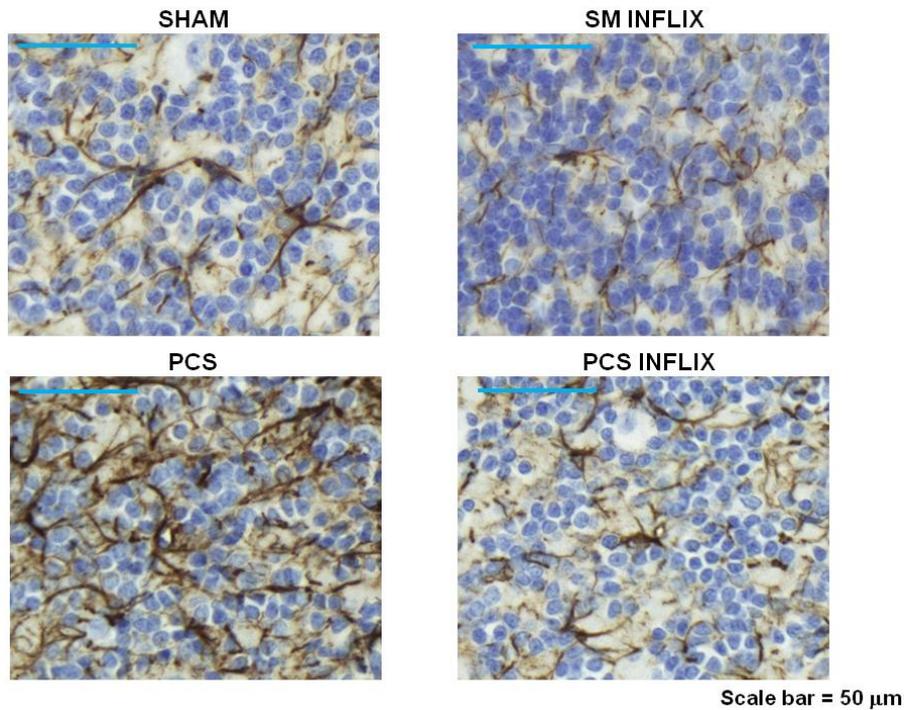
**Figura 19.** Las ratas PCS muestran activación de astrocitos en sustancia blanca del cerebelo, que se normaliza por el tratamiento con infliximab. Imágenes representativas (x56) que muestran activación de astrocitos en sustancia blanca de cerebelo de las ratas PCS.

El contenido de GFAP en los astrocitos (calculado como área teñida por GFAP) en la sustancia blanca del cerebelo de ratas PCS aumentó al  $119 \pm 6\%$  de los controles ( $p < 0,01$ ) (Figura 20). El tratamiento con infliximab normalizó la activación y morfología de astrocitos en ratas PCS (Figura 19) y la cantidad de GFAP ( $95 \pm 3\%$  de las control) (Figura 20).



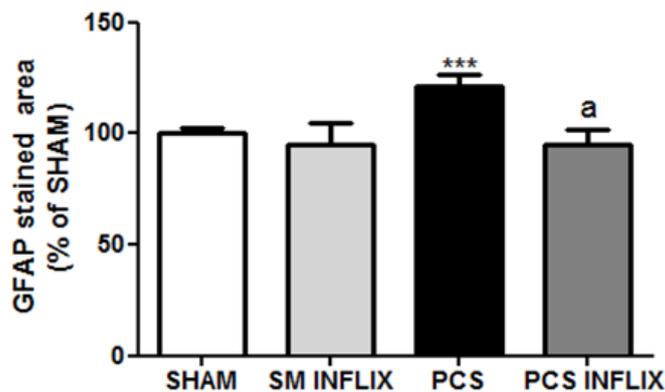
**Figura 20.** Las ratas PCS muestran activación de astrocitos en sustancia blanca del cerebelo, que se refleja en un aumento del área teñida por GFAP. El tratamiento con infliximab normaliza el contenido de GFAP. Los valores son la media  $\pm$  SEM de 4 ratas por cada grupo. Los asteriscos indican diferencia significativa respecto al grupo control  $**p < 0.01$  y “a” respecto a las ratas PCS “aaa”  $p < 0.001$ .

Se encontró un efecto similar en la capa granular, con prevalencia de astrocitos con morfología activada en ratas PCS (Figura 21).



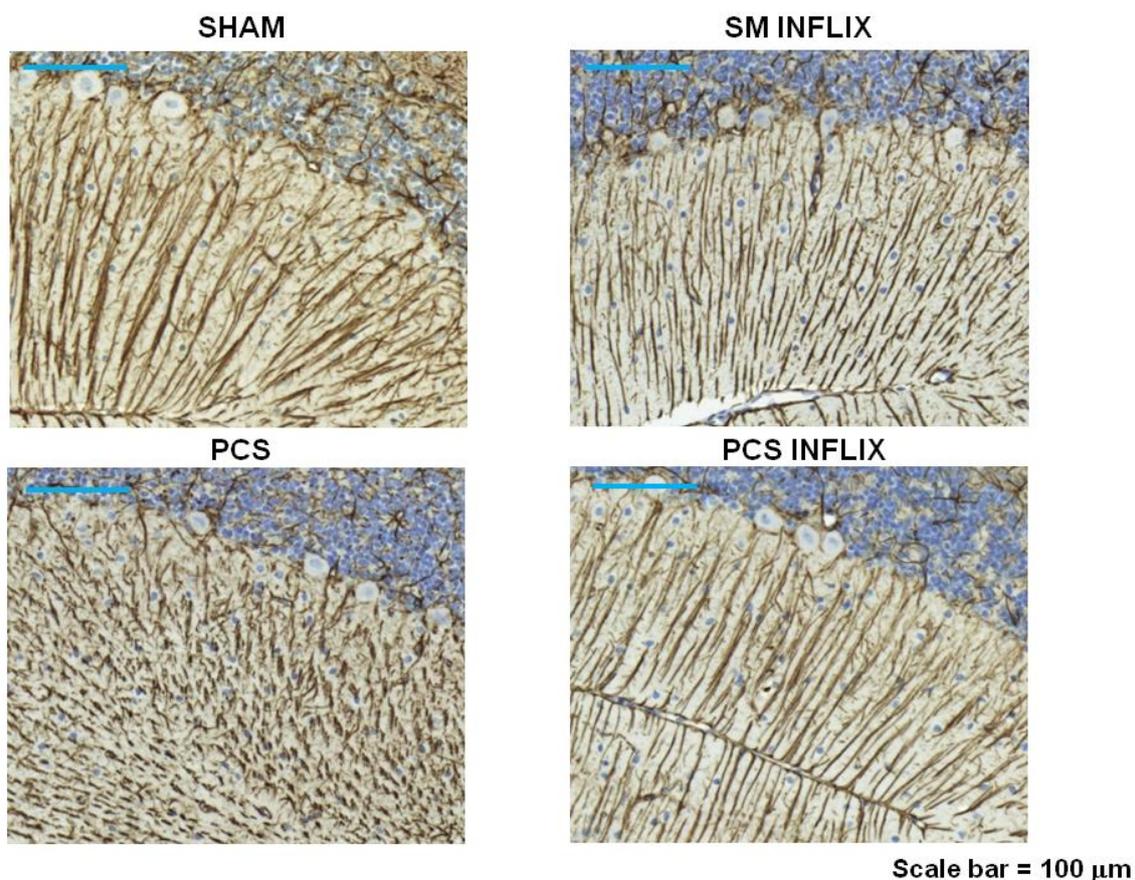
**Figura 21.** Las ratas PCS muestran activación de astrocitos en capa granular del cerebelo, que se revierte por el tratamiento con infliximab. Imágenes representativas (x56) de astrocitos activados en la capa granular de cerebelo de ratas PCS.

El contenido de GFAP en la capa granular de cerebelo de ratas PCS aumentó al  $121 \pm 9\%$  de los controles ( $p < 0,001$ ). El tratamiento con infliximab normalizó la cantidad de GFAP en ratas PCS al  $95 \pm 10\%$  de las control (Figura 22).



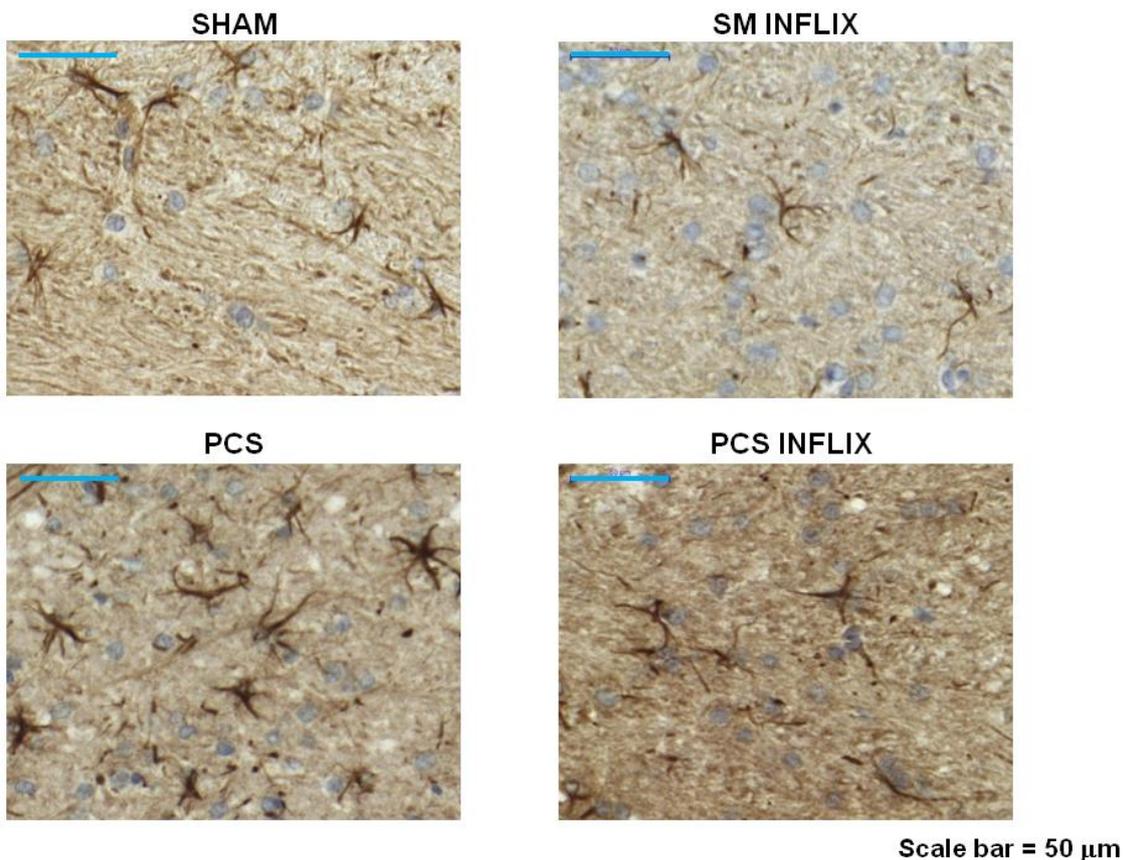
**Figura 22.** El contenido de GFAP en capa granular de cerebelo está aumentado en las ratas PCS. El tratamiento con infliximab lo normaliza. Los valores son la media  $\pm$  SEM de 4 ratas por cada grupo. Los asteriscos indican diferencia significativa respecto al grupo control \*\*\* $p < 0.001$  y “a” respecto a las ratas PCS “a”  $p < 0.05$ .

También se analizaron los efectos sobre la glia de Bergman, un subtipo de astrocitos cerebelosos que residen junto a las neuronas de Purkinje. Cuando se tiñen con GFAP, las fibras gliales de Bergmann presentan una morfología desorganizada e hipertrofiada en ratas PCS en comparación con ratas control, que muestran una morfología intacta. En ratas PCS tratadas con infliximab, las fibras de la glia de Bergmann mantienen su morfología normal (figura 23).



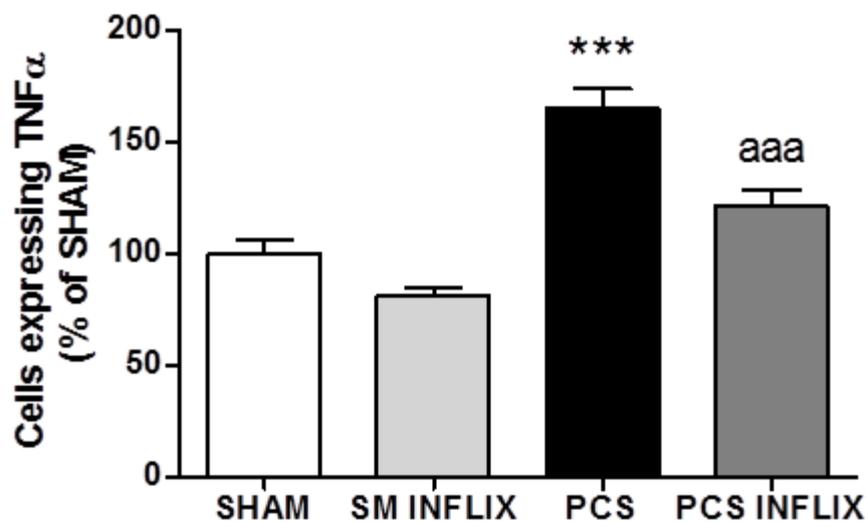
**Figura 23.** Las ratas PCS muestran degeneración de las fibras radiales de la glía de Bergaman en la capa molecular del cerebelo. El tratamiento con infliximab restaura su morfología normal.

Las ratas PCS también mostraron niveles aumentados de los marcadores proinflamatorios  $\text{TNF-}\alpha$  e  $\text{IL-1}\beta$  en el cerebelo. Para  $\text{TNF-}\alpha$ , esto se puede ver claramente en la inmunohistoquímica mostrada en la Figura 24. La cuantificación de la inmunohistoquímica muestra que en cerebelo de ratas PCS, el número de células que expresan  $\text{TNF-}\alpha$  aumenta ( $p < 0,001$ ) hasta el  $165 \pm 9\%$  de las ratas control. El tratamiento con infliximab normaliza el número de células que expresan  $\text{TNF-}\alpha$  ( $120 \pm 9\%$  de las control) en ratas PCS (Figura 25).



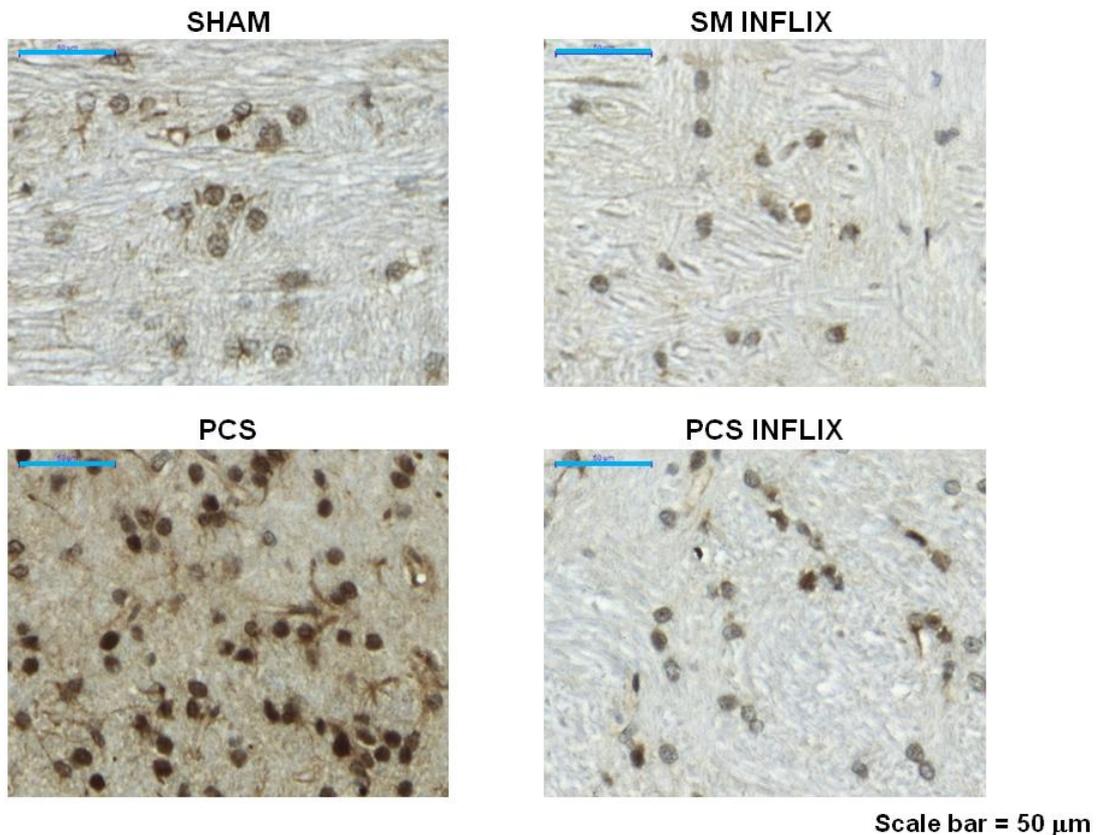
Scale bar = 50  $\mu$ m

**Figura 24.** Las ratas PCS muestran un aumento del contenido de TNF- $\alpha$  en sustancia blanca del cerebelo, que se revierte por el tratamiento con infliximab. Imágenes representativas (x40) de TNF- $\alpha$  en sustancia blanca de cerebelo.



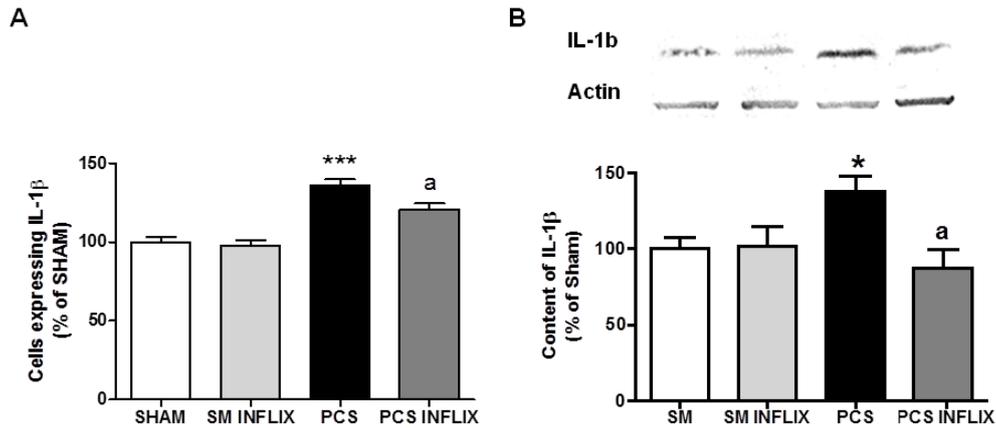
**Figura 25.** En las ratas PCS aumenta el número de células que expresan TNF- $\alpha$  en sustancia blanca de cerebelo. El tratamiento con infliximab previene este aumento. Los valores son la media  $\pm$  SEM de 4 ratas por cada grupo. Los asteriscos indican diferencia significativa respecto al grupo control \*\*\* $p < 0.001$  y “a” respecto a las ratas PCS “aaa”  $p < 0.001$ .

Lo mismo ocurre con IL-1 $\beta$  como se muestra en la inmunohistoquímica de la Figura 26. El número de células que expresan IL-1 $\beta$  en el cerebelo aumenta en ratas PCS al  $136 \pm 4\%$  de las control ( $p < 0,001$ ).



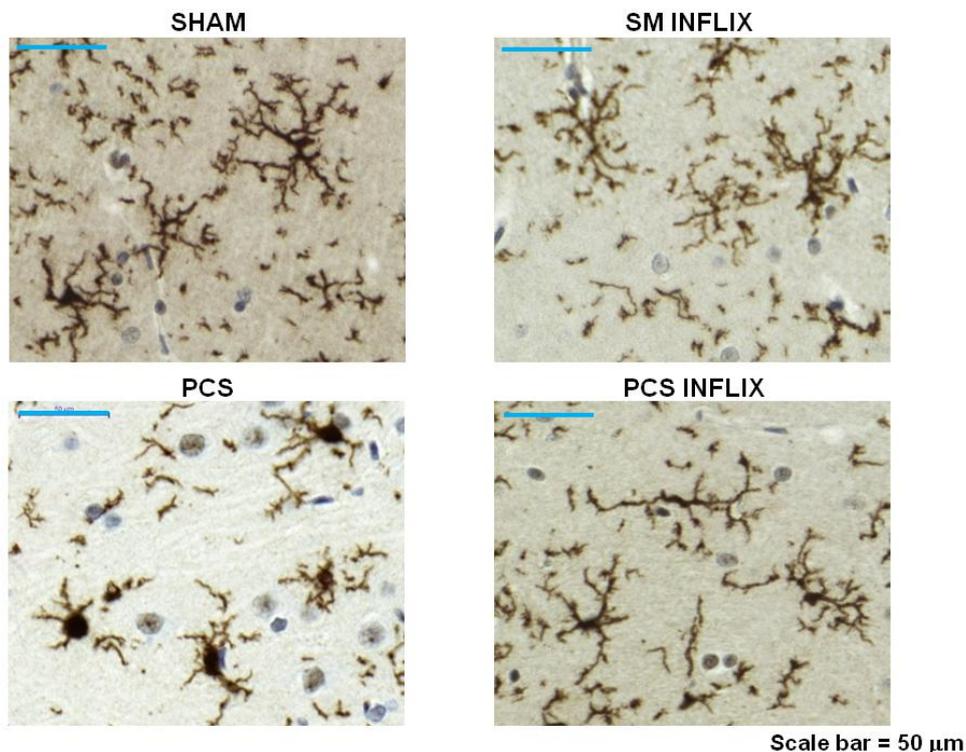
**Figura 26.** Imágenes representativas ( $\times 40$ ; B) de IL-1 $\beta$  en sustancia blanca de cerebelo. Se observa un aumento del número de células que expresan IL-1 $\beta$  en ratas PCS. El tratamiento con infliximab previene el aumento.

El tratamiento con infliximab normaliza el número de células que expresan IL-1 $\beta$  ( $119 \pm 4\%$  de las control) en ratas PCS (Figura 27A). Para confirmar este dato, el contenido de IL-1 $\beta$  también se analizó por western blot. El contenido de IL-1 $\beta$  en cerebelo está aumentado en ratas PCS al  $138 \pm 10\%$  de las control ( $P < 0,05$ ) y se normalizó al  $87 \pm 13\%$  de las control por el tratamiento con infliximab (Figura 27B).



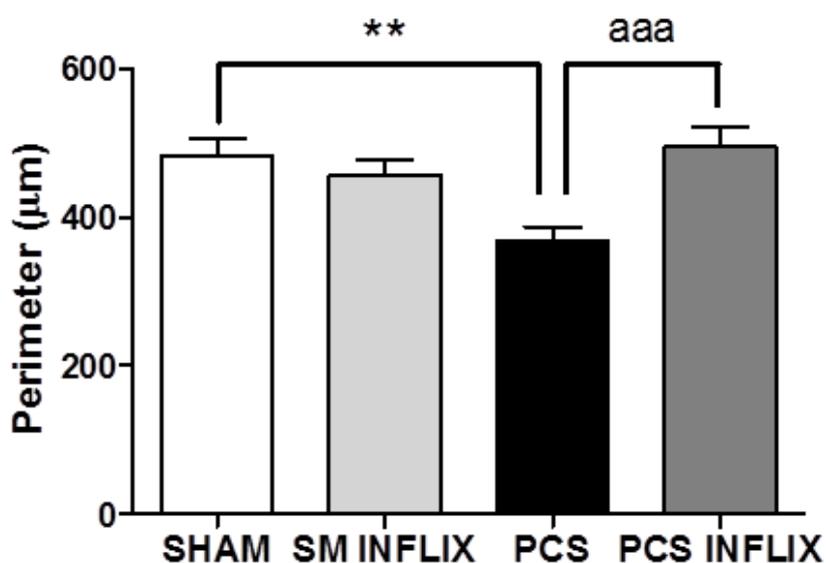
**Figura 27.** Las ratas PCS muestran un aumento del número de células que expresan IL-1 $\beta$  analizado por inmunohistoquímica (A) y de su contenido total analizado por western blot (B) en sustancia blanca de cerebelo que se previene por el tratamiento con infliximab. (B) se muestran imágenes representativas del Western Blot. Los valores son la media  $\pm$  SEM de 4 ratas por cada grupo en (A) y 6 ratas por cada grupo en (B). Los asteriscos indican diferencia significativa respecto al grupo control \*  $p < 0.05$ , \*\*\*  $p < 0.001$  y “a” respecto a las ratas PCS “a”  $p < 0.05$ .

Se observa neuroinflamación también en hipocampo. Las ratas PCS muestran activación de microglía, con un aumento del tamaño del cuerpo celular y procesos más cortos en comparación con las ratas control (Figura 28).



**Figura 28.** Imágenes representativas (x56) que muestran microglía con morfología activada en hipocampo de las ratas PCS. Estos cambios se previenen con el tratamiento con infliximab.

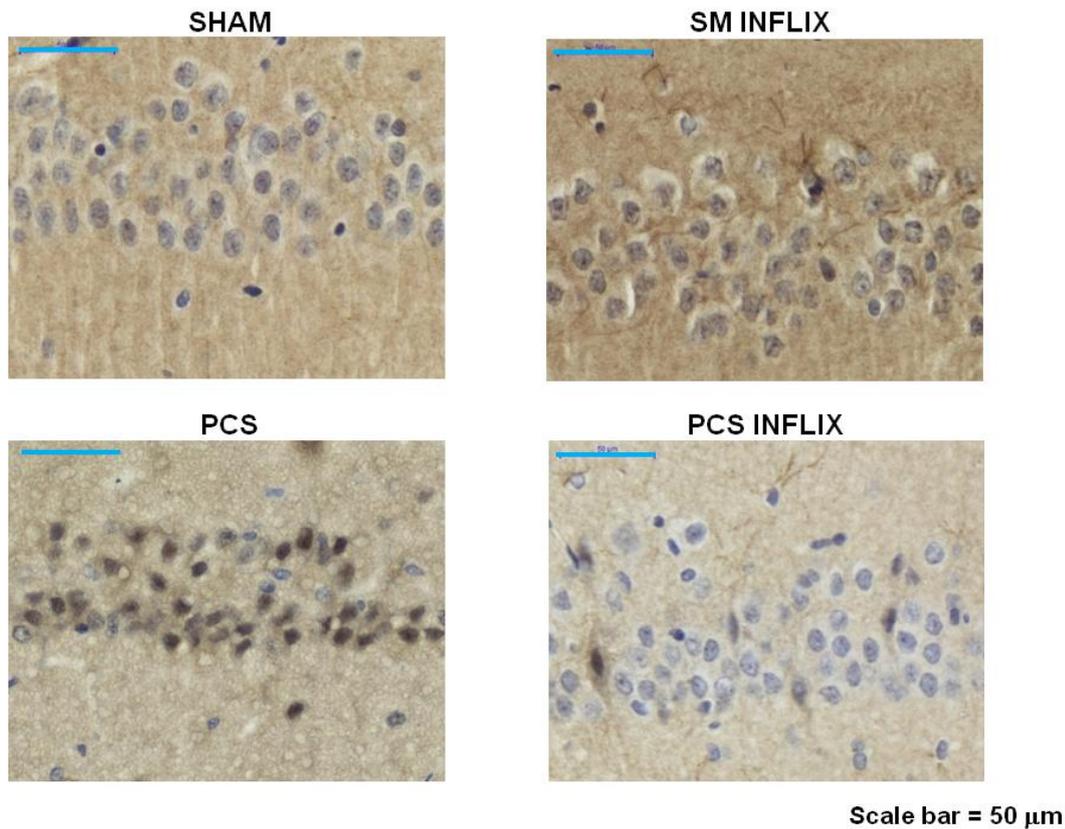
Como medida del grado de activación se analizó el perímetro de las células microgliales teñidas con Iba1 (Figura 29). El perímetro fue menor ( $p < 0,001$ ) en ratas PCS ( $368 \pm 19 \mu\text{m}$ ) que en ratas control ( $481 \pm 25 \mu\text{m}$ ). En las ratas PCS tratadas con infliximab el perímetro de las células microgliales fue de  $495 \pm 27 \mu\text{m}$ , no diferente de las control, lo que indica la prevención de la activación microglial por el tratamiento con infliximab de ratas PCS.



**Figura 29.** Las ratas PCS muestran activación de microglía en hipocampo, que se normaliza por el tratamiento con infliximab. La activación en ratas PCS se refleja en la reducción del perímetro de las células de microglia. El tratamiento con infliximab normaliza el perímetro de la microglía en ratas PCS. Los valores son la media  $\pm$  SEM de 4 ratas por cada grupo. Los asteriscos indican diferencia significativa respecto al grupo control \*\*  $p < 0.01$  y “a” respecto a las ratas PCS “aaa”  $p < 0.001$ .

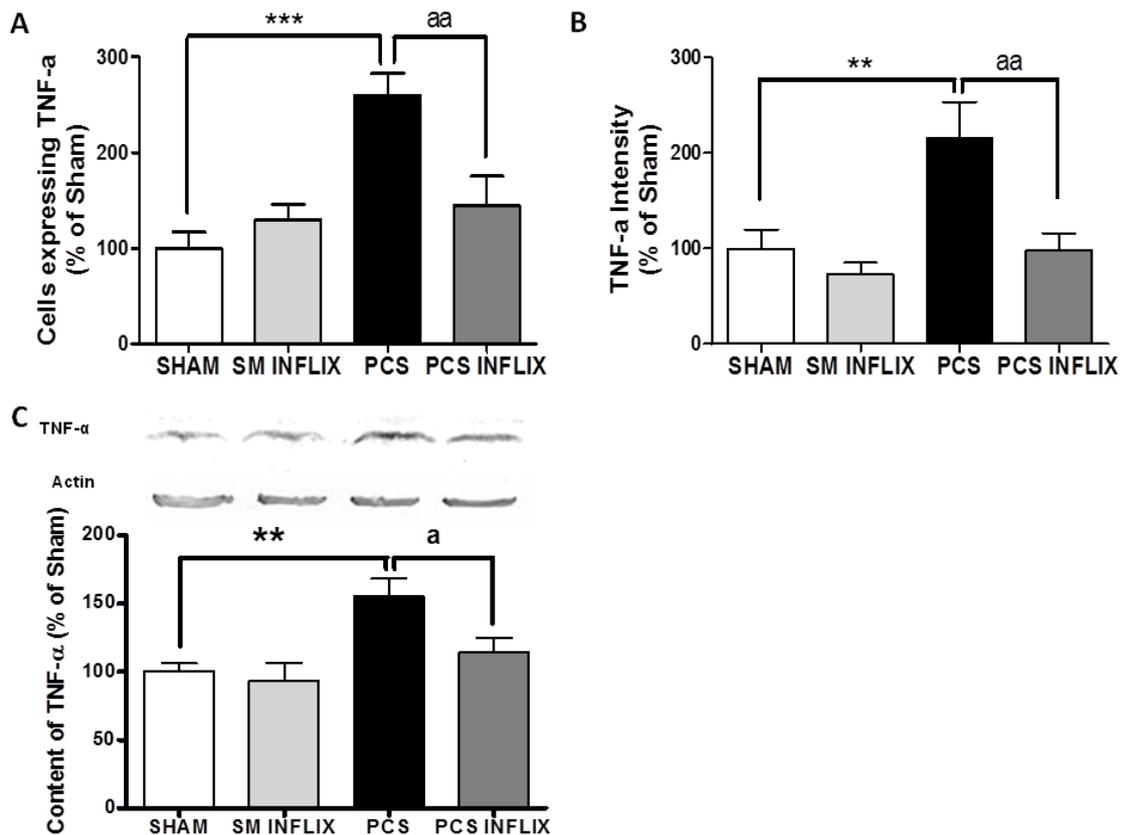
La Figura 30 muestra imágenes representativas del análisis por inmunohistoquímica de TNF-a en la región CA1 del hipocampo.

Las ratas PCS muestran un fuerte aumento ( $260 \pm 23\%$  de las control,  $p < 0,001$ ) del número de células que expresan TNF-a. El tratamiento con infliximab lo redujo a niveles normales ( $145 \pm 31\%$  de las control) (Figura 31A).



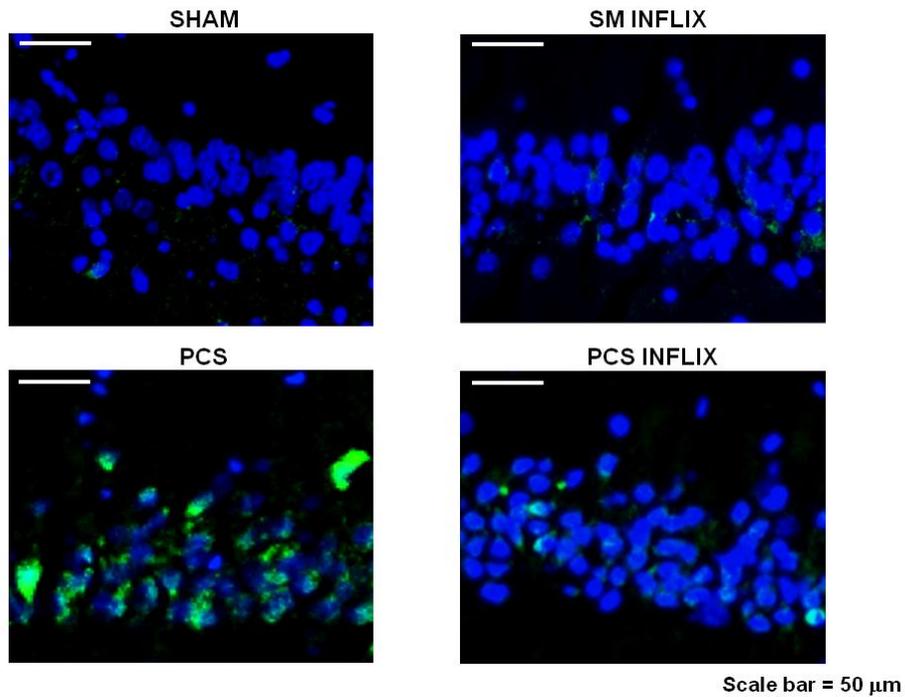
**Figura 30.** Las ratas PCS muestran un aumento del número de células que expresan TNF-a en la región de CA1 de hipocampo, que se revierte por el tratamiento con infliximab. Fotos representativas (x40) de TNF-a en neuronas piramidales de CA1 de hipocampo.

Además, la intensidad de la tinción con anti-TNF-a aumentó en ratas PCS a  $216 \pm 38\%$  respecto a las control ( $p < 0.001$ ) pero no en ratas PCS tratadas con infliximab ( $98 \pm 18\%$  de las control) (Figura 31B). También se analizó el contenido de TNF-a en hipocampo mediante Western blot. Las ratas PCS mostraron un aumento de TNF-a ( $155 \pm 13\%$  de las control;  $p < 0,01$ ). Este aumento no se observó en ratas PCS tratadas con infliximab ( $114 \pm 11\%$  de las control,  $p < 0,05$ ) (Figura 31C).



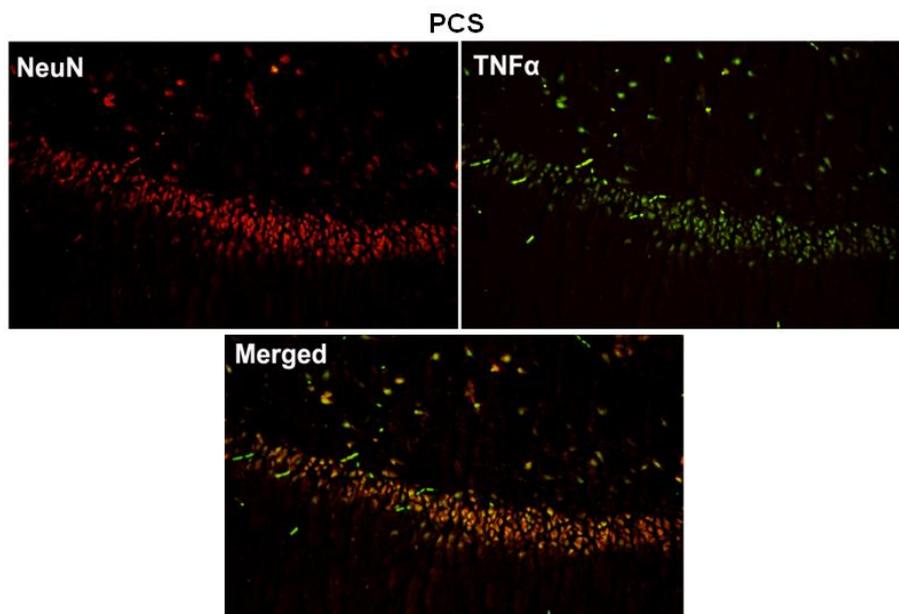
**Figura 31.** Las ratas PCS muestran un aumento del número de células que expresan TNF- $\alpha$  (A) y de su contenido total, cuantificado por inmunohistoquímica (B) y Western blot (C). El tratamiento con infliximab previene estos cambios. (C) Se muestran imágenes representativas del Western Blot. Los valores son la media  $\pm$  SEM de 4 ratas por cada grupo en (A y B) y 10-14 ratas por cada grupo en (C). Los asteriscos indican diferencia significativa respecto al grupo control \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  y “a” respecto a las ratas PCS “a”  $p < 0.05$ , “aa”  $p < 0.01$ .

La tinción de TNF- $\alpha$  se observa principalmente en las neuronas. Para evaluar si esto se debe a la síntesis de TNF- $\alpha$  en las neuronas se realizó una hibridación in situ fluorescente para visualizar el ARNm del TNF- $\alpha$  (Figura 32). Las ratas PCS mostraron una alta expresión del ARNm del TNF- $\alpha$  (en verde) en las neuronas de la región CA1 que es mucho menor en las ratas PCS tratadas con infliximab. El ARNm del TNF- $\alpha$  estaba prácticamente ausente en las neuronas de las ratas control (Figura 32).



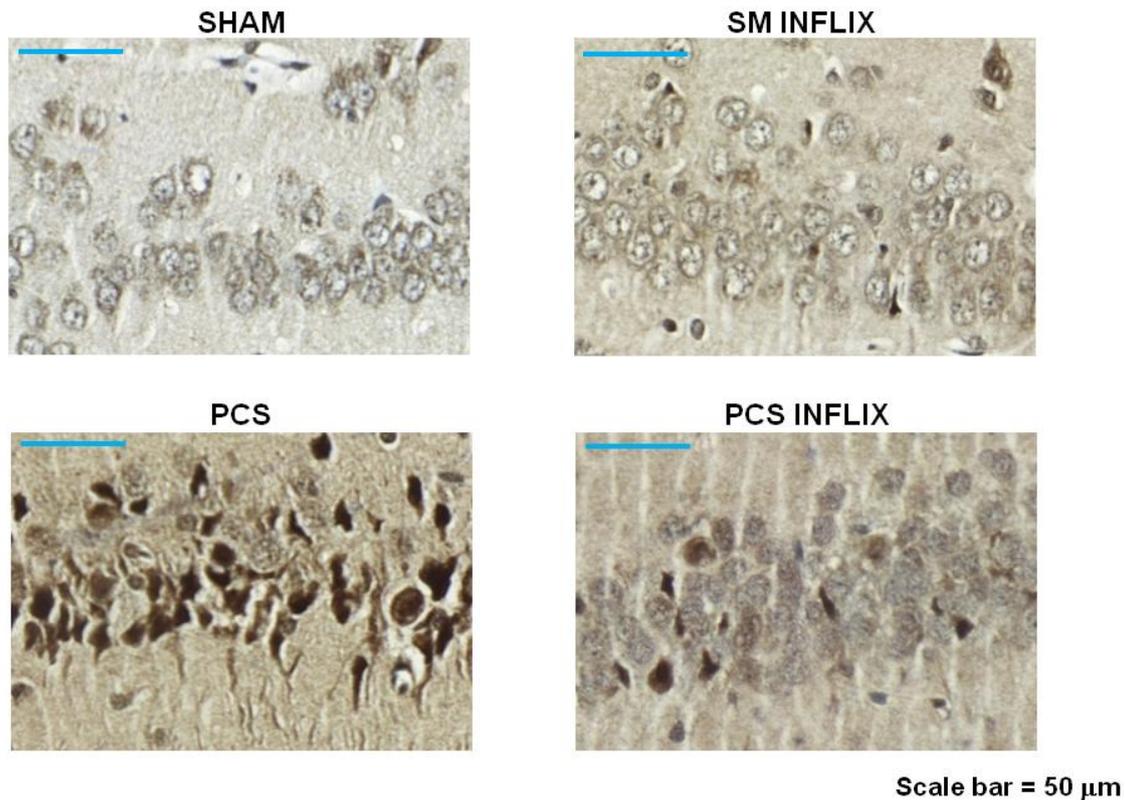
**Figura 32.** Las ratas PCS muestran un aumento del ARNm del TNF-a en neuronas de CA1 de hipocampo, que se previene por el tratamiento con infliximab. Fotos representativas de la hibridación in situ fluorescente del ARNm de TNF-a

Para corroborar que el ARNm de TNF-a en ratas PCS se encuentra en las neuronas se realizó una doble inmunofluorescencia con el marcador neuronal NeuN. Como se muestra en la Figura 33 NeuN y el ARNm de TNF-a colocalizan, confirmando la expresión neuronal de TNF-a en ratas PCS.



**Figura 33.** Imágenes representativas de la hibridación in situ fluorescente del ARNm de TNF-a y su colocalización con el marcador de neuronas NeuN en ratas PCS.

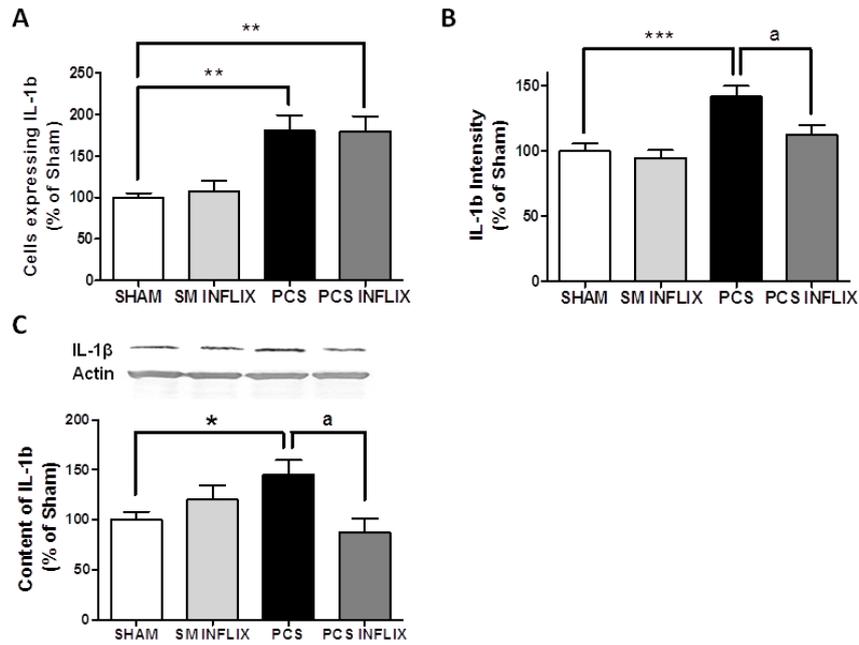
La Figura 34 muestra una imagen representativa de la inmunohistoquímica de IL-1b en la región CA1 del hipocampo. El número de células que expresan IL-1b aumentó en ratas PCS ( $180 \pm 19\%$  de las control;  $p < 0,001$ ) y no se afectó por infliximab ( $180 \pm 18\%$ ) (Figura 35A). La intensidad de tinción de la IL-1b aumentó en las ratas PCS ( $142 \pm 8\%$ ,  $p < 0,001$ ) en comparación con las control, lo que indica un aumento de los niveles de IL-1b. El tratamiento con infliximab normalizó los niveles de IL-1b al  $112 \pm 7\%$  de las control (Figura 35B).



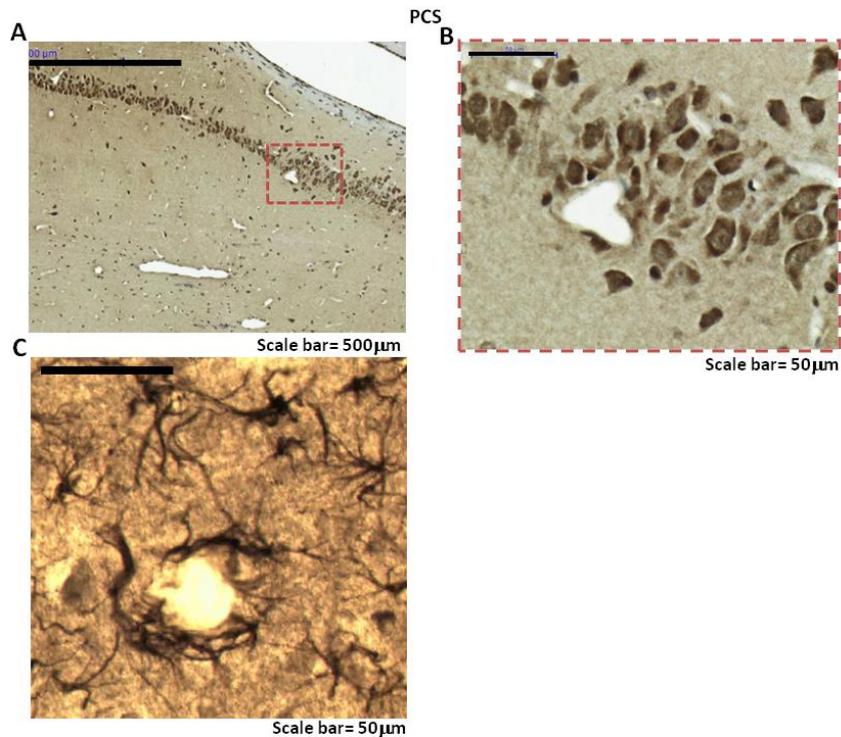
**Figura 34.** Imágenes representativas de la expresión de IL-1b en la región CA1 de hipocampo.

Para confirmar los efectos del fallo hepático y del infliximab sobre el contenido de IL-1b en el hipocampo, se cuantificó también por Western blot. El contenido de IL-1b está aumentado ( $p < 0,05$ ) en ratas PCS al  $138 \pm 15\%$  de las control y se normalizó con infliximab ( $87 \pm 14\%$  de las control) (Figura 35C).

Observamos que muchas células marcadas con IL-1b se localizan alrededor de los vasos sanguíneos, como se ilustra en las figuras (36A-C).

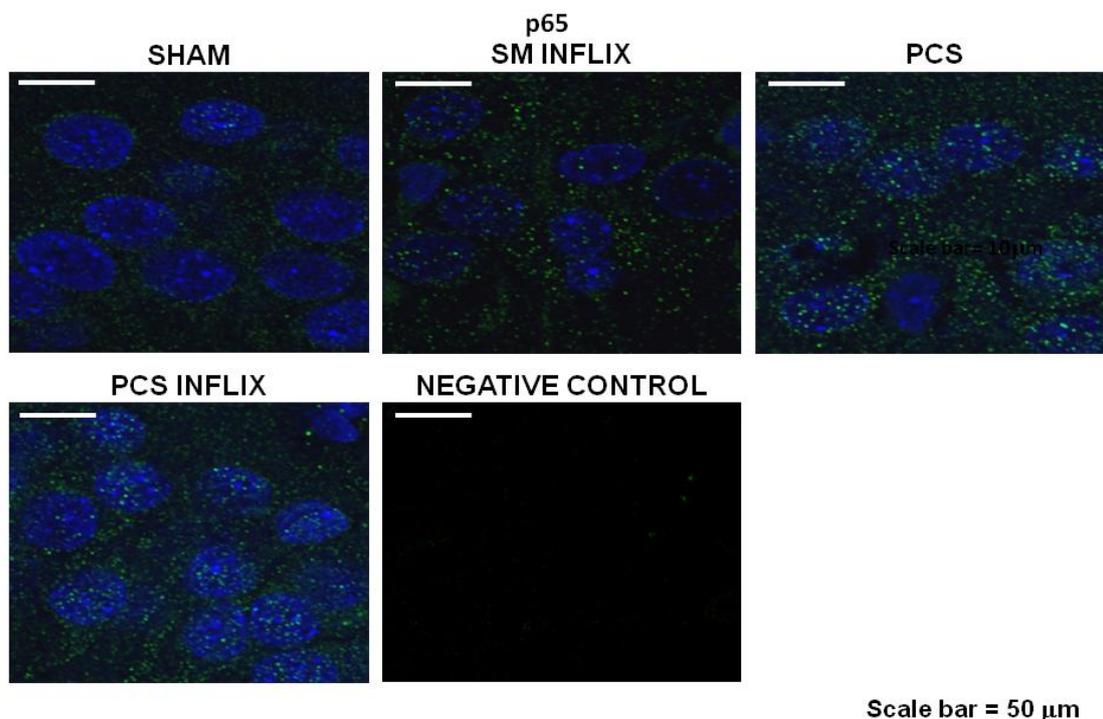


**Figura 35.** Las ratas PCS muestran un aumento del número de células que expresan IL-1b (A) y de su contenido total analizado por inmunohistoquímica (B) o western blot (C). El tratamiento con infliximab no reduce el número de células que expresan TNF-a (A) pero si el contenido total (B y C). (C) Se muestran imágenes representativas del Western blot. Se muestran imágenes representativas del Western Blot. Los valores son la media  $\pm$  SEM de 4 ratas por cada grupo en (A y B) y 10-14 ratas por cada grupo en (C). Los asteriscos indican diferencia significativa respecto al grupo control \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  y “a” respecto a las ratas PCS “a”  $p < 0.05$ .



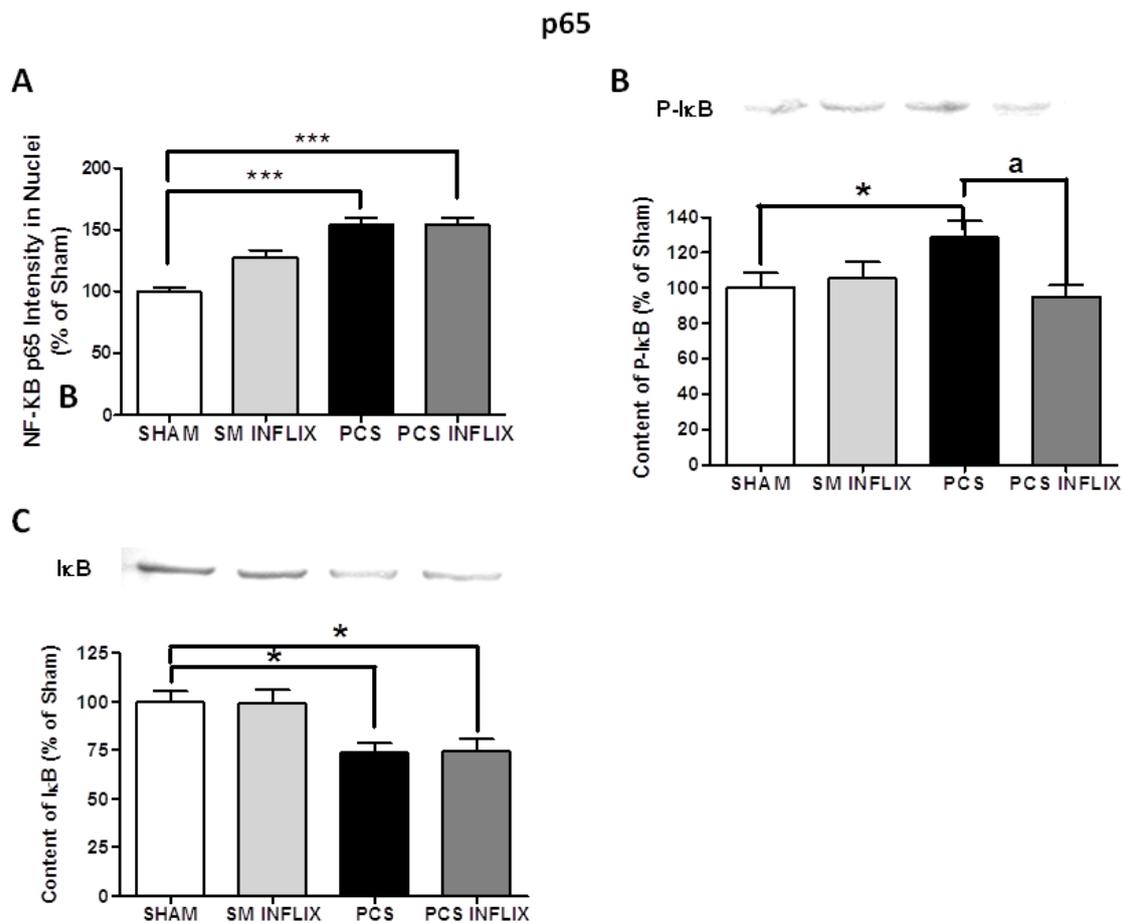
**Figura 36.** Imágenes representativas a menor (x5, A) y mayor (x40, B) aumento de células IL-1b<sup>+</sup> alrededor de un vaso sanguíneo. (C) Imagen representativa (x56) de astrocitos activados expresando IL-1b cerca de un capilar en ratas PCS.

Dado que la expresión de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  está modulada por el factor de transcripción NF- $\kappa$ B, se evaluó si el tratamiento con infliximab podría normalizar la expresión del TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  modulando NF- $\kappa$ B. Imágenes representativas de la inmunofluorescencia de las subunidades p65 y p50 de NF- $\kappa$ B se muestran en las Figuras 37 y 39.



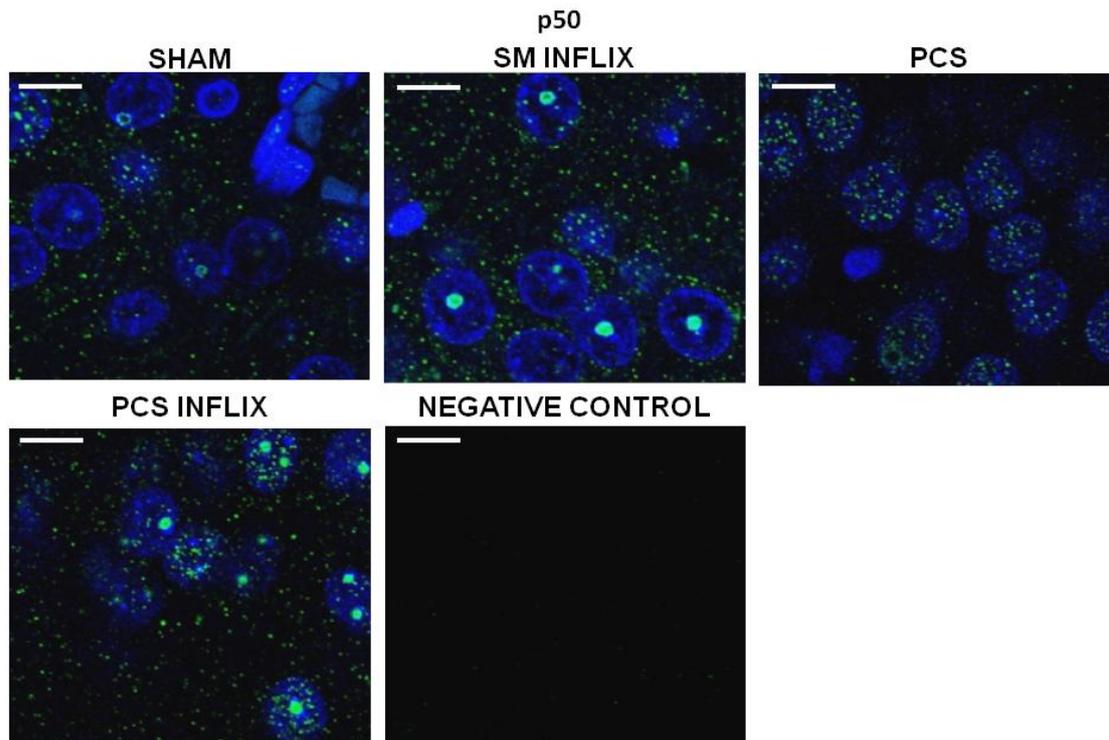
**Figura 37.** Las ratas PCS muestran un aumento de NF- $\kappa$ B en el núcleo de las neuronas de la región CA1 de hipocampo. Imágenes representativas del contenido de la subunidad p65 (puntos verdes) de NF- $\kappa$ B en el núcleo (zona azul) de las neuronas piramidales CA1 de hipocampo.

La intensidad de la tinción de la subunidad p65 de NF- $\kappa$ B en los núcleos aumentó en ratas PCS ( $154 \pm 6\%$  de las control). El tratamiento con infliximab no afectó este aumento, que permaneció en  $154 \pm 6\%$  de las ratas control (Figura 38A). El aumento de la translocación de p65 a los núcleos en ratas PCS está asociado a un aumento de la fosforilación de I $\kappa$ B, que alcanzó  $130 \pm 9\%$  ( $p < 0,05$ ) de las ratas control (Figura 38B) y a la degradación de I $\kappa$ B, cuyos niveles se redujeron al  $73 \pm 5\%$  ( $p < 0.05$ ) de las ratas control (Figura 38C). El tratamiento con infliximab redujo la fosforilación de I $\kappa$ B al  $95 \pm 6\%$  de las ratas control (Figura 38B) y no afectó a la degradación de I $\kappa$ B, ya que los niveles se mantuvieron al  $75 \pm 6\%$  ( $p < 0,05$ ) de las ratas control (Figura 38C). La falta de efecto de infliximab sobre el contenido de I $\kappa$ B está de acuerdo con la falta de efecto sobre el contenido nuclear de la subunidad p65 mostrada en la Figura 37 y 38A.



**Figura 38.** Las ratas PCS muestran un aumento de la translocación al núcleo de p65 (A). También se analizó por western blot el contenido de la forma fosforilada de IκB (B) y el contenido total de IκB(C). Las ratas PCS muestran un aumento de la fosforilación de IκB que se normaliza con infliximab (B) y una disminución de su contenido total que el infliximab no restaura (C). Se muestran imágenes representativas del Western Blot. Los valores son la media  $\pm$  SEM de 3 ratas por cada grupo. Los asteriscos indican diferencia significativa respecto al grupo control \*  $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.001$  y “a” respecto a las ratas PCS “a”  $p < 0.05$ .

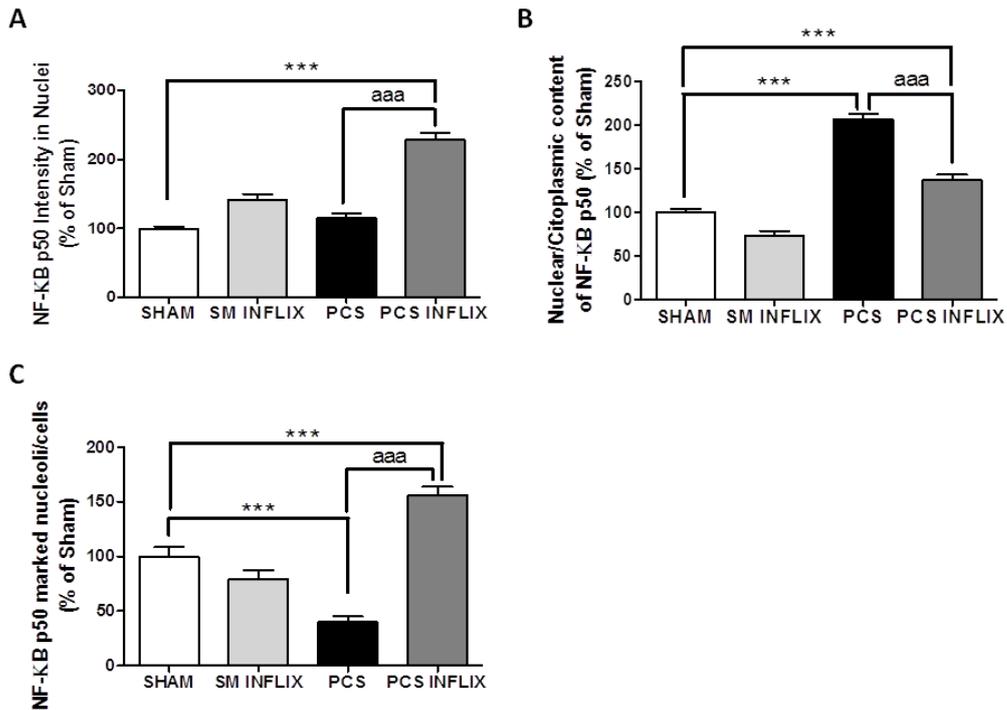
Efectos más notables se encontraron en la subunidad p50 de NF-κB (Figuras 39-40). En ratas PCS la intensidad de la tinción de la subunidad p50 de NF-κB en los núcleos no se alteró (Figura 39 y 40A). El tratamiento con infliximab aumentó la intensidad de p50 en nucleos de ratas PCS al  $228 \pm 10\%$  de las control (Figura 40A). Los principales efectos tanto del fallo hepático como del tratamiento con infliximab se encontraron en la distribución subcelular de p50 entre núcleos, citosol y, especialmente, en nucleolos. La proporción de p50 en los núcleos (puntos verde dentro de la tinción azul del DAPI) sobre citosol (puntos verde fuera de la tinción DAPI) está aumentada en ratas PCS al  $207 \pm 7\%$  de las control ( $p < 0,001$ ). El tratamiento con infliximab redujo esta proporción al  $137 \pm 6\%$  de las control (Figura 40B).



Scale bar = 50  $\mu$ m

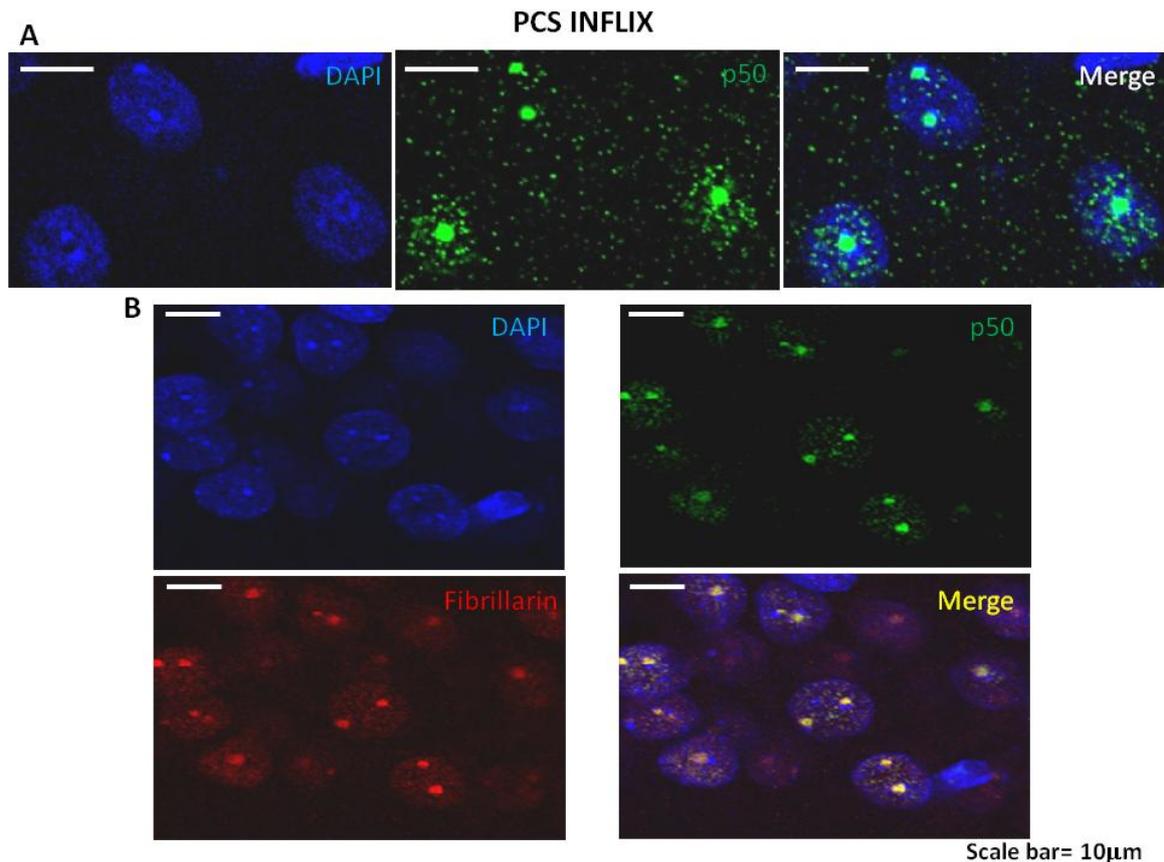
**Figura 39.** Imágenes representativas (x 63) que muestran un aumento del ratio núcleo/citosol de la subunidad p50 de NF- $\kappa$ B (puntos verdes) en el núcleo de las ratas PCS y en el nucléolo de neuronas piramidales CA1 de hipocampo de las ratas PCS tratadas con infliximab.

El principal cambio se encontró en la localización de p50 en los nucléolos. En las ratas PCS el número de células que expresan p50 en los nucleolos se redujo fuertemente ( $40 \pm 5\%$  de las ratas control,  $p < 0,001$ ) (Figura 40C). El tratamiento con infliximab indujo un fuerte aumento ( $156 \pm 8\%$  de las ratas de control) en el número de células que expresan p50 en los nucléolos en ratas PCS. El infliximab no afectó el contenido de la subunidad p50 en nucleolos en ratas control, que se mantuvo en el  $79 \pm 8\%$  de las células (Figura 40C).



**Figura 40.** Efectos del fallo hepático y del tratamiento con infliximab sobre el contenido nuclear (A) y nucleolar (C) de la subunidad p50 y sobre el ratio nucleo/citosol (B). Los valores son la media  $\pm$  SEM de 3 ratas por cada grupo. Los asteriscos indican diferencia significativa respecto al grupo control \*\*\* $p < 0.001$  y “a” respecto a las ratas PCS “aaa”  $p < 0.001$ .

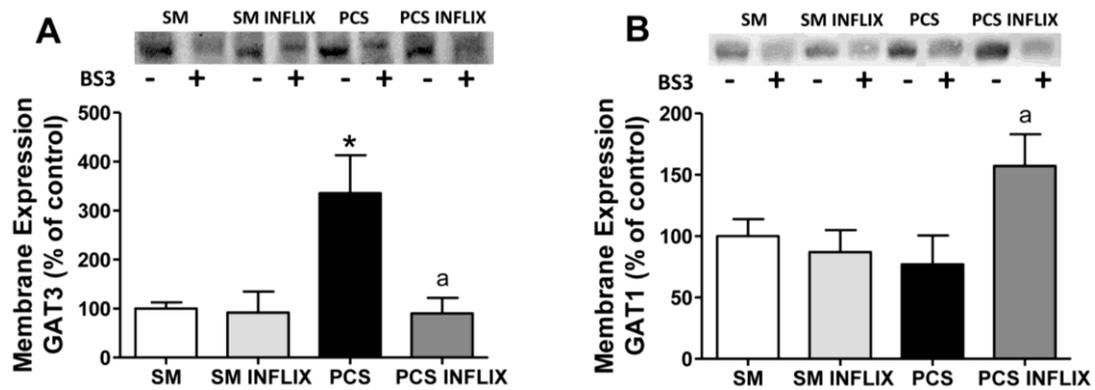
El tratamiento de las ratas PCS con infliximab induce una translocación masiva de p50 de los núcleos al interior de los nucleolos (Figura 40C y 41A). Para confirmar este dato, se realizó una doble inmunofluorescencia utilizando un marcador de nucleólos (fibrilarina, en rojo) y el anticuerpo contra la subunidad p50 (en verde). La figura 41B muestra que hay colocación de los dos anticuerpos, confirmando así la traslocación al nucleólo de p50 en las ratas PCS tratadas con infliximab.



**Figura 41.** Imágenes representativas que muestran una translocación masiva de la subunidad p50 al nucléolo en ratas PCS tratadas con infliximab (A). (B) Doble inmunofluorescencia que muestra colocalización del marcador de nucléolos (fibrillarin, en rojo) y p50 (en verde).

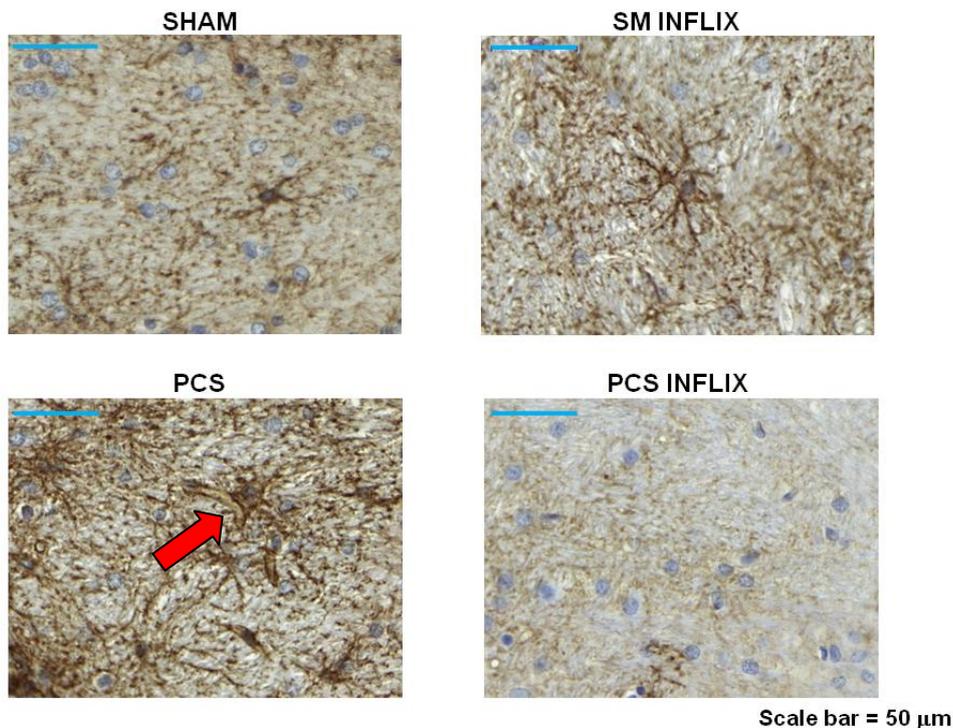
#### **4.3. Alteración de la expresión en membrana de los transportadores de GABA y del GABA extracelular en cerebelo en ratas PCS. Efectos del infliximab.**

Para estudiar los efectos de la neuroinflamación sobre la neurotransmisión en cerebelo, se han analizado dos transportadores del GABA: GAT1 y GAT3. La expresión en membrana del transportador GAT-3 está fuertemente aumentada en ratas PCS ( $336 \pm 77\%$  de las control;  $p < 0,001$ ). El tratamiento con infliximab eliminó completamente este aumento en las ratas PCS volviendo al  $90 \pm 32\%$  de las control (Figura 42A). Con respecto al transportador GAT-1, su expresión en membrana no cambia en ratas PCS, permaneciendo al  $77 \pm 24\%$  de las control (Figura 42B). Sin embargo, el tratamiento con infliximab aumentó fuertemente GAT-1 en membranas de ratas PCS ( $157 \pm 26\%$  de las control,  $p < 0,05$ ), pero no de las ratas control ( $87 \pm 18\%$ ) (Figura 42B).



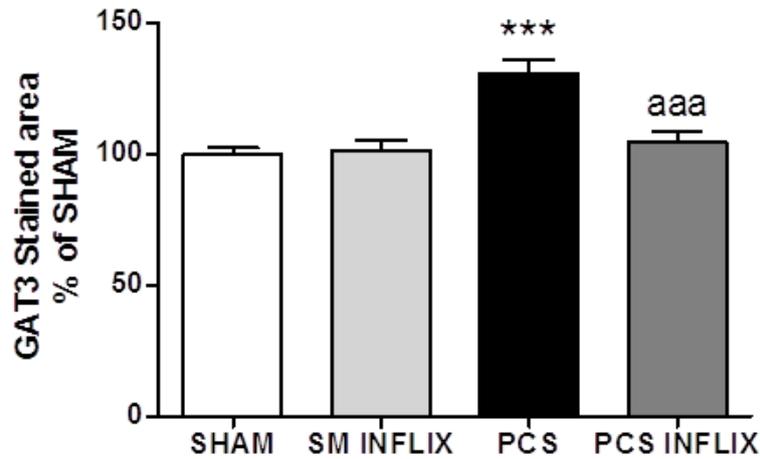
**Figura 42.** Las ratas PCS muestran un aumento de la expresión en membrana de GAT3 (A) que se previene con infliximab. No hay cambios en la expresión en membrana de GAT1 en ratas PCS, pero las ratas PCS con infliximab muestran un aumento de este transportador en membrana (B). Se muestran imágenes representativas de Western blot. Los valores son la media  $\pm$  SEM de 5-8 ratas por cada grupo. Los asteriscos indican diferencia significativa respecto al grupo control  $*p < 0.05$  y “a” respecto a las ratas PCS “a”  $p < 0.05$ .

También se analizó por inmunohistoquímica la expresión de GAT-3 y GAT-1 en cerebelo. Como se muestra en la Figura 43, GAT-3 se expresa principalmente en astrocitos y aumenta especialmente en astrocitos activados (Figura 43, flecha roja) en ratas PCS. Este efecto se previene por el infliximab.



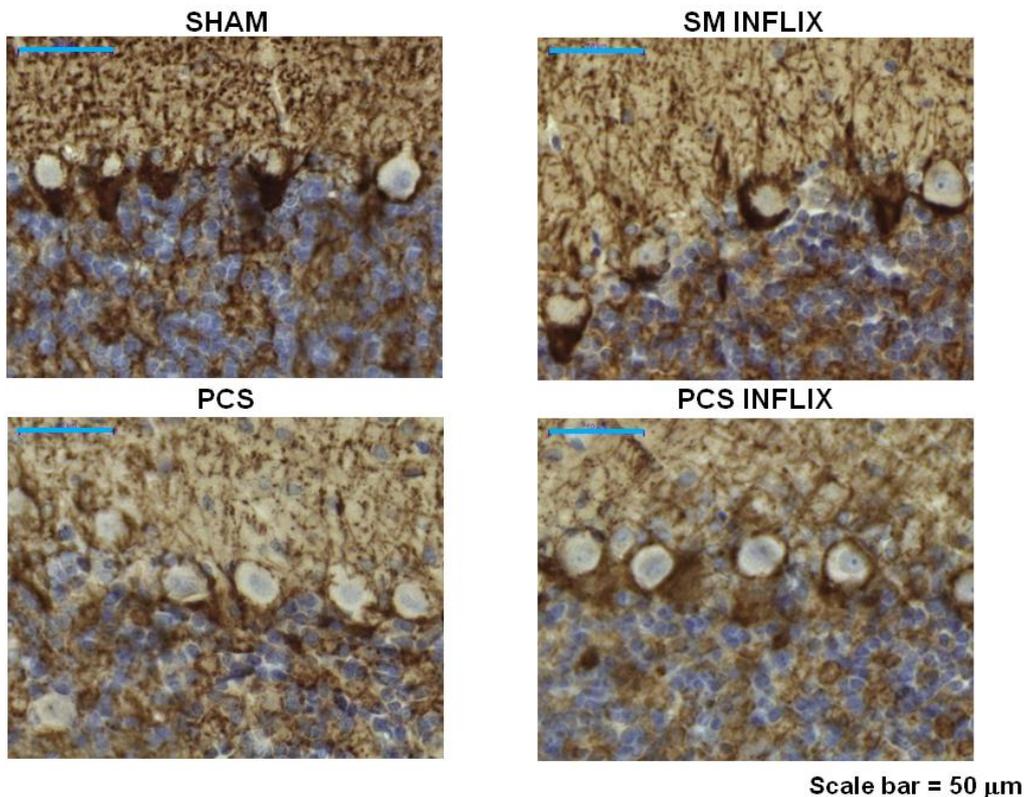
**Figura 43.** Imágenes representativas (x56) del aumento de GAT3 en astrocitos activados (flecha roja) en ratas PCS y su prevención por infliximab.

La intensidad de la tinción por inmunohistoquímica de GAT-3 (Figura 44) aumentó ( $p < 0,001$ ) en cerebelo de las ratas PCS al  $131 \pm 5\%$  de las control y se normalizó con infliximab ( $105 \pm 4\%$  de las control).



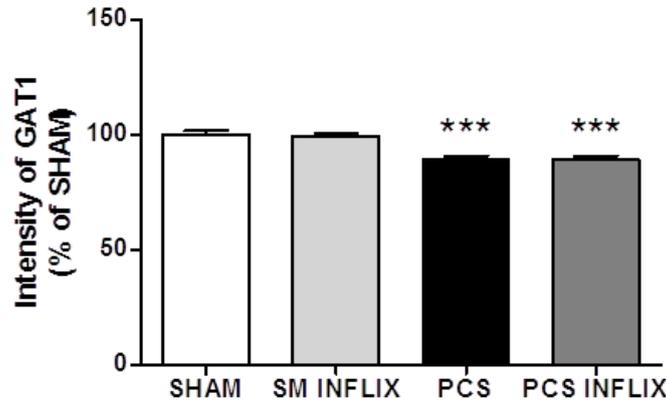
**Figura 44.** Las ratas PCS muestran un aumento del contenido de GAT3 en sustancia blanca de cerebelo analizado por inmunohistoquímica, que se reduce con infliximab. Los valores son la media  $\pm$  SEM de 4 ratas por cada grupo. Los asteriscos indican diferencia significativa respecto al grupo control \*\*\* $p < 0,001$  y “a” respecto a las ratas PCS “aaa”  $p < 0,001$ .

GAT-1 se expresa en la capa granular y alrededor de las células de Purkinje (Figura 45).



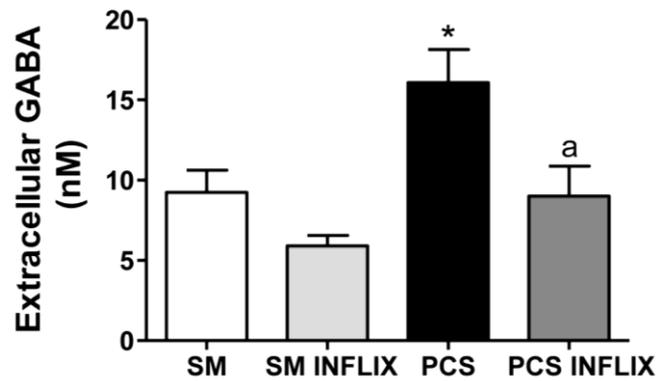
**Figura 45.** Imágenes representativas (x56) que muestran una disminución del contenido de GAT1 en neuronas de Purkinje de las ratas PCS

La intensidad de la inmunotinción con GAT-1 (Figura 46) se redujo ligeramente ( $p < 0,01$ ) alrededor de las células de Purkinje en las ratas PCS ( $89 \pm 2\%$  de las control) y no se afectó por el tratamiento con infliximab ( $90 \pm 3\%$  de las control).



**Figura 46.** Las ratas PCS muestran una reducción del contenido de GAT1 en neuronas de Purkinje analizado por inmunohistoquímica, que no se normaliza con infliximab. Los valores son la media  $\pm$  SEM de 4 ratas por cada grupo. Los asteriscos indican diferencia significativa respecto al grupo control \*\*\* $p < 0,001$ .

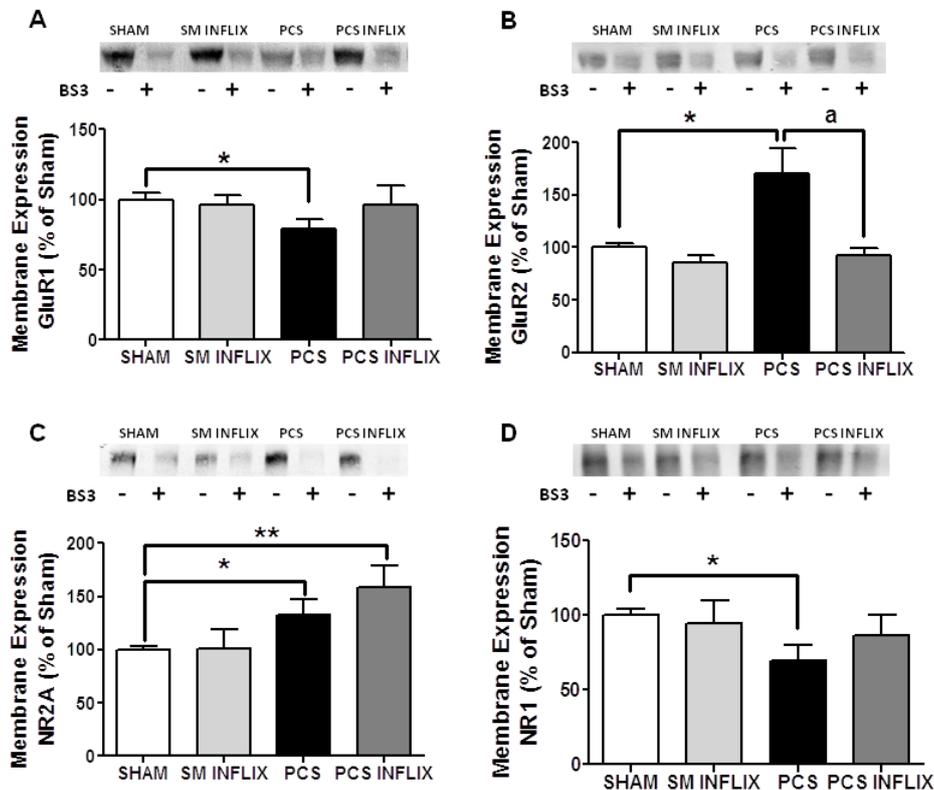
La concentración extracelular de GABA se analizó en el cerebelo de ratas en libre movimiento mediante microdiálisis. El GABA extracelular está aumentado en ratas PCS al  $182 \pm 22\%$  de las control ( $p < 0,05$ ). El tratamiento con infliximab eliminó completamente este aumento en las ratas PCS ( $98 \pm 19\%$  de las control) (Figura 47).



**Figura 47.** El GABA extracelular aumenta en cerebelo de ratas PCS. El infliximab previene el cambio. Los valores son la media  $\pm$  SEM de 12-13 ratas por cada grupo. Los asteriscos indican diferencia significativa respecto al grupo control \* $p < 0,05$  y “a” respecto a las ratas PCS “a”  $p < 0,05$ .

#### 4.4. Alteración de la expresión en membrana de los receptores AMPA y NMDA en hipocampo de ratas PCS. Efectos del infliximab.

En hipocampo, para analizar posibles alteraciones de la neurotransmisión se analizó la expresión en membrana de los receptores AMPA y NMDA. La expresión en membrana de la subunidad GluR1 del receptor AMPA está disminuida ( $p < 0.05$ ) en hipocampo de ratas PCS al  $79 \pm 9\%$  de las ratas control (Figura 48A). Por otra parte, se observó un aumento en la expresión de membrana de la subunidad GluR2 ( $p < 0.05$ ) en ratas PCS al  $150 \pm 30\%$  de las ratas control (Figura 48B). El tratamiento con infliximab normalizó la expresión en membrana de ambas subunidades: GluR1 al  $93 \pm 13\%$  de las ratas control (Figure 48A) y GluR2 a  $108 \pm 8\%$  de las ratas control (Figura 48B). Estos valores no difieren significativamente de los valores observados en las ratas control, indicando una prevención por infliximab de los efectos en ratas PCS.



**Figura 48.** Alteraciones de la expresión en membrana de las subunidades GluR1 (A) y GluR2 (B) de los receptores AMPA y de las subunidades NR2A (C) y NR1 (D) de los receptores NMDA en hipocampo de ratas PCS. Prevención por el tratamiento con infliximab. Se muestran imágenes representativas de los western blots. Los valores son la media  $\pm$  SEM de 8-16 ratas por cada grupo. Los asteriscos indican diferencia significativa respecto al grupo control \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  y “a” respecto a las ratas PCS “a”  $p < 0.05$ .

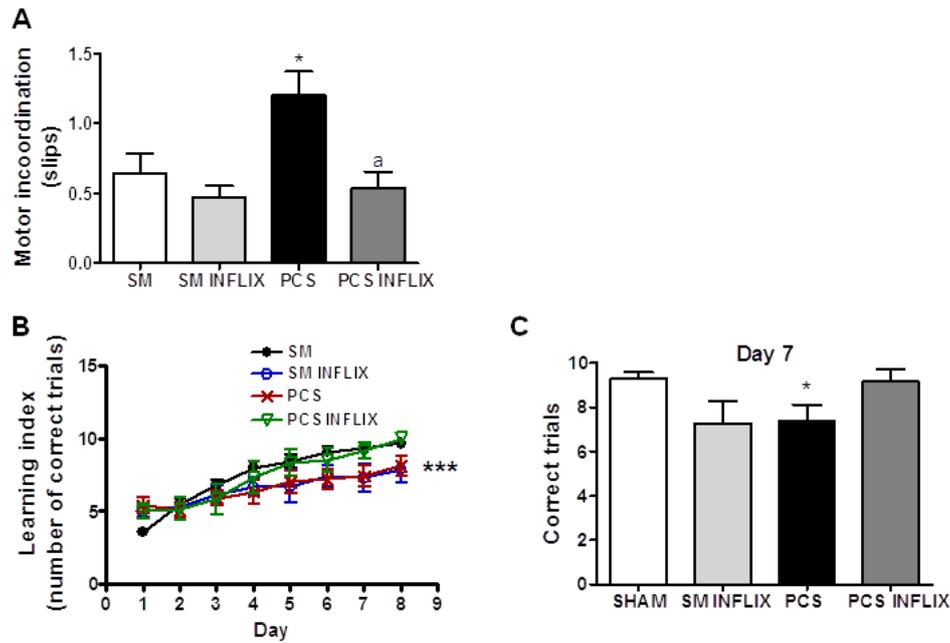
También se analizaron los receptores NMDA. La expresión en membrana de la subunidad NR2A está aumentada ( $p < 0.05$ ) en ratas PCS al  $132 \pm 16\%$  de las ratas

control (Figura 48C). Sin embargo, la expresión en membrana de la subunidad NR1 está reducida en las ratas PCS al  $75 \pm 11\%$  de las ratas control (Figura 48D). El tratamiento con infliximab normalizó la expresión de NR1 al  $108 \pm 20\%$  de las ratas control (Figura 48D) pero no la de la subunidad NR2A que aumentó al  $158 \pm 20\%$  de las ratas control (Figure 48C).

#### **4.5.El tratamiento con infliximab restaura la coordinación motora y el aprendizaje en el laberinto en Y en las ratas PCS**

Las ratas PCS muestran incoordinación motora en el beam-walking test (Figura 49A), presentando un mayor número de resbalones ( $1,2 \pm 0,2$ ,  $p < 0,001$ ) que las ratas control ( $0,6 \pm 0,2$  resbalones). El tratamiento con infliximab normalizó completamente la coordinación motora en ratas PCS ( $0,5 \pm 0,1$  resbalones).

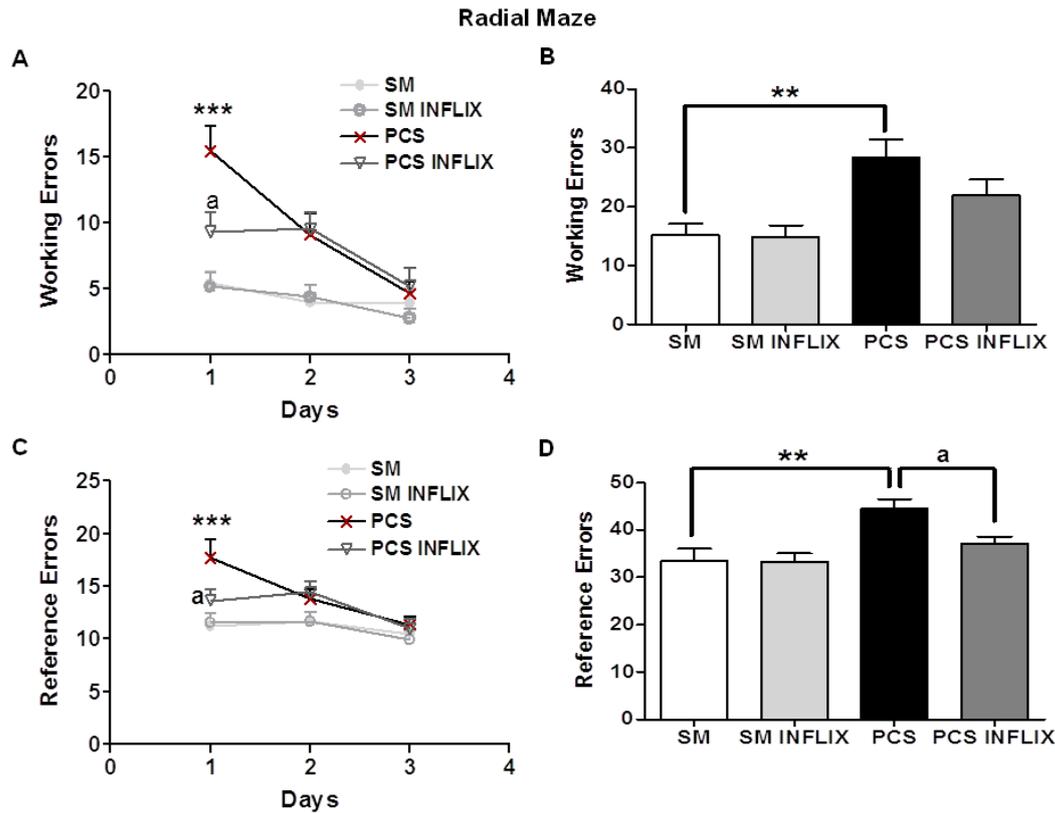
Las ratas PCS también muestran una disminución de la capacidad para aprender la tarea en el laberinto en Y (Figura 49B y C). Como se muestra en la Figura 49B, el índice de aprendizaje mejoró con los días de entrenamiento en todos los grupos. El análisis ANOVA muestra que el índice de aprendizaje fue menor en las ratas PCS que en ratas control ( $p < 0,001$ ,  $F = 7,587$ ). Las ratas PCS tratadas con infliximab recuperaron completamente la capacidad de aprendizaje alcanzando valores similares a los controles (Figura 49B). Los datos del día 7 (Figura 49C) muestran que las ratas control realizan correctamente  $9,3 \pm 0,3$  ensayos, mientras que las ratas PCS realizan significativamente menos ensayos correctos ( $7,4 \pm 0,7$ ;  $p = 0,01$ ). Las ratas PCS tratadas con infliximab recuperan la capacidad de aprendizaje y realizan correctamente  $9,2 \pm 0,5$  ensayos, de manera muy similar a las ratas control.



**Figura 49.** (A) Las ratas PCS muestran incoordinación motora. El tratamiento con infliximab previene este deterioro. (B) Curva de aprendizaje en el laberinto en Y. Las ratas PCS muestran un aprendizaje más lento que las ratas control. El tratamiento con infliximab restaura la capacidad de aprendizaje. (C) Numero de ensayos correctos el día 7 de aprendizaje. Los valores son la media  $\pm$  SEM de 6-7 ratas por cada grupo en (A) y 22-25 ratas por cada grupo en (B y C). Los asteriscos indican diferencia significativa respecto al grupo control \* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.001$  y “a” respecto a las ratas PCS “a”  $p < 0.05$ .

#### 4.6. El aprendizaje y la memoria espacial están alterados en las ratas PCS pero no en ratas PCS tratadas con infliximab

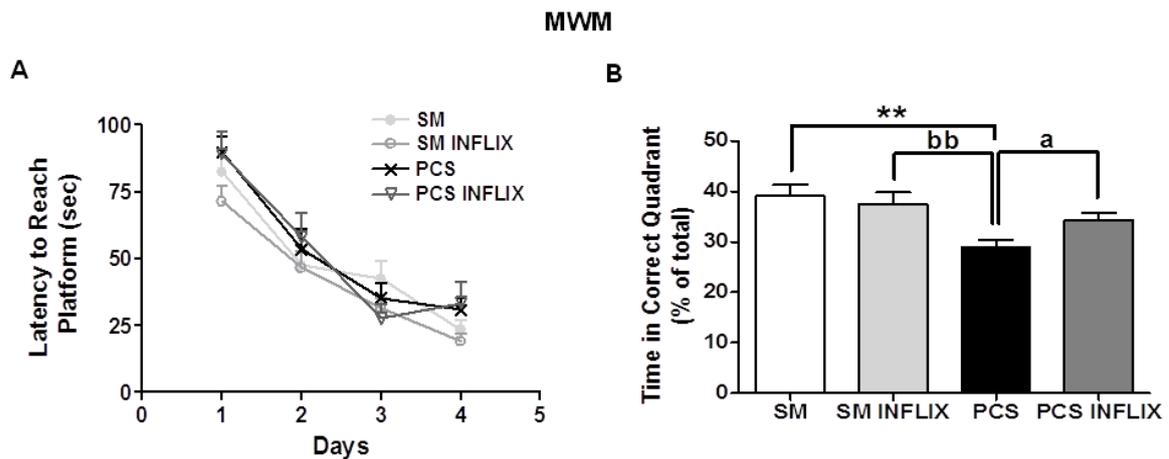
El aprendizaje y la memoria espacial en las ratas se evaluaron utilizando el laberinto radial y el laberinto acuático de Morris. En el laberinto radial, las ratas PCS realizaron más errores de trabajo que las ratas control los días 1 y 2 (Figura 50A). El tratamiento con infliximab mejoró el rendimiento de las ratas PCS, que tuvieron significativamente menos ( $p < 0,05$ ) errores de trabajo ( $9 \pm 1,5$ ) en el día 1 que las ratas PCS (Figura 50A). El número total de errores de trabajo durante los 3 días fue mayor ( $p < 0,01$ ) en ratas PCS ( $32 \pm 4$ ) que en ratas control ( $16 \pm 3$ ). El tratamiento con infliximab mejoró el aprendizaje de las ratas PCS, que tuvieron  $23 \pm 3$  errores, no siendo estadísticamente diferentes de las control (Figura 50B).



**Figura 50.** Las ratas PCS tienen deteriorado el aprendizaje y la memoria espacial realizando más errores de trabajo (A y B) y de referencia (C y D) en el laberinto radial. El tratamiento con infliximab restaura la memoria de trabajo y de referencia en las ratas PCS. Los valores son la media  $\pm$  SEM de 15-16 ratas por cada grupo. Los asteriscos indican diferencia significativa respecto al grupo control \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  y “a” respecto a las ratas PCS “a”  $p < 0.05$ .

Las ratas PCS también realizaron más errores de referencia ( $18 \pm 1.7$ ) que las control ( $11 \pm 1$ ) en el laberinto radial el día 1 (Figura 50C). Esto también se normalizó con infliximab. Las ratas PCS tratadas con infliximab realizaron significativamente menos errores de referencia ( $14 \pm 1$ ,  $p < 0,05$ ) que las ratas PCS (Figura 50C). El número total de errores de referencia durante los 3 días fue mayor ( $p < 0,01$ ) en ratas PCS ( $45 \pm 2$ ) que en ratas control ( $33 \pm 3$ ). El tratamiento con infliximab normalizó completamente la memoria de referencia de las ratas PCS, que realizaron  $37 \pm 2$  errores (Figura 50D).

En el laberinto acuático de Morris, el aprendizaje espacial no se vio afectado (Figura 51A), pero la memoria espacial de las ratas PCS se vio reducida (Figura 51B). En el test de memoria las ratas PCS permanecieron menos tiempo ( $25 \pm 2\%$  del tiempo,  $p < 0,05$ ) en el cuadrante correcto que las ratas control ( $36 \pm 3\%$  del tiempo). El tratamiento con infliximab restauró la memoria espacial en ratas PCS, que permanecieron  $34 \pm 2\%$  del tiempo en el cuadrante correcto (Figura 51B).



**Figura 51.** Las ratas PCS tienen deteriorada la memoria espacial que se recupera con infliximab como se observa en el test del laberinto acuático de Morris (B). No se observan diferencias en la curva de aprendizaje (A). Los valores son la media  $\pm$  SEM de 15-16 ratas por cada grupo. Los asteriscos indican diferencia significativa respecto al grupo control \*\* $p < 0.01$ , “a” respecto a las ratas PCS “a”  $p < 0.05$  y “b” respecto a las ratas control tratadas con infliximab “bb”  $p < 0,01$ .

Los resultados presentados hasta ahora confirman la presencia de neuroinflamación en ratas con fallo hepático. Sin embargo, no se ha caracterizado adecuadamente la neuroinflamación en pacientes con fallo hepático.

En esta tesis hemos caracterizado la neurodegeneración y la neuroinflamación en cerebelo de pacientes fallecidos con distintos grados de enfermedad hepática.

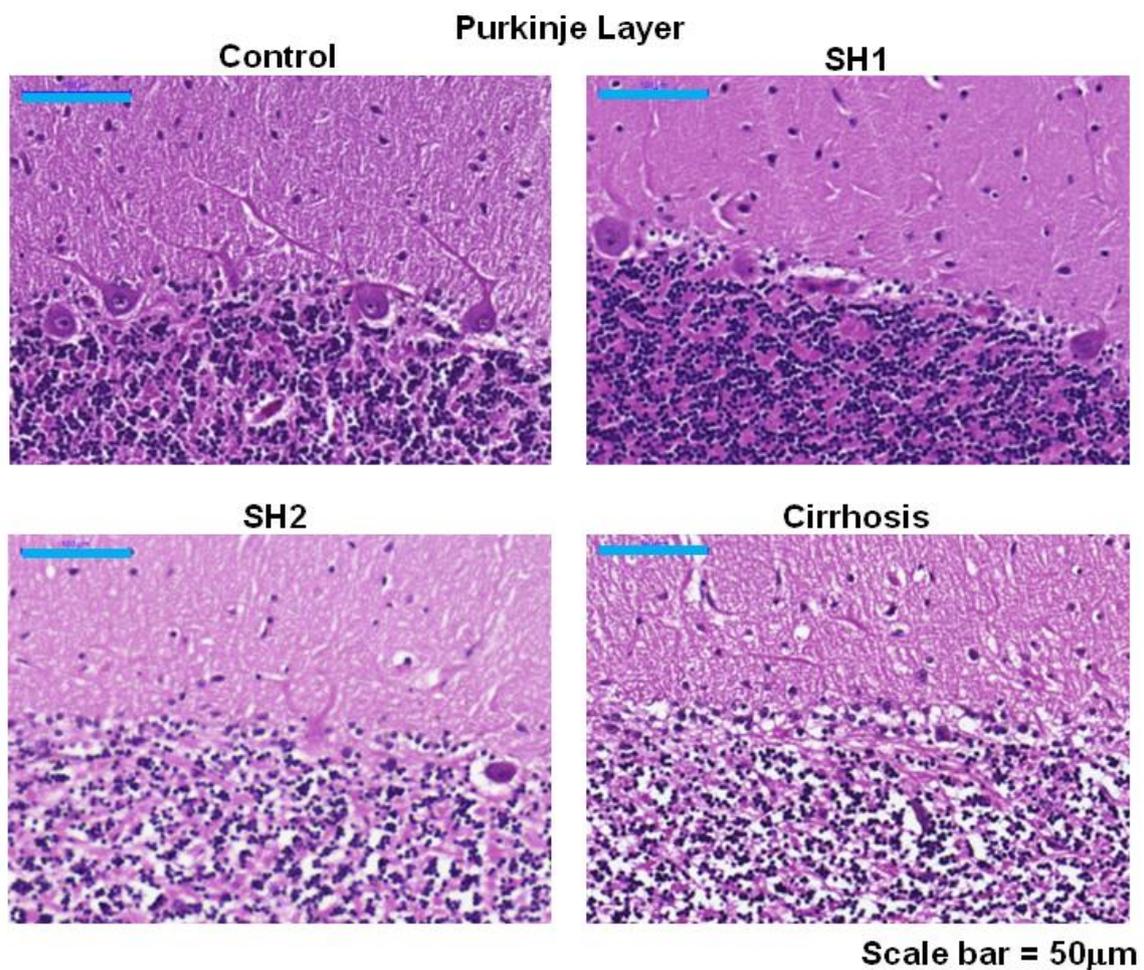
#### **4.7. Estudios en cerebelo de pacientes fallecidos con distintos grados de enfermedad hepática.**

Para llevar a cabo el estudio se han utilizado muestras post-mortem de cerebelo de pacientes controles ( $n=6$ ), con esteatohepatitis leve (SH1;  $n=9$ ), esteatohepatitis moderada (SH2;  $n=6$ ), esteatohepatitis elevada (SH3;  $n=4$ ), cirrosis ( $n=4$ ) y cirrosis con encefalopatía hepática diagnosticada ( $n=5$ ). Los datos sobre tipo de enfermedad hepática, sexo, edad, causa de la muerte, intervalo post-mortem y procedencia de la muestra se detallan en la Tabla 4 en el apartado 4.1 de la Introducción.

##### **4.7.1. La enfermedad hepática induce pérdida neuronal en cerebelo ya desde estadios tempranos de esteatohepatitis**

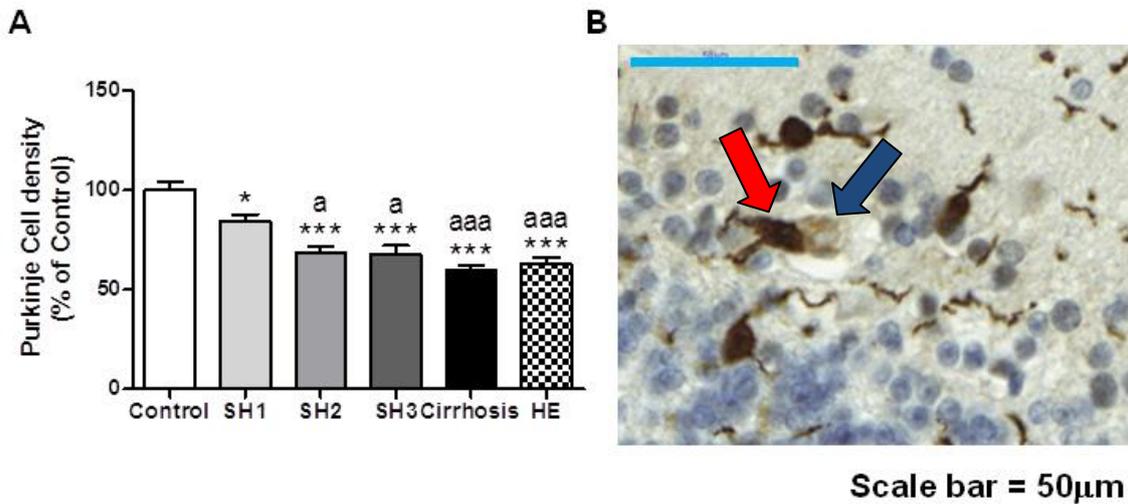
La tinción con hematoxilina-eosina muestra que se produce pérdida neuronal en la capa de Purkinje (Figura 52) y en la capa granular (Figura 54) de cerebelo de pacientes con diferentes grados de enfermedad hepática. Los pacientes con esteatohepatitis leve SH1

muestran una disminución del número de neuronas de Purkinje ( $84 \pm 4\%$ ,  $p < 0,05$ ) en comparación con los controles sin enfermedad hepática ( $100 \pm 4\%$ ) (Figura 53A). La pérdida neuronal aumentó en los siguientes estadios de la esteatohepatitis: SH2 ( $69 \pm 3\%$  de los controles,  $p < 0,001$ ) y SH3 ( $68 \pm 5\%$  del control;  $p < 0,001$ ). En estos dos últimos subgrupos de esteatohepatitis las diferencias en el número de células de Purkinje también son significativas con el subgrupo SH1 ( $p < 0,05$ ). Los pacientes con cirrosis hepática y encefalopatía hepática muestran el porcentaje más alto de neurodegeneración manteniendo solo el  $60 \pm 2\%$  ( $p < 0,001$ ) y el  $63 \pm 3\%$  ( $p < 0,001$ ) de células de Purkinje, respectivamente en comparación con los sujetos control (Figura 53A).



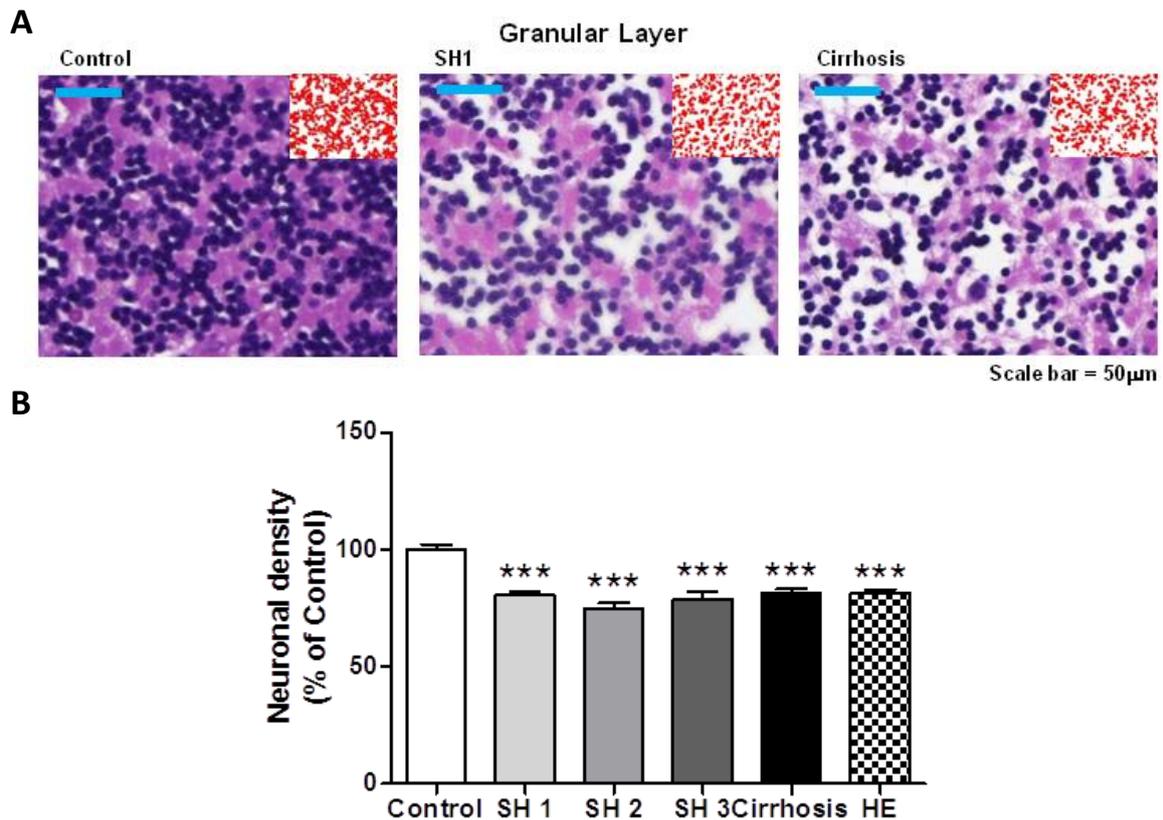
**Figura 52.** Imágenes representativas (x40) de la tinción con hematoxilina-eosina de la capa de Purkinje en muestras post-mortem de humanos con diferentes grados de enfermedad hepática. Se observa una disminución significativa del número de neuronas de Purkinje en pacientes con SH1, SH2 y cirrosis.

Los resultados obtenidos sugieren que la microglía activada en la capa molecular puede ser la responsable directa de la pérdida de neuronas de Purkinje. La figura 53B muestra un ejemplo de una microglía "fagocitando" una neurona de Purkinje.



**Figura 53.** Los pacientes con esteatohepatitis, cirrosis y encefalopatía hepática muestran una disminución de la densidad neuronal en la capa de Purkinje (A). (B) Imagen representativa que muestra una microglía de la capa molecular (flecha roja) fagocitando una neurona de Purkinje (flecha azul). Los valores son la media  $\pm$  SEM de 4-9 sujetos por cada grupo. Los asteriscos indican diferencia significativa respecto al grupo control \* $p < 0,05$ , \*\*\* $p < 0,001$  y "a" respecto al grupo SH1 "a"  $p < 0,05$ , "aaa"  $p < 0,001$ .

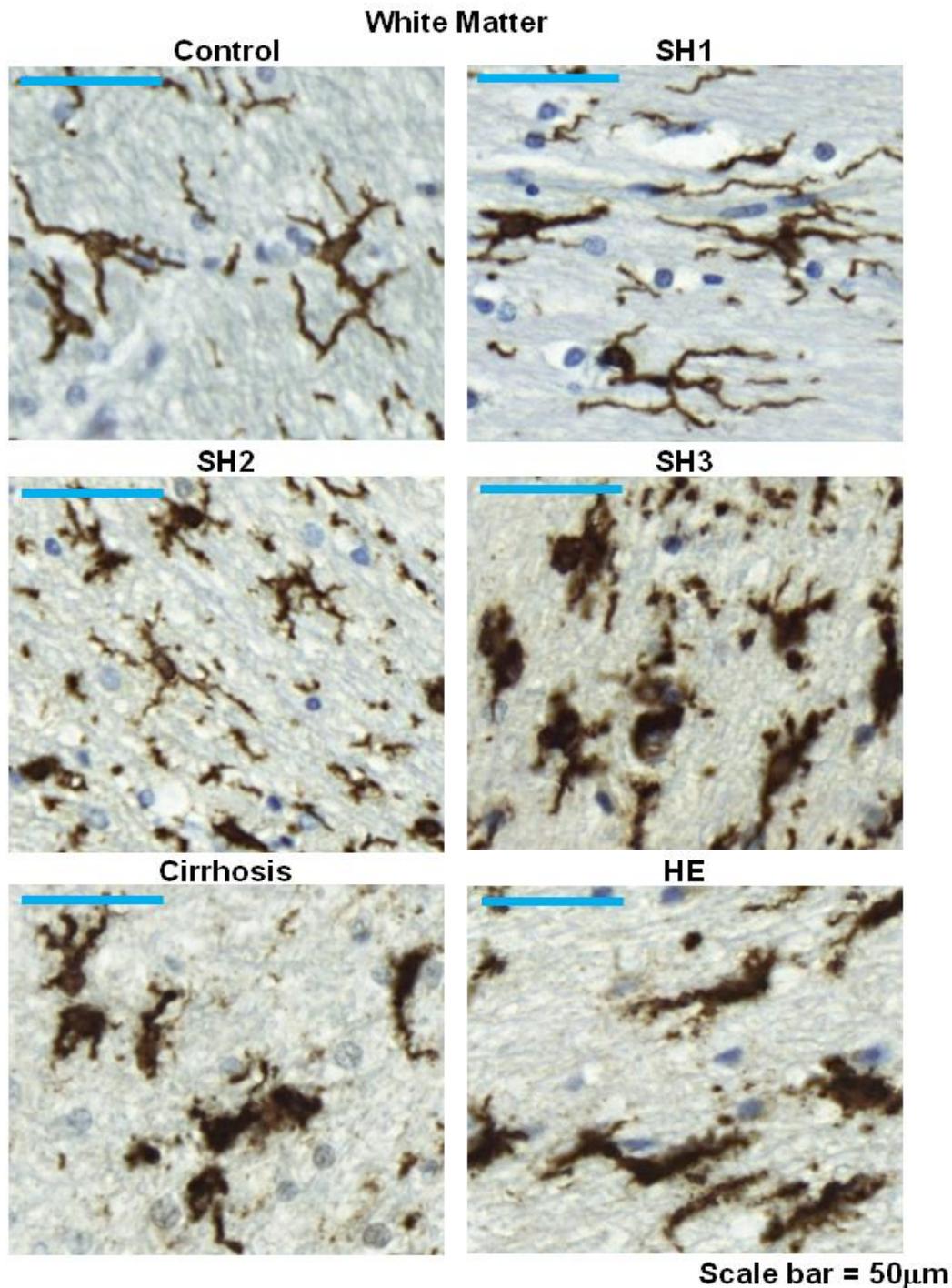
También se observaron niveles significativos de pérdida neuronal en la capa granular en todos los grados de la enfermedad hepática (Figura 54A y B). Los pacientes con SH1 ya mostraron una disminución de la densidad neuronal ( $81 \pm 2\%$ ,  $p < 0,001$ ) en comparación con los sujetos control ( $100 \pm 2\%$ ). En los estadios más avanzados de esteatohepatitis (SH2 =  $75 \pm 2\%$ , SH3 =  $79 \pm 3\%$ ) y en pacientes con cirrosis hepática ( $82 \pm 2\%$ ) y HE ( $82 \pm 2\%$ ) el porcentaje de pérdida neuronal no difiere del subgrupo SH1 pero es significativamente diferente de los sujetos control ( $p < 0,001$ ) (Figura 54B).



**Figura 54.** Imágenes representativas (X56) de la tinción con hematoxilina-eosina de la capa granular de pacientes con distintos grados de enfermedad hepática (A). Los pacientes con esteatohepatitis, cirrosis y encefalopatía hepática muestran una disminución del número de neuronas en la capa granular (B). Los valores son la media  $\pm$  SEM de 4-9 sujetos por cada grupo. Los asteriscos indican diferencia significativa respecto al grupo control \*\*\* $p < 0.001$ .

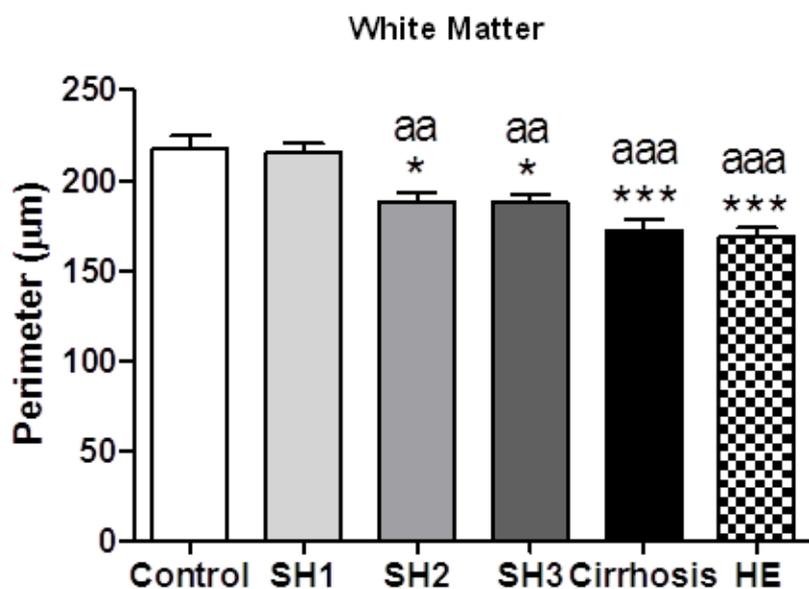
#### **4.7.2. La activación de microglía y astrocitos se inicia antes en la capa molecular que en la sustancia blanca en pacientes con esteatohepatitis.**

La activación de la microglía comienza antes (en el estadio SH1 de esteatohepatitis) en la capa molecular (Figuras 57 y 58) y posteriormente (en el estadio SH2) en la sustancia blanca (Figuras 55 y 56).



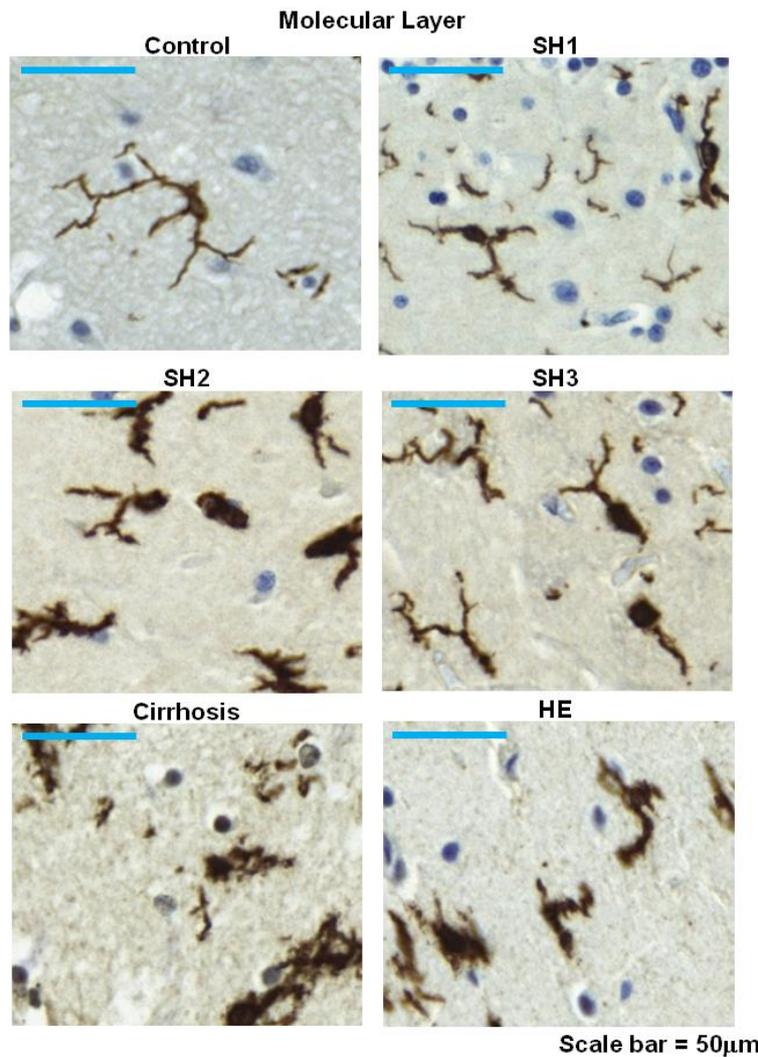
**Figura 55.** Imágenes representativas (x56) de la tinción con IBA1 de la sustancia blanca de pacientes (A). La morfología muestra activación de la microglía a partir de los pacientes con SH2.

En la sustancia blanca, el perímetro de la microglía (Figura 56), cuya disminución mide el grado de activación, disminuyó en los pacientes SH2 y SH3 ( $188 \pm 5\mu\text{m}$  y  $187 \pm 5\mu\text{m}$ , respectivamente) en comparación con los sujetos control ( $218 \pm 7\mu\text{m}$ ,  $p < 0,05$ ) y los pacientes SH1 ( $215 \pm 5\mu\text{m}$ ,  $p < 0,01$ ). El grado de activación aumentó en pacientes con cirrosis hepática ( $172 \pm 6\mu\text{m}$ ,  $p < 0,001$ ) y con HE ( $169 \pm 5\mu\text{m}$ ,  $p < 0,001$ ).

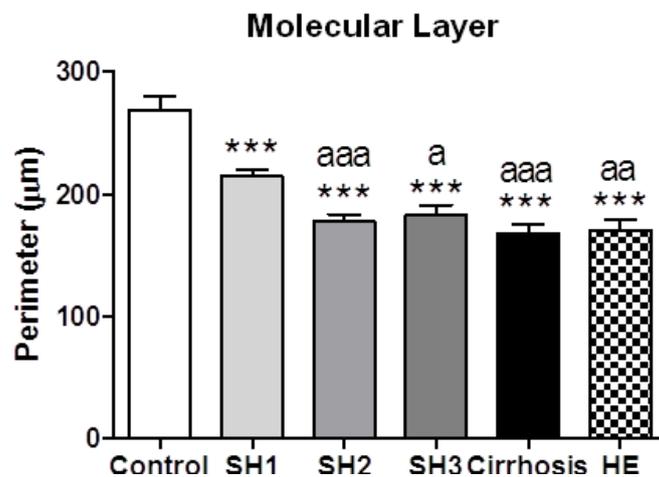


**Figura 56.** La activación de la microglía en la sustancia blanca comienza en el grado SH2 de esteatohepatitis, reflejándose en una disminución del perímetro. Los valores son la media  $\pm$  SEM de 4-9 sujetos por cada grupo. Los asteriscos indican diferencia significativa respecto al grupo control \* $p < 0,05$ , \*\*\* $p < 0,001$  y “a” respecto al grupo SH1 “aa”  $p < 0,01$ , “aaa”  $p < 0,001$ .

En la capa molecular, la activación microglial ocurre antes (Figura 57 y 58). Los pacientes con SH1 muestran microglía activada con un perímetro disminuido ( $214 \pm 6 \mu\text{m}$ ,  $p < 0,001$ ) con respecto a los sujetos control ( $259 \pm 12 \mu\text{m}$ ). El grado de activación aumentó en los otros dos subgrupos de pacientes con esteatohepatitis (SH2 =  $178 \pm 6 \mu\text{m}$  y SH3 =  $183 \pm 8 \mu\text{m}$ ,  $p < 0,001$ ), cirrosis hepática ( $167 \pm 7 \mu\text{m}$ ;  $p < 0,001$ ) y HE ( $170 \pm 9 \mu\text{m}$ ;  $p < 0,001$ ).

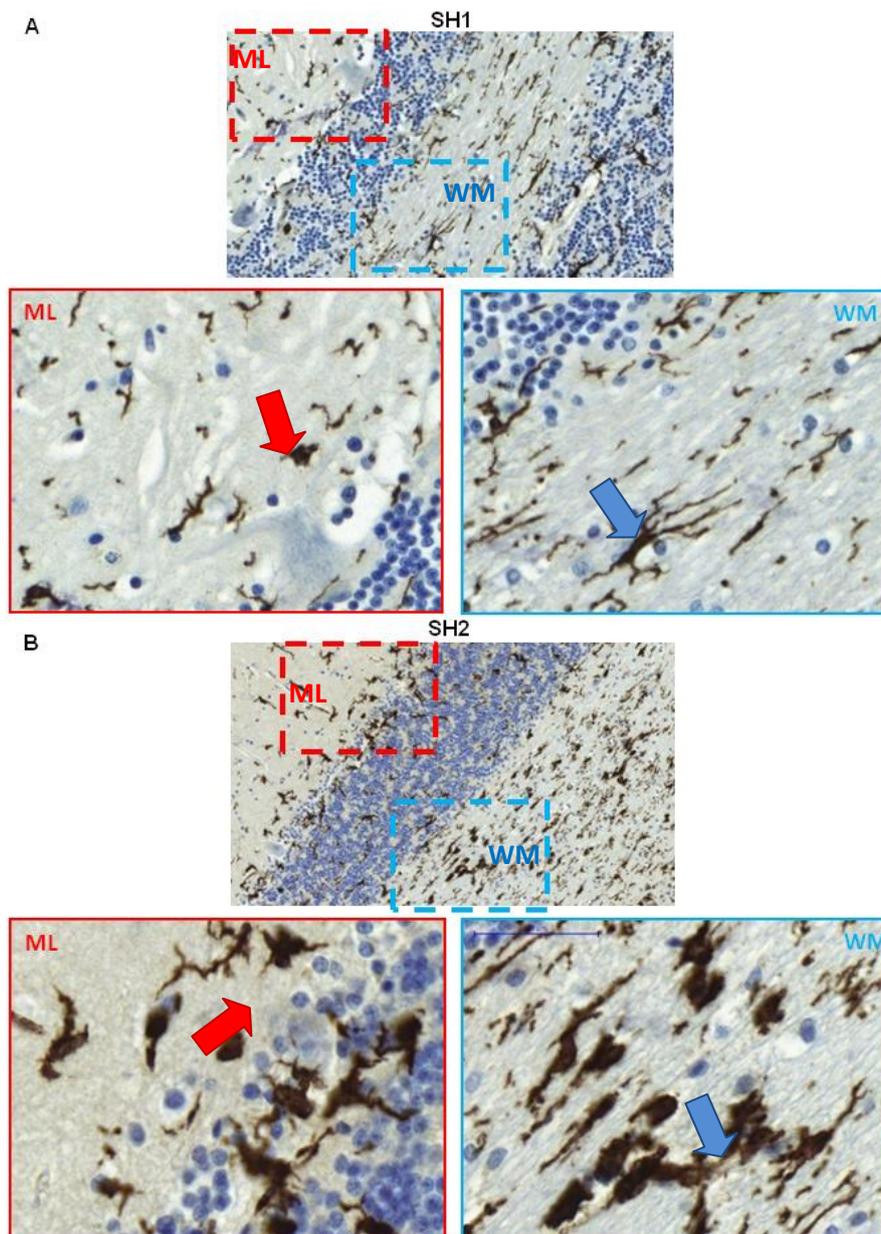


**Figura 57.** Imágenes representativas de la inmunohistoquímica de IBA1 en capa molecular mostrando activación de microglía ya en pacientes con SH1.



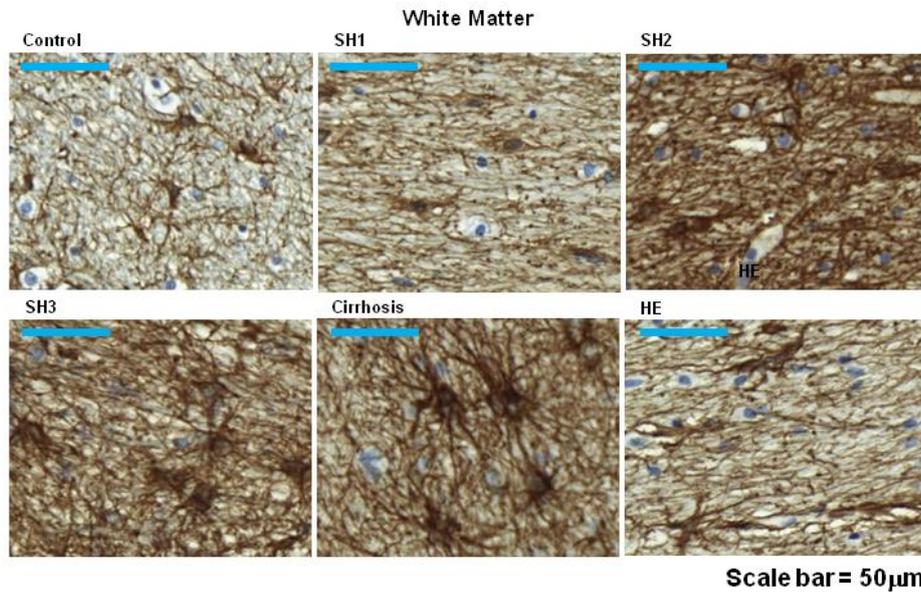
**Figura 58.** El análisis del perímetro muestra activación de la microglía en la capa molecular del cerebelo desde el primer estadio de esteatohepatitis (SH1). Los valores son la media  $\pm$  SEM de 4-9 sujetos por cada grupo. Los asteriscos indican diferencia significativa respecto al grupo control \*\*\* $p$ <0.001 y “a” respecto al grupo SH1 “a” $p$ <0,05, “aa”  $p$ <0,01, “aaa”  $p$ <0,001.

Las figuras 59A y B son dos imágenes representativas que muestran la progresión de la activación de microglía en cerebelo de pacientes en dos estadios diferentes de esteatohepatitis. La figura 59A muestra un corte cerebellar de un paciente con SH1 teñido con IBA1: la sustancia blanca (WM) presenta predominantemente microglía en reposo (flecha azul) mientras que la capa molecular (ML) presenta principalmente microglía activada (flecha roja). En cambio, en la Figura 59B que muestra un corte cerebellar de un paciente con SH2, ambas capas presentan microglía activada (ML, flecha roja y WM, flecha azul).



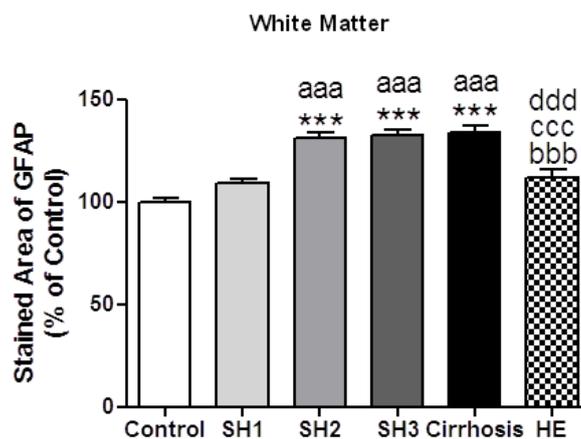
**Figura 59.** Las figuras A y B muestran imágenes representativas de la progresión de la activación de microglía en sustancia blanca (WM) y capa molecular (ML) en pacientes con SH1 y SH2, respectivamente.

De forma similar a la activación microglial, la activación de astrocitos en sustancia blanca comienza solo en el segundo grado de esteatohepatitis (Figuras 60 y 61).



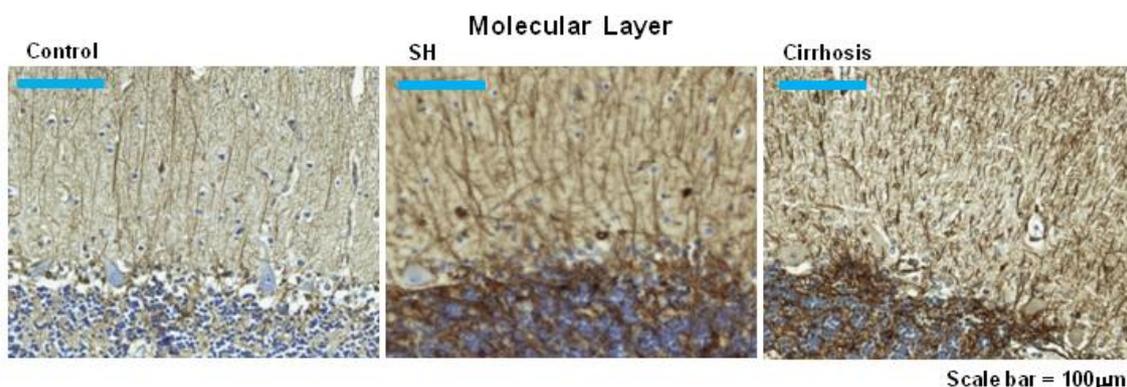
**Figura 60.** Imágenes representativas (x56) de la inmunohistoquímica de GFAP en sustancia blanca, mostrando activación de astrocitos a partir de SH2

Este grupo SH2 muestra un mayor porcentaje de área teñida con GFAP ( $132 \pm 2\%$ ,  $p < 0,005$ ) que los sujetos control ( $100 \pm 2\%$ ). Se observó un grado similar de activación en los pacientes con SH3 ( $133 \pm 2\%$ ,  $p < 0,005$ ) y cirróticos ( $134 \pm 3\%$ ,  $p < 0,005$ ). No se observó activación de astrocitos en el subgrupo SH1 ni en los pacientes cirróticos con encefalopatía hepática diagnosticada mostrando el  $109 \pm 2\%$  y  $112 \pm 4\%$  del área cubierta por GFAP en comparación con los sujetos control.



**Figura 61.** El área teñida por GFAP está aumentada en sustancia blanca de pacientes con SH2, SH3 y cirrosis. Los valores son la media  $\pm$  SEM de 4-9 sujetos por cada grupo. Los asteriscos indican diferencia significativa respecto al grupo control \*\*\* $p < 0,001$ , “a” respecto al grupo SH1 “aaa”  $p < 0,001$ , “b” respecto al grupo SH2 “bbb”  $p < 0,001$ , “c” respecto al grupo SH3 “ccc”  $p < 0,001$  y “d” respecto al grupo de pacientes con cirrosis “ddd”  $p < 0,001$ .

También se analizó la glía de Bergmann, un subtipo de astrocitos cerebelosos que residen en la capa molecular junto a las neuronas de Purkinje (Figura 62). Cuando se tiñen con GFAP, las fibras de la glía de Bergmann presentan una morfología desorganizada e hipertrofiada en todos los grupos de esteatohepatitis y en pacientes con cirrosis hepática y encefalopatía hepática en comparación con los controles, que muestran una morfología más fina e intacta.



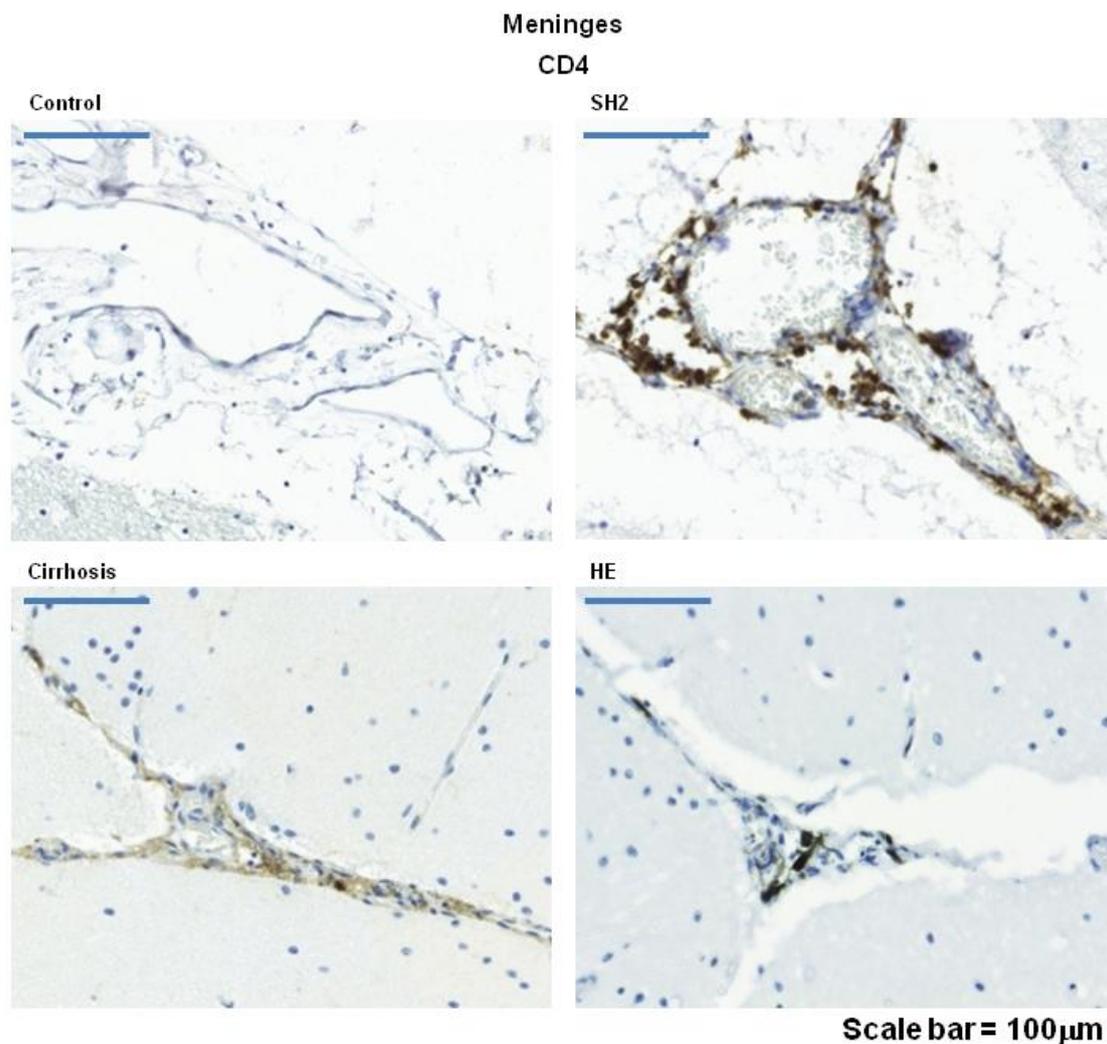
**Figura 62.** Imágenes representativas de la inmunohistoquímica de GFAP en capa molecular mostrando degeneración de las fibras de la glía de Bergmann en pacientes con esteatohepatitis y cirrosis.

#### **4.7.3. Los pacientes con esteatohepatitis presentan infiltración de linfocitos T pero no de linfocitos B.**

Para estudiar como el fallo hepático estaría induciendo la neuroinflamación y la consecuente pérdida neuronal en cerebelo, analizamos si existe infiltración de células inmunes periféricas en cerebelo.

El análisis de la infiltración de células inmunes periféricas muestra la presencia masiva de células CD4+ (Figura 63) pero no de células CD20+ (Figura 65B) en el espacio meníngeo de cerebelo de pacientes con diferentes estadios de esteatohepatitis.

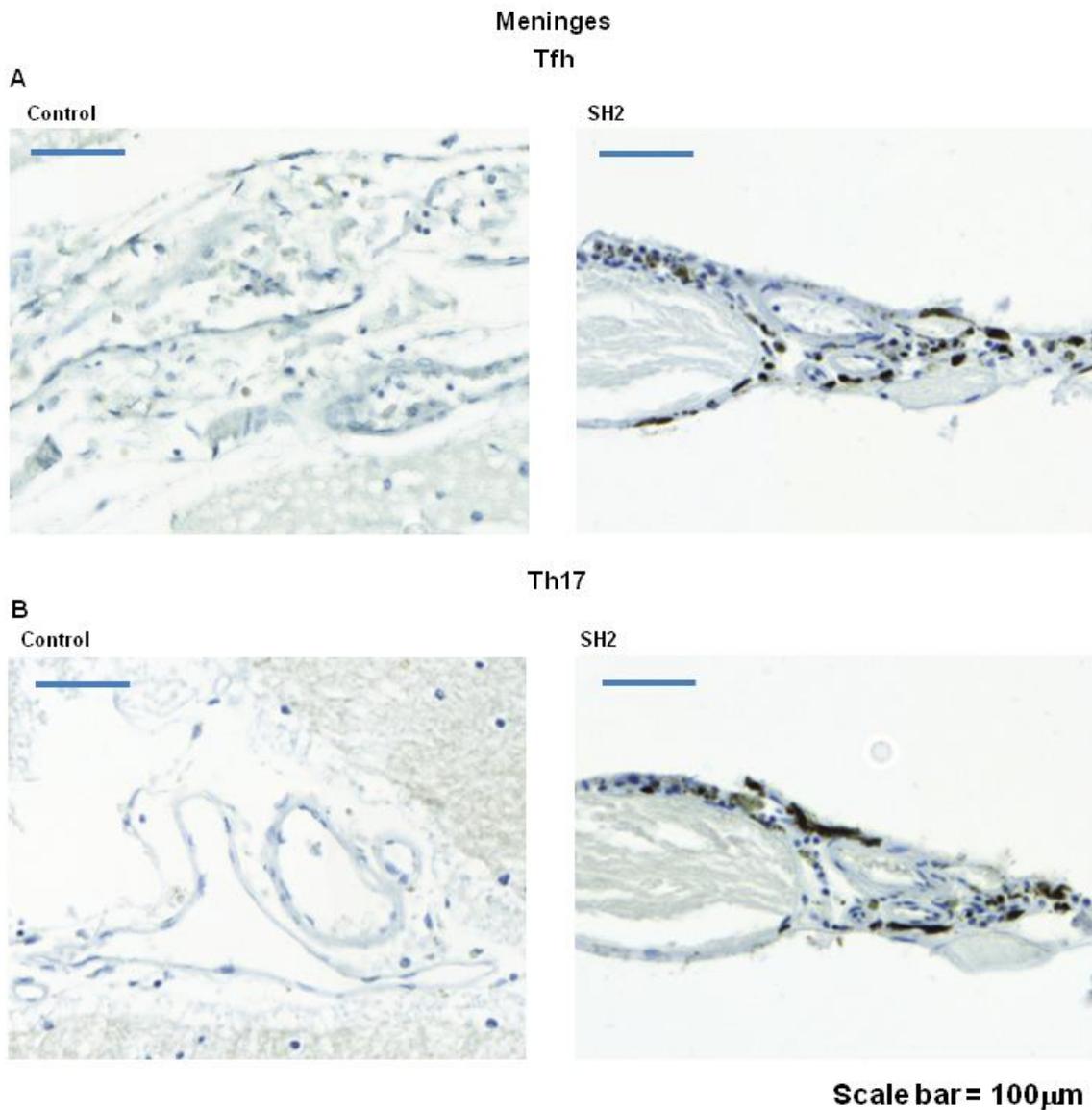
Los pacientes con SH1 ya muestran una infiltración significativa de linfocitos T CD4+ ( $10 \pm 1$  células / mm,  $p < 0,001$ ) en comparación con los sujetos control que sólo muestran  $1 \pm 1$  célula / mm de longitud de meninges. La infiltración de linfocitos T CD4+ aumentó en pacientes con SH2 mostrando  $12 \pm 3$  células / mm de meninges ( $p < 0,001$ ). Se observaron niveles más bajos pero significativos de linfocitos CD4+ infiltrados comparados con sujetos control en pacientes con SH3 ( $9 \pm 1$  células / mm de meninges;  $p < 0,05$ ). El número de linfocitos CD4+ infiltrados disminuyó en pacientes cirróticos y con encefalopatía hepática, mostrando  $5 \pm 1$  células / mm y  $6 \pm 1$  células / mm respectivamente. (Figura 64)



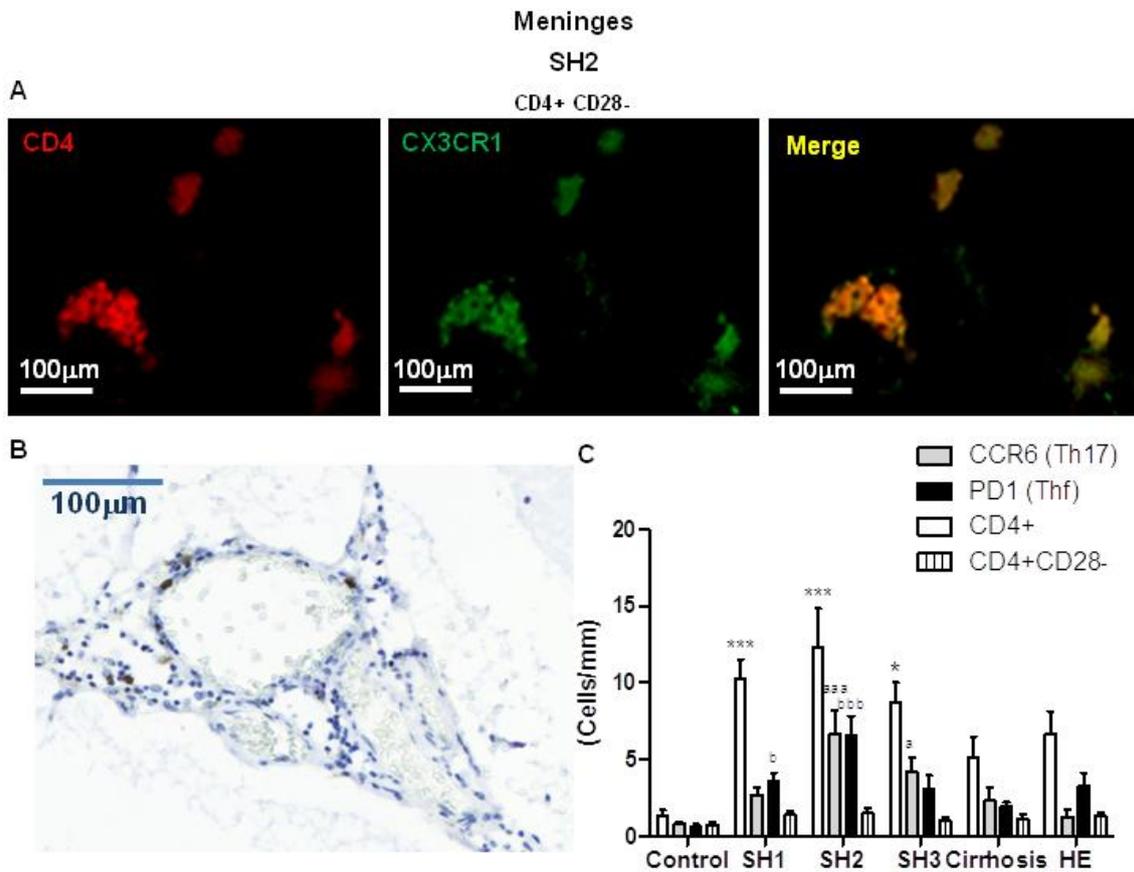
**Figura 63.** Imágenes representativas de la infiltración de linfocitos T en meninges teñidos con CD4.

Para investigar que subtipos de linfocitos T se están infiltrando en las meninges de cerebelo de estos pacientes, se analizó la infiltración de tres subtipos de linfocitos T CD4+: T helper foliculares (Tfh) (Figura 64A), T helper 17 (Th17) (figura 64B) y CD4+CD28- (Figura 65A). La cuantificación muestra que estos dos últimos subtipos son los más abundantes en el área de infiltración (Figura 64C). En pacientes con SH1,  $3 \pm 1$  células/mm son Th17 y  $4 \pm 1$  células/mm son Tfh, un número significativamente mayor que en los sujetos control ( $1 \pm 0$ ;  $p < 0,05$ ). En SH2 el número de Th17 y Tfh infiltrados aumentó respecto a los controles ( $p < 0,001$ ):  $7 \pm 2$  células/mm son Th17 (Control =  $1 \pm 1$  células/mm) y  $7 \pm 1$  son Tfh (Control =  $1 \pm 1$  células/mm). En SH3, las células Th17 representan la mitad del total de células infiltradas ( $4 \pm 1$  células/mm;  $p < 0,05$ ), mientras que el contenido de células Tfh es ligeramente menor ( $3 \pm 1$  células/mm) y no llega a ser significativamente diferente de los sujetos control. En

pacientes con cirrosis y HE el número de linfocitos Th17 ( $3 \pm 1$  y  $1 \pm 1$  células/mm, respectivamente) y Thf ( $2 \pm 1$  y  $3 \pm 1$  células/mm, respectivamente) no llega a ser significativamente distinto de los sujetos control ( $1 \pm 1$  células/mm en ambos casos).



**Figura 64.** Imágenes representativas de la infiltración en meninges de linfocitos Tfh teñidos con PD1 (A) y Th17 teñidos con CCR6 (B) en un paciente con SH2.



**Figura 65.** (A) Imágenes representativas de la doble inmunofluorescencia (CD4 en rojo y CX3CR1 en verde) mostrando infiltración en meninges de linfocitos CD4+CD28- (Merge, en amarillo). No se observa infiltración de linfocitos B teñidos con CD20 en meninges de cerebelo de pacientes con distintos grados de enfermedad hepática (B). (C) Cuantificación del contenido de linfocitos T (CD4<sup>+</sup>) y de cada subtipo en meninges de pacientes con distintos grados de enfermedad hepática mostrando una mayor infiltración de los subtipos Thf y Th17 durante la esteatohepatitis. Los valores son la media  $\pm$  SEM de 4-9 sujetos por cada grupo. Los asteriscos indican diferencia significativa del contenido de linfocitos T teñidos con CD4 respecto al grupo control \* $p < 0,05$ , \*\*\* $p < 0,001$ , “a” la diferencia significativa del contenido de linfocitos Th17 teñidos con CCR6 respecto al grupo control “a”  $p < 0,05$ , “aaa”  $p < 0,001$  y “b” la diferencia significativa del contenido de linfocitos Thf teñidos con PD1 respecto al grupo control “b”  $p < 0,05$ , “bbb”  $p < 0,001$ .

## 5. DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en ratas con encefalopatía hepática por anastomosis porta-cava (PCS) proporcionan avances relevantes en el conocimiento de los mecanismos que conducen a las alteraciones neurológicas:

(1) la inflamación periférica juega un papel esencial en el deterioro de la coordinación motora, de la capacidad de aprender la tarea en el laberinto en Y y del aprendizaje y de la memoria espacial.

(2) se puede prevenir el deterioro cognitivo y motor reduciendo la inflamación periférica.

(3) la neuroinflamación altera la neurotransmisión en cerebelo de las ratas PCS aumentando la expresión en membrana del transportador GABA GAT-3 y el GABA extracelular.

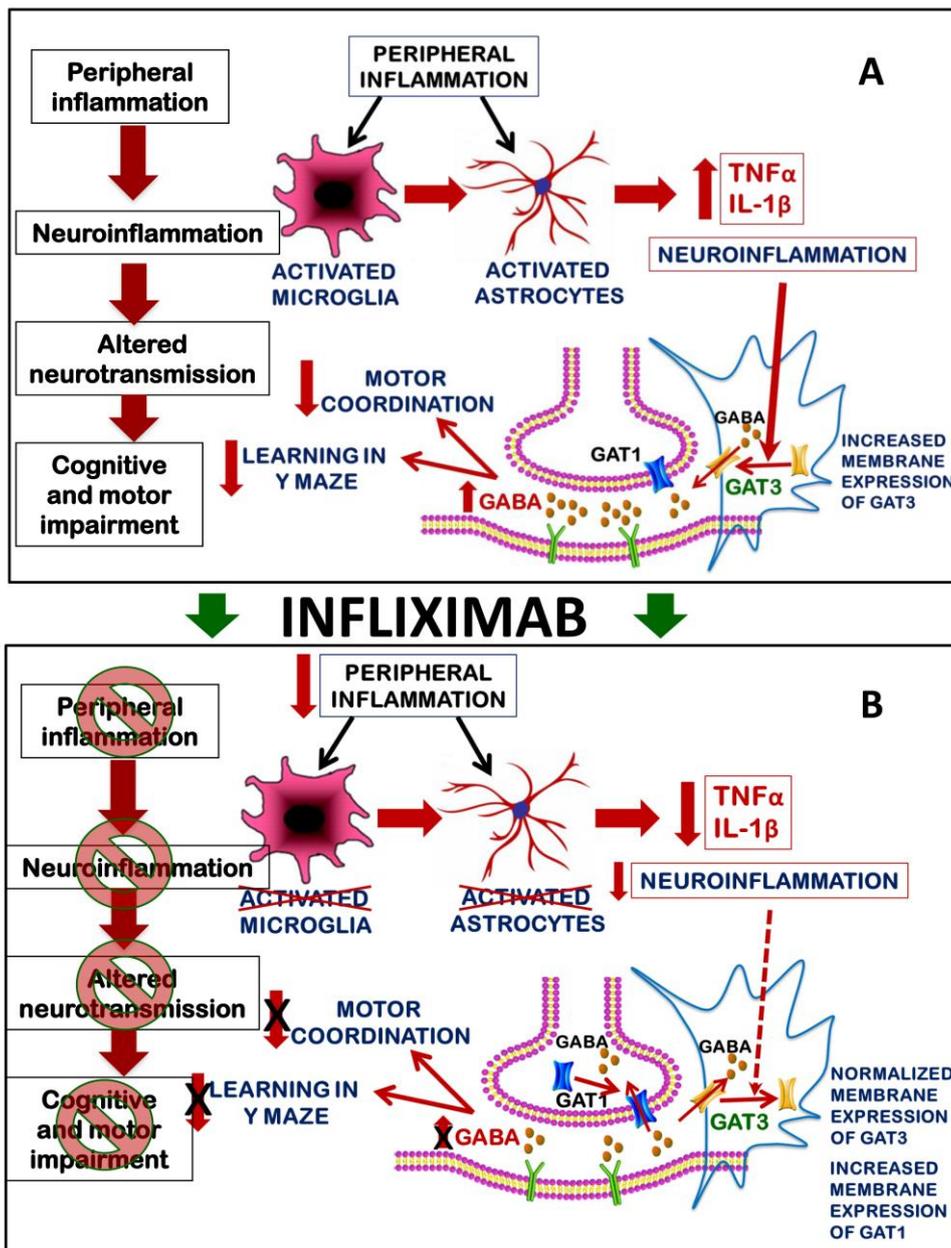
(4) en hipocampo la neuroinflamación altera la neurotransmisión alterando la expresión de membrana de los receptores AMPA y NMDA.

En base a los resultados obtenidos proponemos en las Figuras 66 y 67 dos modelos, uno para cerebelo y otro para hipocampo, con los mecanismos propuestos para el deterioro cognitivo y motor en ratas con EH y para su mejoría por el tratamiento con infliximab.

En ratas PCS, el fallo hepático inducido quirúrgicamente por anastomosis porta-cava conduce a inflamación periférica. Esto se refleja en aumentos de la IL-6, IL-17, PGE2 proinflamatoria y en una disminución de la IL-10 antiinflamatoria en suero.

En el cerebelo, la inflamación periférica conduce a neuroinflamación, que altera la neurotransmisión GABAérgica, causando el deterioro de la coordinación motora y la capacidad de aprender la tarea del laberinto Y. Encontramos una elevada activación de astrocitos y microglía en sustancia blanca, como ocurre en otras situaciones patológicas como la ataxia espinocerebelosa tipo 1, en las que la disfunción neuronal, en ausencia de neurodegeneración, induce activación glial. (Cvetanovic et al., 2015). Junto con la activación de astrocitos y microglía observamos en la sustancia blanca un aumento de los niveles de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ . También encontramos daño en las fibras radiales de la glía de Bergmann, un tipo especializado de astrocitos que se encuentran en la capa molecular y rodeando los somas en la capa de Purkinje. El daño en la glia de Bergmann puede contribuir a alterar la función neuronal y la neurotransmisión GABAérgica y la coordinación motora.

La reducción de la inflamación periférica con infliximab conduce a la reducción de la activación de microglía y astrocitos y de los niveles de  $TNF-\alpha$  e  $IL-1\beta$  en cerebelo. La reducción de la neuroinflamación inducida por infliximab se asocia con la normalización de la neurotransmisión GABAérgica, el GABA extracelular, la coordinación motora y la capacidad de aprender la tarea del laberinto Y, cuya modulación depende principalmente de cerebelo. Esto sugiere que la inflamación periférica es un contribuyente esencial del deterioro de la coordinación motora y de la capacidad de aprender la tarea del laberinto en Y en ratas PCS.



**Figura 66.** Modelo propuesto para los posibles mecanismos en cerebelo implicados en el deterioro cognitivo observado en el Y maze y de la coordinación motora de ratas con EH (A) y en su mejoría tras el tratamiento con infliximab (B). Los detalles se comentan en el texto.

Otra contribución relevante de este trabajo es que también identificamos por primera vez mecanismos moleculares por los que la neuroinflamación altera la neurotransmisión GABAérgica en el cerebelo de ratas PCS in vivo y cómo el tratamiento con infliximab la restaura. Se muestra que, en ratas con EH, la cantidad y la expresión de la membrana del transportador GAT3 de GABA aumenta en astrocitos activados. En condiciones normales, GAT-3 transporta GABA desde el espacio extracelular al interior de los astrocitos. Sin embargo, en condiciones patológicas, este transporte se invierte y GAT-3 libera GABA de los astrocitos al fluido extracelular. Wu et al. (2014) utilizando un modelo de ratón de la enfermedad de Alzheimer, demostraron que en hipocampo los astrocitos activados liberan GABA a través de GAT-3. El bloqueo de GAT-3 redujo la concentración extracelular de GABA y, en consecuencia las corrientes de  $Cl^-$  a través de receptores GABA, mientras que bloqueando GAT-1 aumentaron el GABA extracelular y las corrientes de  $Cl^-$ , demostrando que en condiciones patológicas, GAT-3 está liberando GABA mientras que GAT-1 está internalizando GABA (Wu et al., 2014). Una liberación similar de GABA mediada por GAT-3 ocurriría en astrocitos activados en el cerebelo de ratas con EH y probablemente también en otras situaciones patológicas asociadas con neuroinflamación en cerebelo. Ya se ha demostrado que un mayor tono GABAérgico (activación de receptores  $GABA_A$ ) en cerebelo reduce la coordinación motora (Hanchar et al., 2005). Además, los ratones que carecen del transportador de GABA GAT1 muestran un aumento de GABA extracelular y una reducción de la coordinación motora (Chiu et al., 2005). Por otra parte, las ratas expuestas durante el desarrollo a bifenilos policlorados muestran incoordinación motora que se correlaciona con los niveles extracelulares de GABA en cerebelo (Boix et al., 2010). El aumento de GABA extracelular en cerebelo inducido por la neuroinflamación sería por tanto responsable de la incoordinación motora en ratas PCS con EH. La restauración de la coordinación motora en ratas PCS por infliximab se debería a la normalización de los niveles extracelulares de GABA: el infliximab previene la activación de los astrocitos y el aumento del contenido total y en membrana de GAT3. Además la desactivación de los astrocitos por el tratamiento con infliximab normaliza la función de GAT3, que ya no liberaría GABA al medio sino que lo recaptaría. Todo esto se traduce en la disminución de los niveles de GABA extracelular y la normalización de la coordinación motora

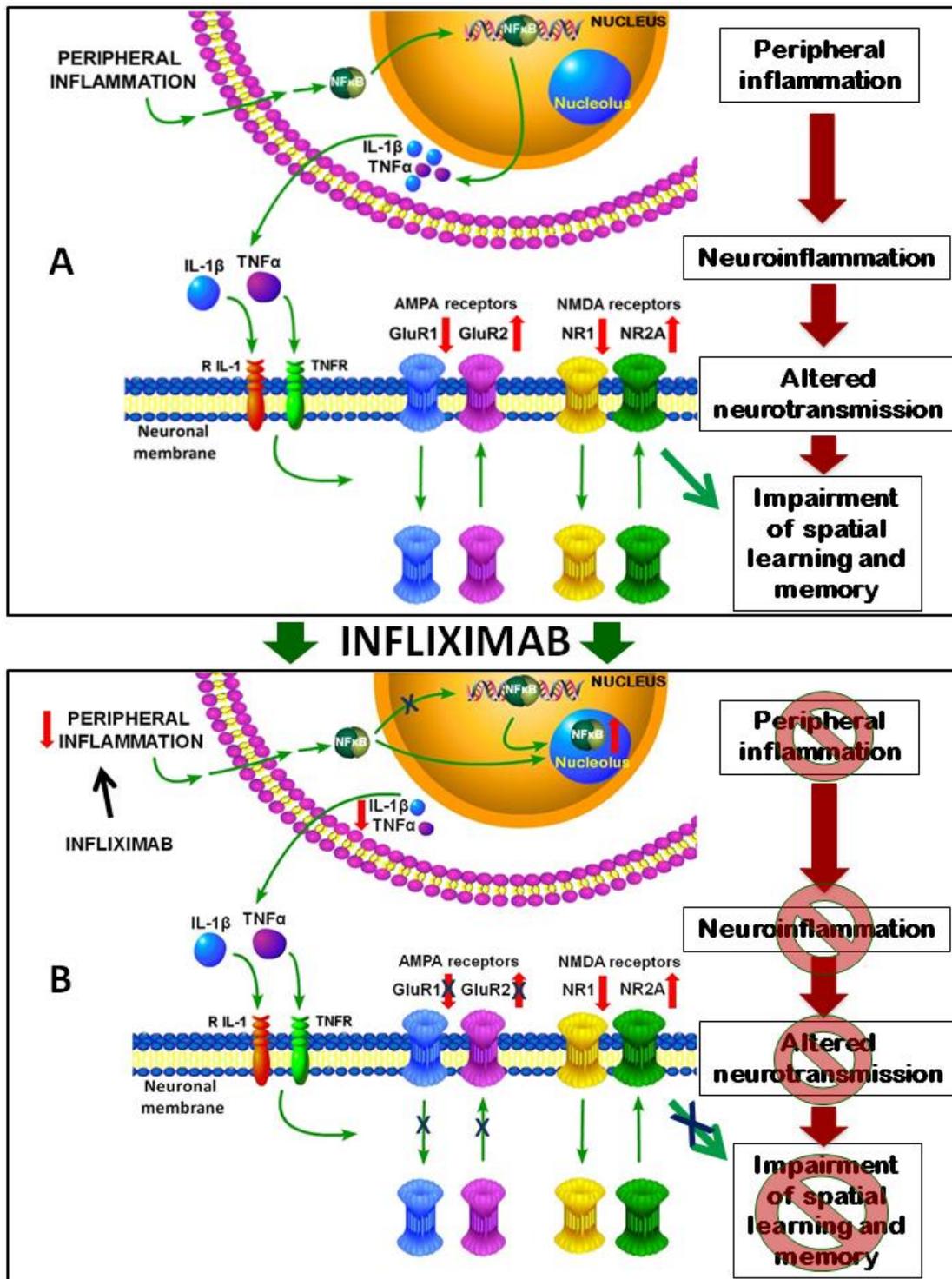
El aumento de GABA extracelular en cerebelo también sería responsable de la disminución de la función de la vía glutamato-NO-cGMP que, a su vez, se traduciría en

la disminución de la capacidad para aprender la tarea en el laberinto en Y. Nuestro grupo ha demostrado tanto en ratas PCS como en ratas hiperamonémicas, que la reducción de la función de la vía glutamato-NO-cGMP es responsable de la disminución del aprendizaje en el laberinto en Y (Erceg et al., 2005a,b, Cauli et al., 2007, Llansola et al., 2009). Además, la reducción de la activación de los receptores GABAA con bicuculina, sulfato de pregnenolona o GR3027 reduce el tono GABAérgico y restaura la función de la vía glutamato-NO-cGMP y la capacidad de aprender la tarea del laberinto en Y (Cauli et al., 2009a; Gonzalez-Usano et al., 2014; Johansson et al., 2015). Por lo tanto, la normalización del GABA extracelular en el cerebelo de ratas PCS por infliximab sería responsable de la normalización de la función de la vía glutamato-NO-GMPc y del aprendizaje en el laberinto Y.

Las ratas PCS también muestran neuroinflamación y alteración de la neurotransmisión en hipocampo y deterioro del aprendizaje y de la memoria espacial. La inflamación periférica induce un aumento del contenido de TNF-a e IL-1b que activan sus receptores en neuronas y alteran la expresión en membrana de las subunidades de los receptores AMPA y NMDA, resultando en una alteración de la neurotransmisión y del aprendizaje y memoria espacial.

Los resultados obtenidos muestran que reduciendo la inflamación periférica con infliximab, se previene la neuroinflamación y se restaura la expresión en membrana de los receptores AMPA y NMDA y el aprendizaje y la memoria espacial en ratas PCS. Los datos obtenidos apoyan que la inflamación periférica en ratas con EH sería la principal causa de la inducción de la neuroinflamación en hipocampo y del deterioro del aprendizaje espacial en ratas PCS.

La inflamación periférica induce en ratas PCS una disminución de los niveles de I $\kappa$ B en hipocampo y un aumento del contenido de NF- $\kappa$ B en el núcleo de las neuronas. NF- $\kappa$ B induce la transcripción de los factores proinflamatorios TNF-a e IL-1b que contribuyen al deterioro del aprendizaje espacial (Figura 67A). Una activación similar de NF- $\kappa$ B se ha observado en hipocampo de ovinos tras inducir inflamación periférica con LPS (Hang et al., 2004, Briscoe et al., 2006) y en la corteza de ratas con lesión cerebral traumática, que también se asoció con un aumento del TNF-a (Hang et al., 2004). Esto indica que la activación de NF- $\kappa$ B en hipocampo parece ser una respuesta habitual a la inflamación periférica. Por tanto es posible que los mecanismos identificados en esta tesis, al menos en hipocampo, sean extrapolables a otras patologías que cursan con inflamación periférica crónica



**Figura 67.** Modelo propuesto para los posibles mecanismos en hipocampo implicados en el deterioro del aprendizaje y de la memoria espacial de ratas con EH (A) y su mejoría tras el tratamiento con infliximab (B). Los detalles se comentan en el texto.

Hay que resaltar que la expresión del ARNm de TNF-a aumenta en ratas PCS principalmente en neuronas, como se demuestra por hibridación in situ. TNF-a e IL-1b

se pueden expresar en neuronas del hipocampo in vivo en respuesta a lesiones (Tchélingérian et al., 1996) o a meningitis neumocócica (Izadpanah et al., 2014). Los estudios de hibridación in situ demuestran que en la meningitis neumocócica murina el ARNm de TNF-a se induce inicialmente en células astrogliales, pero a las 18-24 h se induce su transcripción en neuronas de hipocampo (Izadpanah et al., 2014). Un proceso similar ocurriría en hipocampo de ratas PCS, lo que conduciría a una mayor expresión de TNF-a en neuronas.

El mecanismo mediante el cual la neuroinflamación altera la neurotransmisión en el hipocampo de ratas con EH implicaría la activación de los receptores de TNF-a e IL-1b en neuronas, conduciendo a una translocación de las subunidades de los receptores AMPA y NMDA y a la alteración de la expresión en membrana de sus subunidades. Comprobamos que en ratas PCS la expresión en membrana de la subunidad GluR1 de los receptores AMPA disminuye mientras que la de GluR2 aumenta. Para los receptores NMDA, NR1 disminuye y NR2A aumenta en membrana de las ratas PCS. Esto sería una consecuencia del aumento de IL-1b y TNF-a ya que estos cambios en la expresión de membrana se revierten cuando el contenido de estas citocinas pro-inflamatorias se normaliza por el tratamiento con infliximab. Esto está de acuerdo con un estudio de Lai et al. (2006) que muestra que la IL-1b reduce la expresión en membrana de la subunidad GluR1 de los receptores AMPA en las neuronas del hipocampo (Lai et al., 2006). El TNF-a también altera la expresión en membrana de los receptores AMPA en hipocampo (Ogoshi et al., 2005).

Los receptores NMDA y AMPA modulan la potenciación a largo plazo (LTP) en hipocampo, considerada la base molecular del aprendizaje y la memoria espacial (Morris y Frey, 1997). La LTP está alterada en ratas PCS (Monfort et al., 2007). Los datos mostrados aquí sugieren que la alteración de la expresión en membrana de las subunidades del receptor AMPA y NMDA jugaría un papel importante en el deterioro de la LTP en ratas PCS, lo que a su vez conduciría a un deterioro del aprendizaje espacial. La activación de los receptores de AMPA aumenta el  $\text{Na}^+$  intracelular y, cuando la subunidad GluR2 está ausente, también aumenta el  $\text{Ca}^{2+}$ . La presencia de la subunidad GluR2 evita la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  (Geiger et al., 1995; Liu y Cull-Candy, 2005). En las ratas PCS, el aumento de GluR2 y la disminución de las subunidades GluR1 en membrana reducirá la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de los receptores AMPA, resultando en una alteración de la señalización intracelular y de la neurotransmisión, del aprendizaje espacial y de la memoria. La subunidad GluR1 es esencial para el aprendizaje espacial

(Sanderson et al., 2008, 2010), por lo que la alteración de la expresión en membrana de GluR1 y GluR2 serían los principales contribuyentes al deterioro del aprendizaje espacial en ratas PCS (Figura 67A).

El tratamiento con infliximab reduce la inflamación periférica en ratas PCS y la expresión nuclear de la subunidad p50 de NF- $\kappa$ B, induciendo su translocación al nucléolo, lo que le impide activar la transcripción génica, incluida la de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ . Stark y Dunlop (2005) demostraron que la compartimentación sub-nuclear regula la actividad transcripcional de NF- $\kappa$ B en líneas celulares de cáncer. Los tratamientos pro-apoptóticos translocan la subunidad p65 de NF- $\kappa$ B al nucléolo, reduciendo sus niveles en el núcleo y disminuyendo la actividad transcripcional de NF- $\kappa$ B. En contraste, los tratamientos anti-apoptóticos como el TNF- $\alpha$  excluyen la subunidad p65 del nucleolo (Stark y Dunlop, 2005). En este estudio no se analizaron los efectos sobre la subunidad p50 de NF- $\kappa$ B. En las ratas PCS, la p50 disminuye en nucléolos y aumenta en el núcleo, lo que permite una mayor transcripción de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ . El tratamiento con infliximab previene la translocación de p50 del nucléolo al núcleo, reduciendo su contenido en el núcleo, lo que reduce la transcripción de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ . Esto reduce la activación de sus receptores en neuronas y normaliza la expresión en membrana de los receptores AMPA. La normalización de la neurotransmisión conduce a la recuperación del aprendizaje y la memoria espacial (Figura 67B).

En resumen, mostramos que en ratas PCS con HE, la inflamación periférica conduce a neuroinflamación en hipocampo, con un aumento del NF- $\kappa$ B nuclear y de la expresión de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , lo que conduce a una neurotransmisión alterada debido a la alteración de la expresión en membrana de los receptores AMPA y NMDA, lo que deteriora el aprendizaje espacial y la memoria. Reduciendo específicamente la inflamación periférica, utilizando anti-TNF- $\alpha$ , que no atraviesa la barrera hematoencefálica, se reduce la neuroinflamación, se transloca NF- $\kappa$ B a los nucleolos, se normalizan TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  y la expresión en membrana de los receptores AMPA y el aprendizaje y la memoria espacial.

Todos estos datos, tanto en cerebelo como hipocampo, apoyan que el deterioro cognitivo y motor en ratas con EH es consecuencia de la inflamación periférica y que el tratamiento con anti-TNF- $\alpha$  podría ser un nuevo enfoque terapéutico para mejorar la función cognitiva en pacientes con EMH o EH clínica. El tratamiento con infliximab, además no reduce los niveles de amonio. La falta de efecto sobre los niveles de amonio

indica que los efectos beneficiosos del infliximab en ratas PCS no se deben a una recuperación de la función hepática.

Los anti-TNF- $\alpha$  ya están siendo utilizados en la práctica clínica para reducir la inflamación periférica en el tratamiento de enfermedades inflamatorias crónicas. Se ha observado que este tratamiento mejora la función cognitiva en pacientes con artritis reumatoide o sarcoidosis (Raftery et al., 2012; Elfferich et al., 2010) y también en pacientes con enfermedad de Alzheimer (Tobinick et al., 2008; Cheng et al., 2014). Sin embargo, debe tenerse en cuenta que un posible problema del tratamiento con anti-TNF- $\alpha$  en algunos pacientes es que puede inducir lesión hepática (Parekh et al., 2014; Ghabril et al., 2013). En cualquier caso, los resultados aquí presentados proporcionan evidencias experimentales de que la inflamación periférica es un contribuyente esencial a la neuroinflamación en ratas PCS con HE y apoyan que la reducción de la inflamación mediante procedimientos seguros reduciría la neuroinflamación y mejoraría la función cognitiva y motora en pacientes cirróticos con EHM. Los resultados también muestran que la neuroinflamación y las alteraciones neurológicas asociadas son reversibles al menos en las primeras etapas de la EHM. No está claro si los efectos también serían reversibles después de largos períodos de neuroinflamación. Una neuroinflamación más sostenida puede desencadenar una serie de cambios en el cerebro que pueden conducir a alteraciones estructurales e incluso en los peores casos, a degeneración neuronal, lo que puede hacer que algunas de las alteraciones sean irreversibles. Sin embargo, teniendo en cuenta que la mayoría de las alteraciones neurológicas en los pacientes con cirrosis hepática y HE son reversibles tras el trasplante hepático (Atluri et al., 2010), sería de esperar que el tratamiento con anti-TNF- $\alpha$  también pueda restaurar la mayoría de estas alteraciones neurológicas.

Cada vez hay más evidencias de que muchas enfermedades crónicas y otras situaciones asociadas con la inflamación crónica (por ejemplo, cirugías severas) dan como resultado un deterioro cognitivo leve. Como se propone en las Figuras 66 y 67, el proceso por el cual la inflamación periférica conduce a estas alteraciones neurológicas implicaría la inducción de neuroinflamación en diferentes áreas del cerebro. La neuroinflamación induciría alteraciones en la neurotransmisión que serían responsables de las alteraciones cognitivas y motoras.

Existen varios mecanismos por los cuales la inflamación periférica puede ser transmitida al cerebro para inducir neuroinflamación. Las citocinas son péptidos

grandes que no atraviesan fácilmente la barrera hematoencefálica (Quan, 2008). Sin embargo, una vía de transmisión conocida es a través del transporte activo de ciertas citocinas permitiendo su entrada en el parénquima cerebral (Banks et al., 1995). Además, las citocinas en sangre pueden activar sus receptores en células endoteliales y desencadenar la liberación de factores inflamatorios en el cerebro. Por ejemplo, en ratas en las que se induce inflamación periférica por inyección de LPS, la IL-6 de la sangre activa sus receptores en células endoteliales conduciendo a la activación de STAT3, lo que aumenta la ciclooxigenasa 2 y PGE2 (proinflamatorias) en la corteza cerebral (Rummel et al., 2006). También se ha descrito la señalización del sistema inmune al cerebro mediante la activación del nervio vago aferente así como la entrada directa de citocinas en regiones circumventriculares (por ejemplo, el organum vasculosum lateralis terminalis) debido a la falta de una barrera hematoencefálica intacta en estas áreas cerebrales (D'Mello et al., 2009). En los casos de inflamación más severa, la infiltración en cerebro de células inmunes de la periferia juega un papel importante en la inducción de neuroinflamación (Gimenez et al., 2006; Blazeovski et al., 2015; Wu et al., 2015).

En las ratas PCS no hemos encontrado infiltración de células del sistema inmune en cerebro. Hemos observado que, en las primeras fases después de la cirugía de PCS, la IL-1 $\beta$  en cerebro se acumula especialmente alrededor de los vasos sanguíneos, lo que sugiere que la activación de receptores de interleucinas en células endoteliales puede estar contribuyendo a la inducción de neuroinflamación.

La identificación de los mecanismos por los que la inflamación periférica induce neuroinflamación en HE permitiría identificar nuevas dianas terapéuticas para mejorar la función cognitiva y motora. Los datos de esta tesis, junto con resultados anteriores sobre la utilidad de anti-TNF- $\alpha$  para mejorar la función cognitiva en diferentes patologías sugieren que el anti TNF- $\alpha$  podría mejorarla también en pacientes con EH mínima ó clínica.

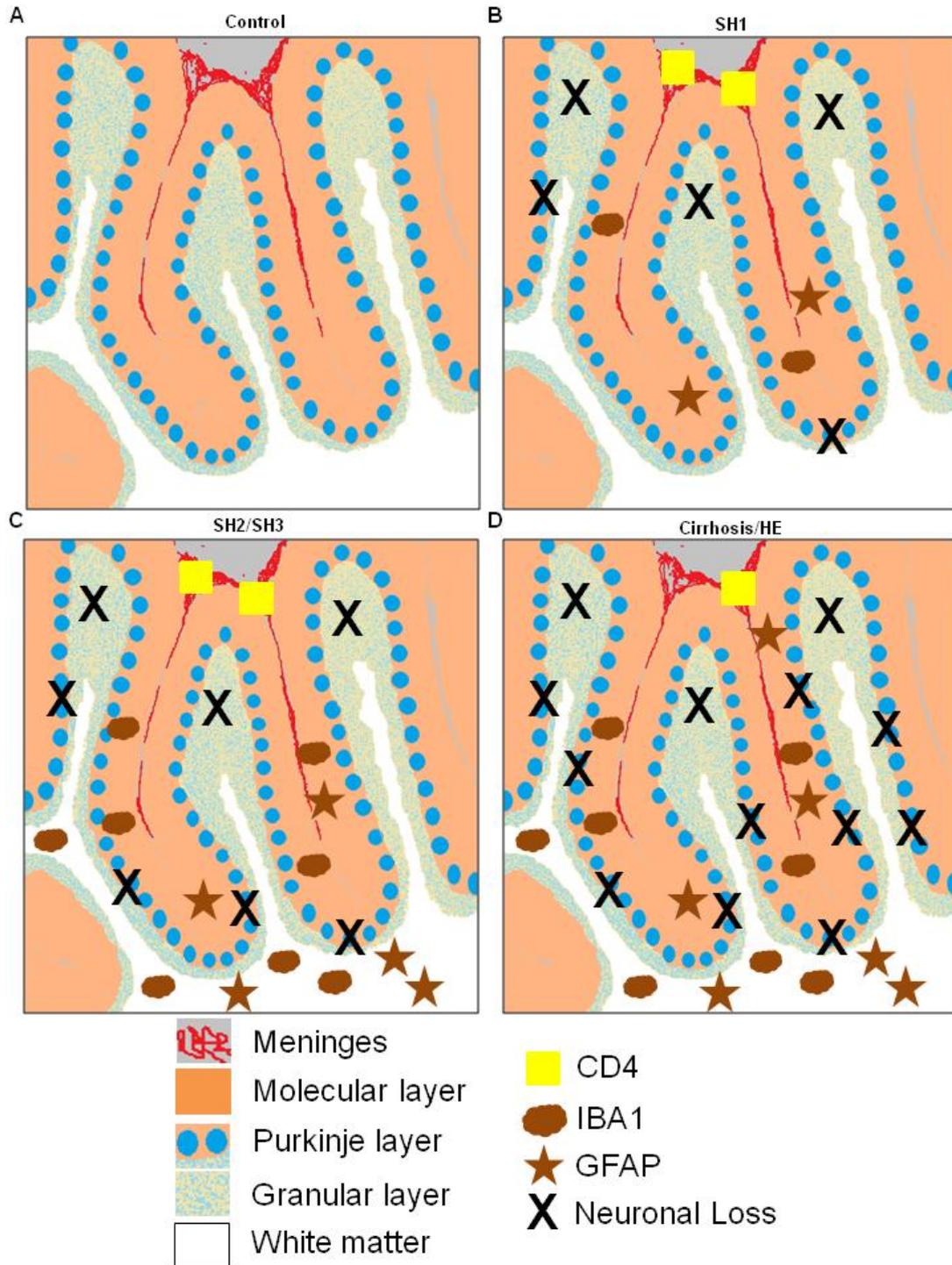
En este trabajo, el tratamiento con infliximab comenzó 2 días antes de la cirugía de anastomosis porta-cava. Esto se hizo para evaluar adecuadamente si la neuroinflamación es consecuencia de la inflamación periférica. Si el tratamiento con infliximab lo hubiéramos iniciado una vez que la inflamación ya está presente, es probable que el proceso que induce la neuroinflamación ya se hubiera iniciado y habría resultado difícil discernir la contribución de la inflamación periférica. Sin embargo, aunque el diseño experimental es el adecuado para proporcionar la prueba de concepto de que la neuroinflamación es consecuencia de la inflamación periférica, no es el más

apropiado para evaluar la utilidad terapéutica del infliximab para revertir las alteraciones cognitivas y motoras en pacientes o modelos de EHM. Esto requeriría que el tratamiento comience después de que las alteraciones cognitivas y motoras ya estén instauradas. Nuestro grupo ha demostrado recientemente que tratando las ratas PCS o hiperamonémicas con sulforafano, sildenafil o GMPc extracelular, tras la aparición del deterioro cognitivo, se reduce la neuroinflamación en hipocampo y cerebelo y se mejora el deterioro cognitivo y motor (Hernandez et al., 2015 y 2016a,b; Cabrera-Pastor et al., 2016), apoyando la posible utilidad terapéutica de estos tratamientos. Por otro lado, el tratamiento con compuestos anti-TNF- $\alpha$  mejora la función cognitiva en pacientes con artritis reumatoide o sarcoidosis (Raftery et al., 2012; Elfferich et al., 2010), lo que indica que también puede ser beneficioso si se administra después del establecimiento del deterioro cognitivo. Esto sugiere que el tratamiento con anti-TNF- $\alpha$  también podría ser beneficioso en pacientes con EHM o EH clínico.

Los resultados anteriores muestran que la neuroinflamación en hiperamonemia y EHM puede reducirse mediante diferentes tratamientos que actúan sobre diferentes dianas iniciales. Todos ellos mejoran la función cognitiva y motora en modelos animales. Otros estudios para evaluar qué tratamiento tiene menos efectos secundarios o efectos más beneficiosos o las posibles ventajas de utilizar una terapia de combinación pueden conducir a nuevos tratamientos prometedores para EHM y EH clínica.

Los resultados obtenidos en muestras post-mortem de cerebelo de humanos, muestran que pacientes con diferentes grados de enfermedad hepática presentan infiltración de linfocitos T en las meninges del cerebelo que se asocia con activación de microglía y astrocitos y pérdida de neuronas de Purkinje y granulares. Otro hallazgo importante de este estudio es que estas alteraciones ya están presentes en pacientes con esteatohepatitis, antes de alcanzar la cirrosis hepática. La secuencia de eventos en cerebelo durante la progresión de la enfermedad hepática se resume en la Figura 68. En la etapa SH1 de la esteatohepatitis (Figura 68B) hay una infiltración de linfocitos T (cuadrado amarillo), principalmente de los subtipos Tfh y Th17, con presencia también de algunos linfocitos T CD4 + CD28-. Esto se asocia con la activación de la microglia (nube marrón) y con la degeneración de las fibras de la glía de Bergman (estrella marrón) en la capa molecular (en naranja), mientras que la sustancia blanca (en blanco) permanece inalterada. En SH1 ya existe además una pequeña reducción en el número de neuronas de Purkinje (X sobre núcleos azules grandes) y granulares (X sobre núcleos

azules pequeños) (Figura 68B). En los estadios SH2 y SH3 de esteatohepatitis (Figura 68C) la infiltración de linfocitos T (cuadrados amarillos) continúa aumentando. La activación de microglia (nube marrón) y astrocitos (estrella marrón) se extiende también a la sustancia blanca (en blanco) y hay una reducción adicional en el número de neuronas de Purkinje (X sobre núcleos azules grandes) (Figura 68C).



**Figura 68.** Esquema de cerebelo de paciente sin enfermedad hepática (A) y del resumen de los cambios histo-estructurales en paciente con SH1 (B), SH2/SH3 (C) y cirrosis/HE (D). Los detalles se comentan en el texto.

En pacientes con cirrosis y EH (Figura 68D) hay una reducción en el número de linfocitos infiltrados (cuadrado amarillo). La microglia (nube marrón) y los astrocitos (estrella marrón) permanecen activados tanto en la capa molecular (en naranja) como en la sustancia blanca (en blanco) y la pérdida neuronal (X) permanece en niveles similares a los de pacientes con SH2 y SH3 (Figura 68D).

Estos datos muestran que la neuroinflamación en el cerebelo se produce en las primeras etapas de la enfermedad hepática, incluso antes de llegar a cirrosis.

Los escasos estudios previos sobre activación microglial en enfermedades hepáticas se han realizado principalmente en pacientes con cirrosis hepática avanzada y se han centrado en la corteza cerebral y la región periventricular (Dennis et al., 2014; Zemtsova et al., 2011). Dennis et al. (2014) mostraron activación microglial en la sustancia blanca y gris y microglia distrófica en la sustancia blanca en la región periventricular en pacientes con cirrosis hepática. También mostraron un aumento de la proliferación microglial en un grupo de pacientes con EH y una pequeña disminución de la densidad neuronal en el giro frontal superior de los pacientes con EH (Dennis et al., 2014). Zemtsova et al. (2011) mostraron que la microglia se activa en pacientes cirróticos con EH pero no en aquellos sin EH (Zemtsova et al., 2011). Sin embargo, debe tenerse en cuenta que la activación microglial se analizó mediante western blot cuantificando el contenido de IBA1 en la corteza cerebral. Este procedimiento no es lo suficientemente sensible para detectar todos los grados de activación microglial. Por otra parte, el análisis se realizó sólo en corteza cerebral donde la neuroinflamación es mucho menos evidente que en cerebelo durante la hiperamonemia y el fallo hepático crónico (Rodrigo et al., 2010). Las ratas con hiperamonemia crónica o con insuficiencia hepática y EH debida a la ligadura del conducto biliar muestran una fuerte neuroinflamación y activación microglial en cerebelo, pero no en la corteza prefrontal, que permanece inalterada (Rodrigo et al., 2010). Otras partes de la corteza cerebral sólo muestran ligeras alteraciones (Rodrigo et al., 2010). El hecho de que los estudios previos se hayan realizado en la corteza cerebral puede explicar el menor grado de activación microglial descrito en los estudios citados en comparación con el presente trabajo, que muestra neuroinflamación y alteraciones neuronales notables en cerebelo incluso antes de que la enfermedad progrese a cirrosis.

La inducción de la neuroinflamación en el cerebelo en las primeras etapas de la enfermedad hepática está de acuerdo con estudios que muestran que otras alteraciones

tempranas de la enfermedad hepática también ocurren en el cerebelo antes que en otras áreas cerebrales. (Felipo et al., 2014). Por ejemplo, la medición no invasiva del flujo sanguíneo en cerebelo detecta la presencia de EHM antes que las pruebas psicométricas (Felipo et al., 2014). El flujo sanguíneo aumenta en el hemisferio cerebeloso (pero no en otras regiones cerebrales) en pacientes cirróticos con o sin EHM, lo que indica que el cerebelo es el área cerebral más sensible, que las alteraciones funcionales en cerebelo se producen antes que en otras áreas del cerebro y antes de que se reflejen en el deterioro de las funciones neurológicas evaluadas por la batería de test psicométricos PHES, utilizada para detectar la EHM (Felipo et al., 2014). Que la alteración del cerebelo en pacientes con enfermedad hepática ocurre de forma temprana es apoyado también por estudios que muestran que varias funciones moduladas por el cerebelo se deterioran en los pacientes clasificados como sin EHM por la batería PHES. Butz et al. (2010) mostraron que la ataxia, el temblor y la desaceleración de los movimientos de los dedos son marcadores tempranos de la disfunción cerebral en los pacientes con cirrosis, incluso antes de que las alteraciones neuropsicométricas sean detectables con el PHES. La coordinación bimanual y visuo-motora también se deterioran en los pacientes clasificados como sin EHM por el PHES (Felipo et al., 2012a; Gimenez-Garzó et al., 2017). Todas estas funciones motoras son moduladas principalmente por el cerebelo, apoyando la idea de que el cerebelo es el área cerebral que se afecta de forma más temprana en la enfermedad hepática. Esto concuerda con la fuerte neuroinflamación en cerebelo observada en este trabajo en las primeras etapas de la enfermedad hepática.

Otro hallazgo importante de este trabajo es el hecho de que la infiltración de linfocitos, la activación glial y la pérdida neuronal pueden observarse ya en pacientes en estadios tempranos de esteatohepatitis. A pesar de que la EH y la EHM se evalúan generalmente en pacientes con cirrosis hepática, el deterioro cognitivo leve también se ha observado en pacientes con esteatohepatitis no alcohólica (NASH) que muestran altos niveles de amonio e inflamación periférica (Felipo et al., 2012b). Esto concuerda con el aumento de la neuroinflamación observada aquí en el cerebelo de los pacientes con esteatohepatitis, incluso antes de llegar a la cirrosis hepática.

Los datos también muestran pérdida neuronal en las capas de Purkinje y granular de cerebelo ya en pacientes con estadios tempranos de esteatohepatitis. Generalmente se considera que la insuficiencia hepática no está asociada con neurodegeneración o pérdida neuronal. Sin embargo, hay un buen número de estudios que muestran pérdida neuronal, especialmente en cerebelo. Esto ha sido descrito por varios grupos en la

llamada "degeneración hepatocerebral adquirida" en pacientes con enfermedad hepática crónica, que muestran pérdida neuronal en ganglios basales, corteza cerebral y cerebelo (Finlayson et al., 1981; Park et al., 2004; Melzer et al., 2004). La degeneración cerebelosa, con pérdida de neuronas de Purkinje, también se encontró en 20 de 36 pacientes que murieron con cirrosis hepática y EH (Krill et al., 1997). La pérdida neuronal, especialmente en el cerebelo, es por lo tanto más frecuente de lo que se supone en la enfermedad hepática. Se muestra aquí por primera vez que la pérdida de neuronas de Purkinje y granulares también se produce en las primeras etapas de la esteatohepatitis.

La pérdida neuronal en la enfermedad hepática puede explicar por qué la recuperación de las funciones neurológicas no es completa después del trasplante hepático en pacientes con EHM o EH (Mechtcheriakov et al., 2004; Sotil et al., 2009; Campagna et al., 2014). Mechtcheriakov et al. (2004) mostraron que la mejoría de los déficits visuo-motores después del trasplante hepático es incompleta en pacientes con EHM. La coordinación visuo-motora se modula por el cerebelo (Miall et al., 2001). La pérdida de las neuronas de Purkinje y granulares observadas aquí no se recuperaría tras el trasplante hepático, lo que explicaría la recuperación incompleta de algunas funciones moduladas por el cerebelo, como la coordinación visuo-motora (Miall et al., 2001).

El presente estudio también proporciona algunas nuevas ideas sobre los mecanismos subyacentes a la pérdida neuronal y neuroinflamación durante la enfermedad hepática crónica. En la figura 52B se muestra una microglía que fagocita una neurona de Purkinje. Las microglía eliminan neuronas muertas o en degeneración. Sin embargo, la microglía también puede fagocitar neuronas vivas, causando muerte neuronal. Este proceso ha sido denominado "fagoptosis" (Brown et al., 2014). Hemos observado un número relevante de neuronas de Purkinje fagocitadas por microglía. Esto sugiere que la "fagoptosis" es un mecanismo relevante que conduce a la pérdida neuronal en el cerebelo durante la enfermedad hepática crónica. La fagoptosis puede ser desencadenada por la inflamación (Brown et al., 2014). El estrés inflamatorio o niveles moderados de peroxinitrito pueden inducir que las neuronas expongan la fosfatidilserina, dando como resultado la fagocitosis de neuronas estresadas pero viables (Brown et al., 2014). Nuestro grupo ha propuesto que el aumento de la formación de peroxinitrito mediaría los efectos sinérgicos de la hiperamonemia y la inflamación sobre el deterioro cognitivo y motor en pacientes con EHM (Gimenez-Garzo et al., 2015). Además, la microglía activada y los astrocitos liberan factores proinflamatorios. Por lo

tanto, es probable que el aumento de la inflamación y del peroxinitrito promueva la "fagoptosis" de las neuronas vivas en cerebelo durante la enfermedad hepática crónica.

Los resultados mostrados también sugieren que la activación glial se desencadena por la infiltración de los linfocitos T. No observamos infiltración relevante de linfocitos B.

La infiltración de linfocitos en el espacio meníngeo también ocurre en pacientes con esclerosis múltiple (EM), contribuyendo a procesos neuroinflamatorios en las primeras etapas de la EM (Pikor et al., 2016) y correlacionando también con la progresión clínica acelerada de la enfermedad (Howell et al., 2011). Como se muestra aquí para los pacientes con enfermedad hepática crónica, los linfocitos Tfh (Dos Passos et al., 2016) y Th17 (Fan et al., 2015) también constituyen una parte relevante de los linfocitos infiltrados en la EM, desempeñando un papel en su patogénesis (Pikor et al., 2016; Howell et al., 2011; Dos Passos et al., 2016; Fan et al., 2015). Sin embargo, en la EM, los infiltrados meníngeos también contienen grandes cantidades de linfocitos B y forman estructuras similares a los folículos que contribuyen a la desmielinización (Pikor et al., 2016; Haugen et al., 2014). En este estudio no encontramos cantidades relevantes de linfocitos B en las meninges de pacientes con enfermedad hepática crónica. Esto puede explicar las diferentes consecuencias estructurales y neurológicas inducidos por la EM y la enfermedad hepática.

Observamos infiltración principalmente de linfocitos Th17 y Tfh. Para infiltrarse en el cerebro, los linfocitos T deben activarse primero en la sangre periférica (Engelhardt y Ransohoff, 2005). Una vez activados, se dividen y se diferencian a distintos subtipos, incluyendo Th1, Th2, Th17, Th22, iTreg o Tfh, que segregan diferentes citocinas para facilitar diferentes tipos de respuestas inmunes (Gutcher y Becher, 2007). La infiltración de los linfocitos Th17 y Tfh encontrada en las meninges sugiere que, en la enfermedad hepática crónica, los linfocitos T activados se diferencian principalmente a Th17 y Tfh. De acuerdo con esta hipótesis, ya se ha descrito una expansión de los linfocitos Th17 y Tfh en cirrosis biliar primaria (Fenoglio et al., 2012; Wang et al., 2015). Los Th17 también se expanden en pacientes con enfermedad hepática grasa no alcohólica, se infiltran en el hígado, correlacionando con la progresión a esteatohepatitis (Rau et al., 2016; ChackeleVICIUS et al., 2016). Aquí se muestra que los linfocitos Th17 no sólo se infiltran en el hígado, sino también en las meninges de pacientes con esteatohepatitis. Se ha demostrado que en la encefalitis autoinmune experimental, un modelo animal de esclerosis múltiple, las células Th17 remodelan el estroma de las meninges cerebrales, induciendo cambios en el microambiente meníngeo (citocinas, quimiocinas, proteínas)

que inducen el reclutamiento y el mantenimiento de células inflamatorias en el cerebro (Pikor et al., 2015). La infiltración de Th17 en las meninges sería por lo tanto un contribuyente esencial en la inducción y mantenimiento de la neuroinflamación en cerebelo de pacientes con esteatohepatitis y cirrosis hepática.

En resumen, encontramos que los pacientes con enfermedad hepática crónica muestran infiltración de linfocitos Th17 y Tfh en las meninges del cerebelo ya en las primeras etapas de la esteatohepatitis. La infiltración de linfocitos T se asocia con la activación de microglia y astrocitos, primero en la capa molecular y posteriormente en la sustancia blanca del cerebelo. La microglía activada es responsable de la fagocitosis de neuronas, causando la pérdida de la neuronas de Purkinje granulares.

Nuestro grupo realizó un estudio con pacientes con distintas enfermedades hepáticas y dermatológicas y con distintos grados de hiperamonemia e inflamación periférica. Los resultados mostraron que 5 de los 11 pacientes con NASH presentaban deterioro cognitivo leve (Felipo et al., 2012b). En esta tesis, se ha demostrado que los pacientes con esteatohepatitis ya presentan infiltración de linfocitos T en meninges, neuroinflamación y pérdida neuronal en cerebelo, lo que explicaría por qué se observa deterioro cognitivo leve en pacientes con NASH. Por tanto nuestros resultados sugieren que sería necesario realizar los test psicométricos para diagnosticar la EHM ya en pacientes con esteatohepatitis. Además de la batería PHES, también sería conveniente utilizar otros tests que evalúan mas finamente las funciones moduladas por el cerebelo como por ejemplo la coordinación visuo-motor o bimanual que se ha visto que están alteradas en pacientes sin EHM y pueden detectar la EHM de forma más sensible (Felipo et al., 2012a; Gimenez-Garzó et al., 2017). El diagnostico temprano de la EHM permitiría tratar los pacientes y mejorar, prevenir o retrasar el deterioro neurológico.

## 6. CONCLUSIONES

1. En ratas PCS, el fallo hepático inducido quirúrgicamente por anastomosis porta-cava induce inflamación periférica, con aumento de los factores proinflamatorios IL-6, IL-17 y PGE2 y disminución de la IL-10 antiinflamatoria.
2. La inflamación periférica induce en ratas PCS neuroinflamación en cerebelo, con activación de microglía y astrocitos y aumento de TNF-a e IL-1b en sustancia blanca.
3. La neuroinflamación altera la neurotransmisión GABAérgica en cerebelo de ratas PCS aumentando la expresión en membrana del transportador de GABA GAT3 en astrocitos activados lo que conduce a un aumento del GABA extracelular. Este aumento es la causa de la incoordinación motora y de la disminución de la capacidad de aprender la tarea en el laberinto en Y en ratas PCS.
4. La reducción de la inflamación periférica por tratamiento con infliximab previene la neuroinflamación y normaliza la neurotransmisión GABAérgica en cerebelo y restaura la coordinación motora y la capacidad de aprender la tarea en el laberinto en Y. Esto indica que la inflamación periférica es un contribuyente esencial al deterioro de la coordinación motora y de la capacidad de aprender la tarea en el laberinto en Y en ratas PCS.
5. Las ratas PCS muestran neuroinflamación en hipocampo con activación de microglía que induce una disminución de NF-kB en nucléolos y un aumento en el núcleo de neuronas en hipocampo, lo que activa la transcripción de TNF-a e IL-1b.
6. El aumento del contenido de TNF-a e IL-1b y la activación de sus receptores alteraría la neurotransmisión en hipocampo de ratas PCS alterando la expresión en membrana de los receptores AMPA y NMDA. Esto contribuye al deterioro del aprendizaje espacial.
7. El tratamiento de ratas PCS con infliximab reduce la inflamación periférica, la neuroinflamación y el contenido nuclear de la subunidad p50 de NF-kB, induciendo su translocación al nucléolo, reduciendo la transcripción de TNF-a e IL-1b. Esto normaliza la expresión en membrana de los receptores AMPA y NMDA, restaurando el aprendizaje y la memoria espacial en ratas PCS.

8. Reducir la inflamación periférica con anti-TNF- $\alpha$  o por otros procedimientos seguros podría ser un nuevo enfoque terapéutico para mejorar la función cognitiva y motora en pacientes con EMH o EH clínica.
9. Los pacientes con enfermedad hepática crónica presentan neuroinflamación y degeneración neuronal en cerebelo. Estos cambios se producen en las primeras etapas de la enfermedad, incluso antes de llegar a cirrosis: los pacientes con esteatohepatitis ya muestran infiltración de linfocitos T en meninges, activación de microglía y de astrocitos, degeneración de fibras radiales de la glia de Bergman y pérdida de neuronas granulares y de Purkinje.
10. La infiltración de linfocitos T, principalmente Th17 y Th foliculares, en meninges de cerebelo podría ser el mecanismo por el que el fallo hepático induce la neuroinflamación en cerebelo.
11. La neuroinflamación comienza antes en capa molecular que en sustancia blanca. La microglía activada de la capa molecular sería la responsable de la pérdida de neuronas en la capa granular y de Purkinje en pacientes con esteatohepatitis. Esto explicaría el deterioro cognitivo leve observado en estudios previos en pacientes con esteatohepatitis no alcohólica.
12. Nuestros resultados sugieren que se deberían realizar los test psicométricos para diagnosticar la EHM ya en pacientes con esteatohepatitis. El diagnóstico temprano de la EHM permitiría tratar los pacientes y mejorar, prevenir o retrasar el deterioro neurológico.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- Adams LA, Angulo P, and Lindor KD. Nonalcoholic fatty liver disease. *CMAJ* 2005a;172: 899–905,.
- Adams LA, Lymp JF, Sauver JS, et al. The natural history of nonalcoholic fatty liver disease: a population-based cohort study. *Gastroenterology* 2005b;129:113–121,
- Agusti A, Cauli O, Rodrigo R, et al. p38 MAP kinase is a therapeutic target for hepatic encephalopathy in rats with portacaval shunts. *Gut*. 2011;60(11):1572–9.
- Ajami B, Bennett JL, Krieger C, et al. Local self-renewal can sustain CNS microglia maintenance and function throughout adult life. *Nat Neurosci*. 2007;10(12):1538–1543.
- Amlal H, Soleimani M. K<sup>+</sup>/NH<sub>4</sub><sup>+</sup> antiporter: a unique ammonium carrying transporter in the kidney inner medulla. *Biochim Biophys Acta*. 1997;1323: 319-333
- Amodio P, Montagnese S, Gatta A, et al. Characteristics of minimal hepatic encephalopathy. *Metab Brain Dis*. 2004;19: 253-267
- Arriada-Mendicoa N, Otero-Siliceo E, Corona-Vazquez T. Current concepts regarding the cerebellum and cognition. *Rev Neurol*. 1999;29: 1075-1082
- Atluri DK, Asgeri M, Mullen KD. Reversibility of hepatic encephalopathy after liver transplantation. *Metab Brain Dis*. 2010;25(1):111–3.
- Bajaj JS, Saeian K, Schubert CM, et al. Minimal hepatic encephalopathy is associated with motor vehicle crashes: the reality beyond the driving test. *Hepatology* 2009;50:1175-1183
- Banks WA, Kastin AJ, Broadwell RD. Passage of cytokines across the blood-brain-barrier. *Neuroimmunomodulation*. 1995;2(4):241–8.
- Barker CF, Billingham RE. Immunologically privileged sites. *Adv Immunol*. 1977;25: 1 – 54
- Bartholomaeus I, Kawakami N, Odoardi F, et al. Effector T cell interactions with meningeal vascular structures in nascent autoimmune CNS lesions. *Nature* 2009;462:94–8.
- Bechmann I, Galea I, Perry VH. What is the blood-brain barrier (not)? *Trends Immunol*. 2007;28:5–11.

- Blaževski J, Petković F, Momčilović M, et al. Tumor necrosis factor stimulates expression of CXCL12 in astrocytes. *Immunobiology*. 2015;220(7):845–850.
- Bluthe RM, Michaud B, Kelley KW, et al. Vagotomy attenuates behavioural effects of interleukin-1 injected peripherally but not centrally. *Neuroreport*. 1996;7:1485–1488.
- Bluthe RM, Walter V, Parnet P, et al. Lipopolysaccharide induces sickness behaviour in rats by a vagal mediated mechanism. *C R Acad Sci III*. 1994;317:499–503.
- Boix J, Cauli O, Felipo V. Developmental exposure to polychlorinated biphenyls 52, 138 or 180 affects differentially learning or motor coordination in adult rats. Mechanisms involved. *Neuroscience*. 2010;167:994–1003.
- Brady LS, Lynn AB, Herkenham M, et al. Systemic interleukin-1 induces early and late patterns of c-fos mRNA expression in brain. *J Neurosci*. 1994;14:4951–4964.
- Bret-Dibat JL, Bluthe RM, Kent S, et al. *Brain Behav. Immun*. 1995; 9, 242-246.
- Briscoe T, Duncan J, Cock M, et al. Activation of NF-κB transcription factor in the preterm ovine brain and placenta after acute LPS exposure. *J. Neurosci. Res*. 2006;83, 567–574.
- Brown GC, Neher JJ. Microglial phagocytosis of live neurons. *Nat Rev Neurosci*. 2014;15(4):209-16.
- Browning JD and Horton JD. Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury. *J Clin Invest*. 2004;114:147–152.
- Brunt EM. Grading and staging the histopathological lesions of chronic hepatitis: the Knodell histology activity index and beyond. *Hepatology*. 2000;31:241-246.
- Bugianesi E, Leone N, Vanni E, et al. Expanding the natural history of nonalcoholic steatohepatitis: from cryptogenic cirrhosis to hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*. 2002; 123: 134–140.
- Bustamante J, Rimola A, Ventura PJ, et al. Prognostic significance of hepatic encephalopathy in patients with cirrhosis. *J Hepatol*. 1999;30:890–895.
- Butterworth RF The liver–brain axis in liver failure: neuroinflammation and encephalopathy. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2013; 10(9):522-8.

- Butz M, Timmermann L, Braun M, et al. Motor impairment in liver cirrhosis without and with minimal hepatic encephalopathy. *Acta Neurol Scand.* 2010;122(1):27-35.
- Cabrera-Pastor A, Hernandez-Rabaza V, Taoro-Gonzalez L, et al. In vivo administration of extracellular cGMP normalizes TNF- $\alpha$  and membrane expression of AMPA receptors in hippocampus and spatial reference memory but not IL-1 $\beta$ , NMDA receptors in membrane and working memory in hyperammonemic rats. *Brain Behav Immun.* 2016;57:360–70.
- Cagnin A, Taylor-Robinson SD, Forton DM, et al. In vivo imaging of cerebral “peripheral benzodiazepine binding sites” in patients with hepatic encephalopathy. *Gut.* 2006;55, 547–553.
- Campagna F, Montagnese S, Schiff S, et al. Cognitive impairment and electroencephalographic alterations before and after liver transplantation: what is reversible? *Liver Transpl.* 2014; 20(8): 977-86.
- Canales JJ, Elayadi A, Errami M, et al. 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.* 2003;14(3):380-90.
- Cauli O, Mansouri MT, Agusti A, et al. Hyperammonemia increases GABAergic tone in cerebellum but decreases it in rat cortex. *Gastroenterology.* 2009a;136(4):1359–67.
- Cauli O, Rodrigo R, Piedrafita B, et al. Neuroinflammation contributes to hypokinesia in rats with hepatic encephalopathy: ibuprofen restores its motor activity. *J Neurosci Res.* 2009b;87:1369-74.
- Cauli O, Rodrigo R, Piedrafita B, et al. Inflammation and hepatic encephalopathy: ibuprofen restores learning ability in rats with portacaval shunts. *Hepatology.* 2007;46, 514–519.
- Chackelevicius CM, Gambaro SE, Tiribelli C, et al. Th17 involvement in nonalcoholic fatty liver disease progression to non-alcoholic steatohepatitis. *World J Gastroenterol.* 2016;22(41):9096-9103.
- Cheng X, Shen Y, Li R. Targeting TNF: a therapeutic strategy for Alzheimer’s disease. *Drug Discov Today.* 2014;19(11):1822–7.

- Chiu CS, Brickley S, Jensen K, et al. GABA transporter deficiency causes tremor, ataxia, nervousness, and increased GABA-induced tonic conductance in cerebellum. *J Neurosci*. 2005;25:3234–324.
- Chouard T, Gray N. *Glia*. *Nature*. 2010;468(7321):213.
- Choy EH, Panayi GS. Cytokine pathways and joint inflammation in rheumatoid arthritis. *N Engl J Med*. 2001; 22;344(12):907-16.
- Christensen AL. Neuropsychological investigation with Luria's methods. *Scand J Work Environ Health*. 1984;10 Suppl 1: 33-34.
- Cibelli M, Fidalgo AR, Terrando N, et al. Role of interleukin-1beta in postoperative cognitive dysfunction. *Neurol*. 2010; 68(3):360-8.
- Clemmesen JO, Larsen FS, Kondrup J, et al. Cerebral herniation in patients with acute liver failure is correlated with arterial ammonia concentration. *Hepatology*. 1999;29: 648-653.
- Columba-Cabezas S, Griguoli M, Rosicarelli B, et al. Suppression of established experimental autoimmune encephalomyelitis and formation of meningeal lymphoid follicles by lymphotoxin beta receptor-Ig fusion protein. *J Neuroimmunol*. 2006; 179:76–86.
- Company L, Zapater P, Perez-Mateo M, et al. Extrapyramidal signs predict the development of overt hepatic encephalopathy in patients with liver cirrhosis. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2010;22: 519-525.
- Conn HO, Lieberthal MM. *The Hepatic Coma Syndromes and Lactulose*. Chapter 1: The syndrome of portal-systemic encephalopathy. Baltimore: Williams and Wilkins. 1979; 1–45.
- Corcione A, Casazza S, Ferretti E, et al. Recapitulation of B cell differentiation in the central nervous system of patients with multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004;101:11064–11069.
- Cordoba J, Cabrera J, Lataif L, et al. High prevalence of sleep disturbance in cirrhosis. *Hepatology* 1998;27: 339-345
- Cornillie F, Shealy D, D’Haens G, et al. Infliximab induces potent anti-inflammatory and local immunomodulatory activity but no systemic immune suppression in patients with Crohn’s disease. *Aliment Pharmacol Ther*. 2001;15:463–473.

- Crabb DW, Galli A, Fischer M, et al. Molecular mechanisms of alcohol fatty liver: role of peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$ . *Alcohol*. 2004;34: 35–38.
- Crawford JM. Development of the intrahepatic biliary tree. *Semin Liver Dis*. 2002;22 : 213
- Cvetanovic M, Ingram M, Orr H, et al. Early activation of microglia and astrocytes in mouse models of spinocerebellar ataxia type 1. *Neuroscience*. 2015;289:289–99.
- D’Mello C, Le T, Swain MG. Cerebral microglia recruit monocytes into the brain in response to tumor necrosis factor  $\alpha$  signaling during peripheral organ inflammation. *J Neurosci*. 2009;29(7):2089–102.
- Day CP and James OF. Steatohepatitis: a tale of two “hits”? *Gastroenterology*. 1998;114: 842–845.
- Dennis CV, Sheahan PJ, Graeber MB, et al. Microglial proliferation in the brain of chronic alcoholics with hepatic encephalopathy. *Metab Brain Dis*. 2014;29:1027-39.
- Denniston DJ, Thomas MG, Kane KK, et al. Effect of neuropeptide Y on GnRH-induced LH release from bovine anterior pituitary cell cultures derived from heifers in a follicular, luteal or ovariectomized state. *Anim Reprod Sci*. 2003;78: 25-31.
- Desmond JE, Gabrieli JD, Wagner AD, et al. Lobular patterns of cerebellar activation in verbal working-memory and finger-tapping tasks as revealed by functional MRI. *J Neurosci*. 1997;17: 9675-9685.
- Dhiman RK, Chawla YK. Minimal hepatic encephalopathy. *Indian J Gastroenterol*. 2009;28: 5-16.
- Ding X, Saxena NK, Lin S, et al. The roles of leptin and adiponectin: a novel paradigm in adipocytokine regulation of liver fibrosis and stellate cell biology. *Am J Pathol*. 2005; 166(6): 1655–1679.
- Dos Passos GR, Sato DK, Becker J, et al. Th17 Cells Pathways in Multiple Sclerosis and Neuromyelitis Optica Spectrum Disorders: Pathophysiological and Therapeutic Implications. *Mediators Inflamm*. 2016;2016:5314541.
- Ehrlich P. *Das Sauerstoffbedurfnis Des Organismus. Eine Farbenanalytische Studie* Berlin, Germany: Hirschwald; 1885.

- Ek M, Kurosawa M, Lundeberg T, et al. Activation of vagal afferents after intravenous injection of interleukin-1 $\beta$ : role of endogenous prostaglandins. *J. Neurosci.* 1998;18:9471–9479.
- Elfferich MD, Nelemans PJ, Ponds RW, et al. Everyday cognitive failure in sarcoidosis: the prevalence and the effect of anti-TNF-alpha treatment. *Respiration.* 2010;80(3):212–9.
- Eng L, Ghirnikar R, Lee Y. Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969–2000). *Neurochem Res.* 2000;25(9–10):1439–51.
- Engelhardt B, Ransohoff RM. The ins and outs of T-lymphocyte trafficking to the CNS: anatomical sites and molecular mechanisms. *Trends Immunol.* 2005;26(9):485-95.
- Erceg S, Monfort P, Hernandez-Viadel M, et al. Restoration of learning ability in hyperammonemic rats by increasing extracellular cGMP in brain. *Brain Res.* 2005a;1036: 115-121
- Erceg S, Monfort P, Hernández-Viadel M, et al. Oral administration of sildenafil restores learning ability in rats with hyperammonemia and with portacaval shunts. *Hepatology.* 2005b;41(2):299-306.
- Ericsson A, Kovács KJ, Sawchenko PE. A functional anatomical analysis of central pathways subserving the effects of interleukin-1 on stress-related neuroendocrine neurons. *J Neurosci.* 1994;14(2):897-913.
- Eroglu C, Barres BA. Regulation of synaptic connectivity by glia. *Nature.* 2010;468(7321):223–231.
- Evans RM, Barish GD, and Wang YX. PPARs and the complex journey to obesity. *Nat Med.* 2004;10: 1–7.
- Fan CY, Pan J, Usuda N, et al. Steatohepatitis, spontaneous peroxisome proliferation and liver tumors in mice lacking peroxisomal fatty acyl-CoA oxidase. *J Biol Chem* 1998;273: 15639–15645.
- Fan X, Lin C, Han J, et al. Follicular Helper CD4+ T Cells in Human Neuroautoimmune Diseases and Their Animal Models. *Mediators Inflamm.* 2015;2015:638968.
- Felipo V, and Butterworth RF. Neurobiology of ammonia. *Prog Neurobiol.* 2002;67 (4), 259-279

- Felipo V, Ordoño JF, Urios A, et al. Patients with minimal hepatic encephalopathy show impaired mismatch negativity correlating with reduced performance in attention tests. *Hepatology*. 2012a; 55(2):530-9.
- Felipo V, Urios A, Giménez-Garzó C, et al. Non invasive blood flow measurement in cerebellum detects minimal hepatic encephalopathy earlier than psychometric tests. *World J Gastroenterol*. 2014;20(33):11815-25.
- Felipo V, Urios A, Montesinos E, et al. Contribution of hyperammonemia and inflammatory factors to cognitive impairment in minimal hepatic encephalopathy. *Metab Brain Dis*. 2012b;27(1):51-58.
- Felipo V. *Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology*, 3rd Ed. Kluwer Acad./Plenum Publishers, USA. 2008; vol 24:1 -27.
- Felipo V. Hepatic encephalopathy: effects of liver failure on brain function. *Nature Reviews Neuroscience*. 2013;14(12):851-858.
- Fenoglio D, Bernuzzi F, Battaglia F, et al. Th17 and regulatory T lymphocytes in primary biliary cirrhosis and systemic sclerosis as models of autoimmune fibrotic diseases. *Autoimmun Rev*. 2012;12(2):300-4.
- Ferenci P, Lockwood A, Mullen K, et al. 2002. Hepatic encephalopathy--definition, nomenclature, diagnosis, and quantification: final report of the working party at the 11th World Congresses of Gastroenterology, Vienna. *Hepatology*. 1998;35: 716-721.
- Finlayson MH, Superville B. Distribution of cerebral lesions in acquired hepatocerebral degeneration. *Brain*. 1981;104(Pt 1):79-95.
- Gautron L, Lafon P, Chaigniau M, et al. Spatiotemporal analysis of signal transducer and activator of transcription 3 activation in rat brain astrocytes and pituitary following peripheral immune challenge. *Neuroscience*. 2002;112(3):717-29.
- Gaykema RP, Dijkstra I, Tilders FJ. Subdiaphragmatic vagotomy suppresses endotoxin-induced activation of hypothalamic corticotropin-releasing hormone neurons and ACTH secretion. *Endocrinology*. 1995;136:4717-4720..
- Geiger JR, Melcher T, Koh DS, et al. Relative abundance of subunit mRNAs determines gating and Ca<sup>2+</sup> permeability of AMPA receptors in principal neurons and interneurons in rat CNS. *Neuron*. 1995;15, 193-204.

- Gerok W, Haussinger D. Ammonium detoxication and pH regulation by the liver. *Med Welt*. 1984;35: 28-34.
- Ghabril M, Bonkovsky HL, Kum C, et al. US Drug-Induced Liver Injury Network. Liver injury from tumor necrosis factor- $\alpha$  antagonists: analysis of thirty-four cases. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2013;11(5):558–564.e3.
- Gibson GE, Zimber A, Krook L, et al. Brain histology and behavior of mice injected with urease. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1974;33: 201-211.
- Gimenez MA, Sim J, Archambault AS, et al. A tumor necrosis factor receptor 1 dependent conversation between central nervous system specific t cells and the central nervous system is required for inflammatory infiltration of the spinal cord. *Am J Pathol*. 2006;168(4):1200–1209.
- Giménez-Garzó C, Garcés JJ, Urios A, et al. The PHEs battery does not detect all cirrhotic patients with early neurological deficits, which are different in different patients. *PLoS One*. 2017;12(2):e0171211.
- Gimenez-Garzó C, Urios A, Agustí A, et al. Is cognitive impairment in cirrhotic patients due to increased peroxynitrite and oxidative stress? *Antioxid Redox Signal*. 2015;22(10):871-7.
- Ginhoux F, Greter M, Leboeuf M, et al. Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. *Science*. 2010;330(6005):841–845.
- Goldmann J, Kwidzinski E, Brandt C, et al. T cells traffic from brain to cervical lymph nodes via the cribroid plate and the nasal mucosa. *J Leukoc Biol*. 2006;80:797–801.
- Gonzalez-Usano A, Cauli O, Agusti A, et al. Pregnenolone sulphate restores the glutamate-nitric oxide-cGMP pathway and extracellular GABA in cerebellum and learning and motor coordination in hyperammonemic rats. *ACS Chem Neurosci*. 2014;5(2):100–5.
- Gordon N. The cerebellum and cognition. *Eur J Paediatr Neurol*. 2007;11: 232-234
- Grazioli L, Alberti D, Olivetti L, et al. Congenital absence of portal vein with nodular regenerative hyperplasia of the liver. *Eur Radiol*. 2000;10: 820-825.
- Groeneweg M, Quero JC, De Bruijn I, et al. Subclinical hepatic encephalopathy impairs daily functioning. *Hepatology*. 1998;28: 45-49.

- Grover VP, Pavese N, Koh SB, et al. Cerebral microglial activation in patients with hepatitis C: in vivo evidence of neuroinflammation. *J Viral Hepat* 2012;19:e89-96.
- Gutcher I, Becher B. APC-derived cytokines and T cell polarization in autoimmune inflammation. *J Clin Invest*. 2007;117: 1119–1127.
- Hamaguchi M, Kojima T, Takeda N, et al. The metabolic syndrome as a predictor of nonalcoholic fatty liver disease. *Ann Intern Med*. 2005;143: 722–728.
- Hancher HJ, Dodson PD, Olsen RW, et al. Alcohol-induced motor impairment caused by increased extrasynaptic GABA(A) receptor activity. *Nat Neurosci*. 2005;8:339–45.
- Hang CH, Shi JX, Tian J, et al. Effect of systemic LPS injection on cortical NF- $\kappa$ B activity and inflammatory response following traumatic brain injury in rats. *BrainRes*. 2004;1026,23–32.
- Hanisch UK, Kettenmann H. Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nat Neurosci*. 2007; 10: 1387–1394
- Hansen MK, Krueger JM. Subdiaphragmatic vagotomy blocks the sleep-and fever-promoting effects of interleukin-1 $\beta$  *American Journal of Physiology*. 1997;273(4 Pt 2):R1246–R1253.
- Hansen MK, Taishi P, Chen Z, Krueger JM. Vagotomy blocks the induction of interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) mRNA in the brain of rats in response to systemic IL-1 $\beta$  *Journal of Neuroscience*. 1998;18:2247–2253.
- Hashimoto T, Cook WS, Qi C, et al. Defect in peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$ -inducible fatty acid oxidation determines the severity of hepatic steatosis. *J Biol Chem*. 2000;275: 28918–28928.
- Hauben E, Agranov E, Gothilf A, et al. Posttraumatic therapeutic vaccination with modified myelin self-antigen prevents complete paralysis while avoiding autoimmune disease. *J Clin Investig*. 2001;108:591–599.
- Haugen M, Frederiksen JL, Degen M. B cell follicle-like structures in multiple sclerosis-with focus on the role of B cell activating factor. *J Neuroimmunol*. 2014;273(1-2):1-7.

- Hayashi Y, Nomura M, Yamagishi S, et al. Induction of various blood-brain barrier properties in non-neural endothelial cells by close apposition to cocultured astrocytes. *Glia*. 1997;19:13–26.
- Heneka MT, Rodriguez JJ, Verkhratsky A. Neuroglia in neurodegeneration. *Brain Res Rev*. 2010; 63: 189–211.
- Hernandez-Rabaza V, Agusti A, Cabrera-Pastor A, et al. Sildenafil reduces neuroinflammation and restores spatial learning in rats with hepatic encephalopathy: underlying mechanisms. *J Neuroinflammation*. 2015;12:195.
- Hernandez-Rabaza V, Cabrera-Pastor A, Taoro-Gonzalez L, et al. Neuroinflammation increases GABAergic tone and impairs cognitive and motor function in hyperammonemia by increasing GAT-3 membrane expression. Reversal by sulforaphane by promoting M2 polarization of microglia. *J Neuroinflammation*. 2016a 18;13(1):83.
- Hernández-Rabaza V, Cabrera-Pastor A, Taoro-González L, et al. Hyperammonemia induces glial activation, neuroinflammation and alters neurotransmitter receptors in hippocampus, impairing spatial learning: reversal by sulforaphane. *J Neuroinflammation*. 2016b;13:41.
- Hickey WF. Leukocyte traffic in the central nervous system: the participants and their roles. *Semin Immunol*. 1999;11:125–137.
- Hilsabeck RC, Perry W, Hassanein TI. Neuropsychological impairment in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology*. 2002;35: 440-446.
- Hofstetter HH, Sewell DL, Liu F, et al. Autoreactive T cells promote post-traumatic healing in the central nervous system. *J Neuroimmunol*. 2003;134:25–34.
- Horie Y, Suzuki A, Kataoka E, et al. Hepatocyte-specific Pten deficiency results in steatohepatitis and hepatocellular carcinomas. *J Clin Invest*. 2004;113:1774–1783.
- Hosoi T, Okuma Y, Nomura Y. The mechanisms of immune-to-brain communication in inflammation as a drug target. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*. 2002;1(3):257-62.
- Howell OW, Reeves CA, Nicholas R, et al. Meningeal inflammation is widespread and linked to cortical pathology in multiple sclerosis. *Brain*. 2011;134:2755–71.

- Hurwitz AA, Berman JW, Rashbaum WK, et al. Human fetal astrocytes induce the expression of blood-brain barrier specific proteins by autologous endothelial cells. *Brain Res.* 1993;625:238–243.
- Inoue K. Microglial activation by purines and pyrimidines. *Glia.* 2002;40:156–163.
- Ip E, Farrell GC, Robertson G, et al. Central role of PPAR $\alpha$ -dependent hepatic lipid turnover in dietary steatohepatitis in mice. *Hepatology.* 2003;38: 123–132.
- Izadpanah K, Freyer D, Weber JR, et al. Brain parenchymal TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  induction in experimental pneumococcal meningitis. *J. Neuroimmunol.* 2014;276, 104–111.
- Jarrard LE. Selective hippocampal lesions and behavior: Effects of kainic acid lesions on performance of place and cue tasks. *Behav Neurosci.* 1983;97:873-889
- Johansson M, Agusti A, Llansola M, et al. GR3027 antagonizes GABA A receptor potentiating neurosteroids and restores spatial learning and motor coordination in rats with hepatic encephalopathy. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2015;309(5):G400–9.
- Jones EA, Weissenborn K. Neurology and the liver. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 1997;63: 279-293.
- Jover R, Company L, Gutierrez A, et al. Clinical significance of extrapyramidal signs in patients with cirrhosis. *J Hepatol.* 2005;42: 659-665.
- Jover R, Company L, Gutierrez A, et al. Minimal hepatic encephalopathy and extrapyramidal signs in patients with cirrhosis. *Am J Gastroenterol.* 2003;98: 1599-1604.
- Junker A, Ivanidze J, Malotka J, et al. Multiple sclerosis: T-cell receptor expression in distinct brain regions. *Brain.* 2007;130:2789–99.
- Kandel ER. 2000. Principles of neural science, Ed 4. McGraw-Hill, New York, NY.
- Kapcala LP, He JR, Gao Y, et al. Subdiaphragmatic vagotomy inhibits intra-abdominal interleukin-1 $\beta$  stimulation of adrenocorticotropin secretion. *Brain. Res.* 1996;728, 247-254.
- Karson A, Demirtaş T, Bayramgürler D, et al. Chronic administration of infliximab (TNF- $\alpha$  inhibitor) decreases depression and anxiety-like behaviour in

- rat model of chronic mild stress. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2013;112(5):335-40.
- Kashireddy P and Rao MS. Lack of peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$  enhances methionine and choline deficient diet-induced steatohepatitis. *Hep Res*. 2004;30: 104–110.
  - Kenneth D, Kochanek MA, Sherry L, et al. Deaths: Final Data for 2014. *Natl Vital Stat Rep*. 2016; 65(4):1-122.
  - Kipnis J, Cohen H, Cardon M, et al. T cell deficiency leads to cognitive dysfunction: implications for therapeutic vaccination for schizophrenia and other psychiatric conditions. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004;101: 8180–8185.
  - Kipnis J, Gadani S, Derecki NC. Pro-cognitive properties of T cells. *Nat Rev Immunol*. 2012;12: 663 – 669.
  - Kipnis J, Mizrahi T, Yoles E, et al. Myelin specific Th1 cells are necessary for post-traumatic protective autoimmunity. *J Neuroimmunol*. 2002;130: 78 – 85.
  - Kivisakk P, Imitola J, Rasmussen S, et al. Localizing central nervous system immune surveillance: meningeal antigen-presenting cells activate T cells during experimental autoimmune encephalomyelitis. *Ann Neurol*. 2009;65:457–69.
  - Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M, et al. Nonalcoholic Steatohepatitis Clinical Research Network. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2005;41(6):1313-21.
  - Krieger S, Jauss M, Jansen O, et al. Neuropsychiatric profile and hyperintense globus pallidus on T1-weighted magnetic resonance images in liver cirrhosis. *Gastroenterology*. 1996;111: 147-155.
  - Kril JJ, Butterworth RF. Diencephalic and cerebellar pathology in alcoholic and nonalcoholic patients with end-stage liver disease. *Hepatology*. 1997;26(4):837-41.
  - Krupa DJ, Thompson JK, Thompson RF. Localization of a memory trace in the mammalian brain. *Science*. 1993;260:989-991.
  - Krupa DJ, Thompson RF. Inactivation of the superior cerebellar peduncle blocks expression but not acquisition of the rabbit's classically conditioned eye-blink response. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1995;92: 5097-5101.

- Kunis G, Baruch K, Rosenzweig N, et al. IFN-gamma-dependent activation of the brain's choroid plexus for CNS immune surveillance and repair. *Brain J Neurol.* 2013;136:3427–3440.
- Kurosawa M, Uvnas-Moberg K, Miyasaka K, et al. Interleukin-1 increases activity of the gastric vagal afferent nerve partly via stimulation of Type A CCK receptor in anesthetized rats. *J Auton Nerv Syst.* 1997;62: 72–78.
- Lai AY, Swayze RD, El-Husseini A, et al. Interleukin-1 beta modulates AMPA receptor expression and phosphorylation in hippocampal neurons. *J. Neuroimmunol.* 2006;175, 97–106.
- Laye S, Bluthé RM, Kent S, et al. Subdiaphragmatic vagotomy blocks induction of IL-1 beta mRNA in mice brain in response to peripheral LPS. *Am. J. Physiol.* 1995;268,R1327-R1331.
- Leclercq IA, Farrell GC, Schriemer R, et al. Leptin is essential for the hepatic fibrogenic response to chronic liver injury. *J Hepatol.* 2002;37:206–13.
- Lee SH, Fisher B. Portacaval shunt in the rat. *Surgery.* 1961;50:668-72.
- Ling C, Sandor M, Suresh M, et al. Traumatic injury and the presence of antigen differentially contribute to T-cell recruitment in the CNS. *J Neurosci.* 2006;26: 731–741.
- Liu SJ, Cull-Candy SG. Subunit interaction with PICK and GRIP controls Ca<sup>2+</sup> permeability of AMPARs at cerebellar synapses. *Nat. Neurosci.* 2005;8,768–775.
- Llansola M, Hernandez-Viadel M, Erceg S, et al. Increasing the function of the glutamate-nitric oxide-cyclic guanosine monophosphate pathway increases the ability to learn a Y-maze task. *J Neurosci Res.* 2009;87: 2351-2355.
- Lockwood AH, Murphy BW, Donnelly KZ, et al. Positron-emission tomographic localization of abnormalities of brain metabolism in patients with minimal hepatic encephalopathy. *Hepatology.* 1993;18: 1061-1068.
- Lockwood AH. "What's in a name?" Improving the care of cirrhotics. *J Hepatol.* 2000;32: 859-861.
- Louveau A, Smirnov I, Keyes TJ, et al. Structural and functional features of central nervous system lymphatic vessels. *Nature.* 2015;523:337–341.
- Lucchinetti CF, Popescu BF, Bunyan RF, et al. Inflammatory cortical demyelination in early multiple sclerosis. *N Engl J Med.* 2011;365:2188–97.

- Ludwig J, Viggiano TR, McGill DB, et al. Nonalcoholic steatohepatitis: Mayo Clinic experiences with a hitherto unnamed disease. *Mayo Clin Proc.* 1980;55:434–438.
- MacSween R. Developmental anatomy and normal structure. In MacSween R. editor: *Pathology of the Liver*. 4th ed. 2002.
- Magliozzi R, Columba-Cabezas S, Serafini B, et al. Intracerebral expression of CXCL13 and BAFF is accompanied by formation of lymphoid follicle-like structures in the meninges of mice with relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol.* 2004;148:11–23.
- Magliozzi R, Howell O, Vora A, et al. Meningeal B-cell follicles in secondary progressive multiple sclerosis associate with early onset of disease and severe cortical pathology. *Brain.* 2007;130:1089–104.
- Man S, Ubogu EE, Ransohoff RM. Inflammatory cell migration into the central nervous system: a few new twists on an old tale. *Brain Pathol.* 2007;17(2):243-50.
- Marcaggi P, Coles JA. Ammonium in nervous tissue: transport across cell membranes, fluxes from neurons to glial cells, and role in signalling. *Prog Neurobiol.* 2001;64:157-183.
- Martin LA, Goldowitz D, Mittleman G. The cerebellum and spatial ability: dissection of motor and cognitive components with a mouse model system. *Eur J Neurosci.* 2003;18:2002-2010.
- Martinez-Hernandez A, Bell KP, Norenberg MD. Glutamine synthetase: glial localization in brain. *Science.* 1977;195:1356-1358.
- Matsumoto Y, Yoon WK, Jee Y, et al. Complementarity-determining region 3 spectratyping analysis of the TCR repertoire in multiple sclerosis. *J Immunol.* 2003;170:4846–53.
- Matsusue K, Haluzik M, Lambert G, et al. Liver-specific disruption of PPAR $\gamma$  in leptin-deficient mice improves fatty liver but aggravates diabetic phenotypes. *J Clin Invest.* 2003;111: 737–747.
- Matyash V, Kettenmann H. Heterogeneity in astrocyte morphology and physiology. *Brain Res Rev.* 2010; 63: 2–10.

- Mechtcheriakov S, Graziadei IW, Mattedi M, et al. Incomplete improvement of visuo-motor deficits in patients with minimal hepatic encephalopathy after liver transplantation. *Liver Transpl.* 2004;10(1):77-83.
- Medawar PB. Immunity to homologous grafted skin; the fate of skin homografts transplanted to the brain, to subcutaneous tissue, and to the anterior chamber of the eye. *Br J Exp Pathol.* 1948;29: 58–69.
- Melzer N, Grimm A, Meuth SG, et al. A pure cerebellar syndrome with corresponding ponto-cerebellar atrophy in acquired hepatocerebral degeneration. *J Neurol Sci.* 2010;292(1-2):96-8.
- Miall RC, Reckess GZ, Imamizu H. The cerebellum coordinates eye and hand tracking movements. *Nat Neurosci.* 2001;4(6):638-44.
- Michalak A, Butterworth RF. Ornithine transcarbamylase deficiency: pathogenesis of the cerebral disorder and new prospects for therapy. *Metab Brain Dis.* 1997;12:171-182.
- Middeldorp J, Hol EM. GFAP in health and disease. *Prog Neurobiol.* 2011;93:421–43.
- Moalem G, Leibowitz-Amit R, Yoles E, et al. Autoimmune T cells protect neurons from secondary degeneration after central nervous system axotomy. *Nat Med.* 1999;5:49–55.
- Monfort P, Erceg S, Piedrafita B, et al. Chronic liver failure impairs glutamatergic synaptic transmission and long-term potentiation in hippocampus and learning ability. *Eur. J. Neurosci.* 2007;25,2103–2111.
- Montoliu C, Llansola M, Felipo V. Neuroinflammation and neurological alterations in chronic liver diseases. *Neuroimmunol Neuroinflamm.* 2015;2:138–44.
- Montoliu C, Piedrafita B, Serra M, et al. IL-6 and IL-18 in blood may discriminate cirrhotic patients with and without minimal hepatic encephalopathy. *J Clin Gastroenterol.* 2009;43(3):272-279.
- Morris RG, Frey U. Hippocampal synaptic plasticity: role in spatial learning or the automatic recording of attended experience? *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 1997;352,1489–1503.
- Morris RGM, Garrud P, Rawlins JNP, et al. Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. *Nature.* 1982;297:681-683.

- Morsch M, Radford R, Lee A, et al. In vivo characterization of microglial engulfment of dying neurons in the zebrafish spinal cord. *Front Cell Neurosci.* 2015;31;9:321.
- Msall M, Batshaw ML, Suss R, et al. Neurologic outcome in children with inborn errors of urea synthesis. Outcome of urea-cycle enzymopathies. *N Engl J Med.* 1984;310:1500-1505
- Murray TK, Ridley RM. The effect of dizocilpine (MK-801) on conditional discrimination learning in the rat. *Behav Pharmacol.* 1997;8(5):383-8.
- Nakajima T, Kamijo Y, Tanaka N, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor- $\alpha$  protects against alcohol-induced liver damage. *Hepatology.* 2004;40:972–980.
- Nave KA. Myelination and support of axonal integrity by glia. *Nature.* 2010;468(7321):244–252.
- Niiijima A. The afferent discharges from sensors for interleukin-1 $\beta$  in the hepatportal system in the anesthetized rat. *J. Auton. Nerv. Syst.* 1996;61:287–291.
- Nimmerjahn A, Kirchhoff F, Helmchen F. Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science.* 2005;308:1314–18.
- Norenberg MD, Martinez-Hernandez A. Fine structural localization of glutamine synthetase in astrocytes of rat brain. *Brain Res.* 1979;161: 303-310.
- Norenberg MD. The role of astrocytes in hepatic encephalopathy. *Neurochem Pathol.* 1987;6:13-33.
- O’Keefe J, and Conway DH. Hippocampal place units in the freely moving rat: why they fire where they fire. *Expl Brain Res.* 1978;32, 573-590.
- O’Keefe J. Place units in the hippocampus of freely moving rat. *Expl Neurol.* 1976;51, 78-109.
- O’Keefe J. and Dostrovsky J. The hippocampus as a spatial map. Preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat. *Brain Res.* 1971;34,171-175.
- O’Keefe J. and Nadel L. The hippocampus as a cognitive map. Oxford University Press, New York. 1978.
- Official Website for REMICADE® (infliximab) <http://www.remicade.com/>

- Ogoshi F, Yin HZ, Kuppumbatti Y, et al. Tumor necrosis-factor-alpha (TNF-alpha) induces rapid insertion of Ca<sup>2+</sup>-permeable alpha-amino-3-hydroxyl-5-methyl-4-isoxazole-propionate (AMPA)/kainate (Ca-A/K) channels in a subset of hippocampal pyramidal neurons. *Exp. Neurol.* 2005;193, 384–393.
- Oliveri M, Torriero S, Koch G, et al. The role of transcranial magnetic stimulation in the study of cerebellar cognitive function. *Cerebellum.* 2007;6: 95-101.
- Olton DS, Becker JT, Handelmann E. Hippocampus, space and memory. *Behav Brain Sci.* 1979;2,313-366.
- Parekh R, Kaur N. Liver injury secondary to anti-TNF-alpha therapy in inflammatory bowel disease: a case series and review of the literature. *Case Rep Gastrointest Med.* 2014;2014:956463.
- Park SA, Heo K. Prominent cerebellar symptoms with unusual magnetic resonance imaging findings in acquired hepatocerebral degeneration. *Arch Neurol.* 2004;61(9):1458-60.
- Piedrafita B, Cauli O, Montoliu C, et al. The function of the glutamate-nitric oxide-cGMP pathway in brain in vivo and learning ability decrease in parallel in mature compared with young rats. *Learn Mem.* 2007;14: 254-258.
- Pikor NB, Astarita JL, Summers-Deluca L, et al. Integration of Th17- and Lymphotoxin-Derived Signals Initiates Meningeal-Resident Stromal Cell Remodeling to Propagate Neuroinflammation. *Immunity.* 2015;43(6):1160-73.
- Pikor NB, Prat A, Bar-Or A, et al. Meningeal Tertiary Lymphoid Tissues and Multiple Sclerosis: A Gathering Place for Diverse Types of Immune Cells during CNS Autoimmunity. *Front Immunol.* 2016;6:657.
- Prasad S, Dhiman RK, Duseja A, et al. Lactulose improves cognitive functions and health-related quality of life in patients with cirrhosis who have minimal hepatic encephalopathy. *Hepatology.* 2007;45: 549-559.
- Puca FM, Antonaci F, Panella C, et al. Psychomotor dysfunctions in alcoholic and post-necrotic cirrhotic patients without overt encephalopathy. *Acta Neurol Scand.* 1989;79:280-287.
- Quan N. Immune-to-brain signaling: how important are the blood-brain-barrier-independent pathways. *Mol Neurobiol.* 2008;37(2-3):142–152.

- Radjavi A, Smirnov I, Kipnis J. Brain antigen-reactive CD4(+) T cells are sufficient to support learning behavior in mice with limited T cell repertoire. *Brain Behav Immun.* 2014;35: 58 – 63.
- Raftery G, He J, Pearce R, et al. Disease activity and cognition in rheumatoid arthritis: an open label pilot study. *Arthritis Res Ther.* 2012;14(6):R263.
- Rajkowska G, Stockmeier CA. Astrocyte pathology in major depressive disorder: insights from human postmortem brain tissue. *Current drug targets.* 2013;14:1225–1236.
- Ramirez M, Fernandez R, Malnic G. Permeation of NH<sub>3</sub>/NH<sub>4</sub><sup>+</sup> and cell pH in colonic crypts of the rat. *Pflugers Arch.* 1999;438:508-515.
- Ransohoff RM and Brown M. Innate immunity in the central nervous system *J Clin Invest.* 2012;122(4):1164–1171.
- Ransohoff RM, Cardona AE. The myeloid cells of the central nervous system parenchyma. *Nature.* 2010;468(7321):253–262.
- Ransohoff RM, Kivisakk P, Kidd G Three or more routes for leukocyte migration into the central nervous system. *Nat Rev Immunol.* 2003;3:569–581.
- Ransohoff RM, Engelhardt B. The anatomical and cellular basis of immune surveillance in the central nervous system. *Nat Rev Immunol.* 2012;12:623–635.
- Rao MS and Reddy JK. PPAR in the pathogenesis of fatty liver disease. *Hepatology.* 2004;40:783–786.
- Rau M, Schilling AK, Meertens J, et al. Progression from Nonalcoholic Fatty Liver to Nonalcoholic Steatohepatitis Is Marked by a Higher Frequency of Th17 Cells in the Liver and an Increased Th17/Resting Regulatory T Cell Ratio in Peripheral Blood and in the Liver. *J Immunol.* 2016;196(1):97-105.
- Rawlins JNP, Olton DS. The septohippocampal system and cognitive mapping. *Behav Brain Res.* 1982;5:331-358.
- Reddy JK and Hashimoto T. Peroxisomal  $\beta$ -oxidation and peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$ : an adaptive metabolic system. *Annu Rev Nutr.* 2001;21:193–230.
- Rehnstrom S, Simert G, Hansson JA, et al. Chronic hepatic encephalopathy. A psychometrical study. *Scand J Gastroenterol.* 1977;12: 305-311.

- Rodrigo R, Cauli O, Gomez-Pinedo U, et al. Hyperammonemia induces neuroinflammation that contributes to cognitive impairment in rats with hepatic encephalopathy. *Gastroenterology*. 2010;139(2):675-684.
- Romero-Gomez M, Cordoba J, Jover R, et al. Value of the critical flicker frequency in patients with minimal hepatic encephalopathy. *Hepatology*. 2007;45:879-885.
- Rook GA, Lowry CA, Raison CL. Lymphocytes in neuroprotection, cognition and emotion: is intolerance really the answer? *Brain Behav Immun*. 2011;25: 591–601.
- Rossi D, Brambilla L, Valori CF, et al. Focal degeneration of astrocytes in amyotrophic lateral sclerosis. *Cell Death Differ*. 2008;15:1691–1700.
- Rummel C, Sachot C, Poole S, et al. Circulating interleukin-6 induces fever through a STAT3-linked activation of COX-2 in the brain. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2006;291(5):R1316–R1326.
- Salmon DP, Butters N. Neurobiology of skill and habit learning. *Curr Opin Neurobiol*. 1995;5:184-190.
- Sanderson DJ, Good MA, Seeburg PH, et al. The role of the GluR-A (GluR1) AMPA receptor subunit in learning and memory. *Prog. Brain Res*. 2008;169, 159–178.
- Sanderson DJ, McHugh SB, Good MA, et al. Spatial working memory deficits in GluA1 AMPA receptor subunit knockout mice reflect impaired short-term habituation: evidence for Wagner's dual-process memory model. *Neuropsychologia* 2010;48,2303–2315.
- Schmahmann JD. An emerging concept. The cerebellar contribution to higher function. *Arch Neurol*. 1991;48: 1178-1187.
- Schomerus H, Hamster W. Quality of life in cirrhotics with minimal hepatic encephalopathy. *Metab Brain Dis*. 2001;16: 37-41.
- Schori H, Kipnis J, Yoles E, et al. Vaccination for protection of retinal ganglion cells against death from glutamate cytotoxicity and ocular hypertension: implications for glaucoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:3398–3403.
- Schwartz M, Shechter R. Protective autoimmunity functions by intracranial immunosurveillance to support the mind: the missing link between health and disease. *Mol Psychiatry*. 2010; 15: 342–354.

- Sehic E and Blatteis CM. Blockade of lipopolysaccharide-induced fever by subdiaphragmatic vagotomy in guinea pigs. *Brain. Res.* 1996;726,160-166.
- Shawcross DL, Davies NA, Williams R, et al. Systemic inflammatory response exacerbates the neuropsychological effects of induced hyperammonemia in cirrhosis. *J Hepatol.* 2004;40:247-254.
- Shawcross DL, Wright G, Olde Damink SW, et al. Role of ammonia and inflammation in minimal hepatic encephalopathy. *Metab Brain Dis.* 2007;22(1):125–38.
- Sherlock S, Summerskill WH, White LP, et al. Portal-systemic encephalopathy; neurological complications of liver disease. *Lancet.* 1954;267:454-457.
- Shirai Y. On the transplantation of the rat sarcoma in adult heterogenous animals. *Jap Med World.* 1921;1: 14.
- Simons CT, Kulchitsky VA, Sugimoto N, et al. Signaling the brain in systemic inflammation: which vagal branch is involved in fever genesis? *Am. J. Physiol.* 1998;275,R63-R68.
- Slowik A, Ciecko-Michalska I, Bogdal J, et al. The diagnosis of subclinical hepatic encephalopathy. *Przegl Lek.* 2001;58:1059-1062.
- Smith K. Neuroscience: settling the great glia debate. *Nature.* 2010;468(7321):160–162.
- Snider RS, Maiti A, Snider SR. Cerebellar pathways to ventral midbrain and nigra. *Exp Neurol.* 1976;53: 714-728.
- Sofroniew MV, Vinters HV. Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol.* 2010; 119(1):7–35.
- Sotil EU, Gottstein J, Ayala E, et al. Impact of preoperative overt hepatic encephalopathy on neurocognitive function after liver transplantation. *Liver Transpl.* 2009;15(2):184-92.
- Squire LR, Zola SM. Structure and function of declarative and nondeclarative memory systems. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1996;93:13515-13522.
- Stark LA and Dunlop MG. Nucleolar sequestration of RelA (p65) regulates NF- $\kappa$ B-driven transcription and apoptosis. *Mol. Cell. Biol.* 2005;25, 5985–6004.
- Tchéliingérián JL, Le Saux F, Jacque C. Identification and topography of neuronal cell populations expressing TNF alpha and IL-1 alpha in response to hippocampal lesion. *J. Neurosci. Res.* 1996;43, 99–106.

- Terrando N, Monaco C, Ma D, et al. Tumor necrosis factor-alpha triggers a cytokine cascade yielding postoperative cognitive decline. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010;107(47):20518-22.
- Tobinick EL, Gross H. Rapid cognitive improvement in Alzheimer's disease following perispinal etanercept administration. *J Neuroinflammation*. 2008;5:2.
- Verkhratsky A and Butt AM. *Glial Neurobiology*. 2007.
- Verkhratsky A, Marutle A, Rodriguez-Arellano JJ, et al. Glial Asthenia and Functional Paralysis: A New Perspective on Neurodegeneration and Alzheimer's Disease. *The Neuroscientist*. 2014a; 21(5):552-568.
- Verkhratsky A, Parpura V, Pekna M, Pekny M, Sofroniew M. Glia in the pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Biochem Soc Trans*. 2014b; 42:1291–1301.
- Vezina P and Kim JH. Metabotropic glutamate receptors and the generation of locomotor activity: interactions with midbrain dopamine. *Neurosci Biobehav Rev*. 1999;23:577-589.
- Vivithanaporn P, Maingat F, Lin LT, et al. Hepatitis C virus core protein induces neuroimmune activation and potentiates human immunodeficiency virus-1 neurotoxicity. *PLoS One*. 2010;5:e12856.
- Walker-Caulfield ME, Hatfield JK, Brown MA. Dynamic changes in meningeal inflammation correspond to clinical exacerbations in a murine model of relapsing-remitting multiple sclerosis. *J Neuroimmunol*. 2015;278:112–22.
- Wang L, Sun X, Qiu J, et al. Increased numbers of circulating ICOS<sup>+</sup> follicular helper T and CD38<sup>+</sup> plasma cells in patients with newly diagnosed primary biliary cirrhosis. *Dig Dis Sci*. 2015;60(2):405-13.
- Watanabe A. Portal-systemic encephalopathy in non-cirrhotic patients: classification of clinical types, diagnosis and treatment. *J Gastroenterol Hepatol*. 2000;15: 969-979
- Weiner ID. The Rh gene family and renal ammonium transport. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2004;13:533-540.
- Weissenborn K, Bokemeyer M, Krause J, et al. Neurological and neuropsychiatric syndromes associated with liver disease. *AIDS*. 2005a;19 Suppl 3:S93-98

- Weissenborn K, Ennen JC, Schomerus H, et al. Neuropsychological characterization of hepatic encephalopathy. *J Hepatol.* 2001;34:768-773.
- Weissenborn K, Giewekemeyer K, Heidenreich S, et al. Attention, memory, and cognitive function in hepatic encephalopathy. *Metab Brain Dis.* 2005b;20:359-367.
- Wiggs CL, Weisberg J, Martin A. Neural correlates of semantic and episodic memory retrieval. *Neuropsychologia.* 1999;37:103-118.
- Williams MR, Hampton T, Pearce RK, et al. Astrocyte decrease in the subgenual cingulate and callosal genu in schizophrenia. *Eur Arch Psychiat Clin Neurosci.* 2013;263:41–52.
- Wojcicki M, Haagsma EB, Gouw AS, et al. Orthotopic liver transplantation for portosystemic encephalopathy in an adult with congenital absence of the portal vein. *Liver Transpl.* 2004;10:1203-1207.
- Wu Z, Guo Z, Gearing M, et al. Tonic inhibition in dentate gyrus impairs long-term potentiation and memory in an Alzheimer's disease model. *Nat Commun.* 2014;5:4159.
- Yachha SK, Khanduri A, Sharma BC, et al. Gastrointestinal bleeding in children. *J Gastroenterol Hepatol.* 1996;11:903-907.
- Yamada K, Hiramatsu M, Noda Y, et al. Role of nitric oxide and cyclic GMP in the dizocilpine-induced impairment of spontaneous alternation behavior in mice. *Neuroscience.* 1996;74:365-374.
- Yanagitani A, Yamada S, Yasui S, et al. Retinoic acid receptor dominant negative form causes steatohepatitis and liver tumors in transgenic mice. *Hepatology.* 2004;40:366–375.
- Yu S, Matsusue K, Kashireddy P, et al. Adipocyte-specific gene expression and adipogenic steatosis in the mouse liver due to peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$ 1 (PPAR $\gamma$ 1) overexpression. *J Biol Chem.* 2003;278:498–505.
- Zafrani ES. Non-alcoholic fatty liver disease: an emerging pathological spectrum. *Virchows Arch.* 2004;444:3–12.
- Zemtsova I, Gorg B, Keitel V, et al. Microglia activation in hepatic encephalopathy in rats and humans. *Hepatology* 2011;54:204-15.

- Zhang ET, Inman CB, Weller RO. Interrelationships of the pia mater and the perivascular (Virchow-Robin) spaces in the human cerebrum. *J Anat.* 1990;170:111–23.
- Ziv Y, Ron N, Butovsky O, et al. Immune cells contribute to the maintenance of neurogenesis and spatial learning abilities in adulthood. *Nat Neurosci.* 2006;9:268–275.